

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA
VALÈNCIA**

***EXTRACCIÓN Y
DETERMINACIÓN DE BALENINA
Y OTROS DIPÉPTIDOS DE
HISTIDINA EN DIFERENTES
ESPECIES ANIMALES Y
PRODUCTOS CÁRNICOS***

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

ALUMNA: CHRISTINA KIOOMI LOÚ RAMOS

TUTOR ACADÉMICO: FIDEL TOLDRÁ VILARDELL
COTUTORA: M^a CONCEPCIÓN ARISTOY ALBERT

Curso Académico: 2017-2018

VALENCIA, 13 SEPTIEMBRE DEL 2018
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)

EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE BALENINA Y OTROS DIPÉPTIDOS DE HISTIDINA EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES Y PRODUCTOS CÁRNICOS

Christina Kioomi Louú-Ramos, Fidel Toldrá ¹ y M-Concepción Aristoy ¹

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se basó en la optimización de una metodología para la determinación de balenina (β -alanil-1-metil-L-histidina), carnosina (β -alanil-L-histidina) y anserina (β -alanil-3-metil-L-histidina) en muestras cárnicas, mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por intercambio iónico y una detección con UV a 214 nm. Se comparó 5 métodos de extracción y desproteinización de muestra, siendo el que permitió mayor recuperación de los dipéptidos el de agua caliente ($95\pm 5^\circ\text{C}$) en agitación, en la proporción 1:4 (p/v). Como en la actualidad no existe patrón comercial de balenina disponible en el mercado, esta fue aislada del músculo de cerdo *Longissimus* y cuantificada. De igual manera, para reducir el contenido de sal que acompañaba a la balenina en la disolución obtenida, se ensayó dos métodos de desalado en extracto de dipéptidos (por columnas SPE con sorbente HLB y por precipitación con disolventes orgánicos) para evitar posibles interferencias. La mezcla metanol-agua (75:25) con el extracto permitió la mayor recuperación de dipéptido y menor disolución de sal. Posteriormente, la disolución de balenina final se utilizó como patrón para su análisis, junto con el de carnosina y anserina, en diferentes cortes de carne de especies animales y productos cárnicos de cerdo.

PALABRAS CLAVE: balenina, carnosina, anserina, HPLC, extracción, desproteinización, desalado, carne, productos cárnicos.

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)
Avda. Agustín Escardino, 7. 46980, Paterna (Valencia). Telf. 963900022 Ext. 2111

RESUM

El present treball de recerca es va basar en l'optimització d'una metodologia per a la determinació de balenina (β -alanil-1-metil-L-histidina), carnosina (β -alanil-L-histidina) i anserina (β -alanil-3-metil-L-histidina) en mostres càrniques, mitjançant la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) per intercanvi iònic i detecció amb UV a 214 nm. Es va comparar 5 mètodes d'extracció i desproteïnicació de mostra, sent el que va permetre major recuperació dels dipèptids el d'aigua calenta ($95\pm 5^\circ\text{C}$) en agitació, en la proporció 1:4 (p/v). Com en l'actualitat no existeix patró comercial de balenina disponible en el mercat, aquesta va ser aïllada del múscul de porc *Longissimus* i quantificada. D'igual manera, per a reduir el contingut de sal que acompanyava a la balenina en la dissolució obtinguda, es va assajar dos mètodes de desalad en extracte de dipèptids (per columnes SPE amb sorbent HLB i per precipitació amb dissolvents orgànics) per a evitar possibles interferències. La barreja metanol-aigua (75:25) amb l'extracte va permetre la major recuperació de dipèptid i menor dissolució de sal. Posteriorment, la dissolució de balenina final es va utilitzar com a patró per tal d'analitzar-la, juntament amb la carnosina i anserina, en diferents talls de carn d'espècies animals i productes càrnics de porc.

PARAULES CLAU: balenina, carnosina, anserina, HPLC, extracció, desproteïnicació, desalad, carn, productes càrnics.

ABSTRACT

The present research work was based on the optimization of a methodology to determine balenine (β -alanyl-1-methyl-L-histidine), carnosine (β -alanyl-L-histidine) and anserine (β -alanyl-3-methyl-L-histidine) in meat samples, through cation-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet detection at 214 nm. Five methods of sample extraction and deproteinization were compared, but the one that allowed the highest recovery of the dipeptides was the method that applied hot water ($95\pm 5^\circ\text{C}$) under stirring, in the proportion 1:4 (w/v). Nowadays, the balenine dipeptide is not commercially available as a standard, so it was isolated from pork muscle *Longissimus* and then quantified. Moreover, in order to remove salt from the obtained balenine solution, two desalting methods were tested (SPE HLB cartridges and precipitation with organic solvents). The mix methanol-water (75:25) with the extract allowed the highest dipeptide recovery and the lowest salt solution. Afterwards, the final balenine solution was used as a standard to analyze this dipeptide, along with carnosine and anserine, in different cuts from animal species and pork meat products.

KEYWORDS: balenine, carnosine, anserine, HPLC, extraction, deproteinization, desalting, meat, meat products.

1. INTRODUCCIÓN

La carne y los productos cárnicos llevan mucho tiempo formando parte importante de la dieta europea, no sólo por sus características nutricionales, sino también, por sus apetecibles y únicas características de aroma y sabor, especialmente de productos cárnicos curados o cocidos, que le ofrecen un valor añadido importante para su consumo (Mora, 2010).

El consumo per cápita de carne en España es de 47.60 kg por persona y año. De esta cantidad, el 73.4% corresponde a carne fresca; el 24.0%, a carne procesada y el 2.6%, a carne congelada. En términos de volumen, el 37.2% de los kilogramos de carne fresca consumida pertenecen a carne de pollo; el 29.3%, a cerdo; el 14.8%, a ternera; el 4.3%, a ovino/caprino; el 3.3%, a conejo y el restante a otros tipos de carne. Asimismo, el 25.3% de los kilogramos de carne procesada corresponde a jamón curado/paleta; el 14.5%, a jamón cocido; el 11.4%, a chorizos; el 8.2%, a fuet/longanizas; el 5.2%, a salchichón/salami; el 3.3%, a lomo embuchado y el restante a otros tipos de productos cárnicos procesados (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, MAPAMA, 2018).

La carne es un alimento que representa una fuente de proteínas de alto valor biológico, vitaminas (especialmente del grupo B), minerales (hierro) y elementos traza (Zn, Se, entre otros) biodisponibles. No obstante, no son muchos los estudios que abordan en profundidad la presencia de compuestos bioactivos en la carne, que a pesar de estar presentes en pequeñas cantidades, pueden aportar un beneficio importante para la salud de los consumidores (Song *et al.*, 2014; Toldrá, 2010). Entre estos compuestos, se encuentran los dipéptidos naturales de la carne, cuyo origen no es proteico, como la balenina (β -alanil-1-metil-L-histidina), carnosina (β -alanil-L-histidina), anserina (β -alanil-3-metil-L-histidina) y homocarnosina (γ -aminobutírico-L-histidina) que se encuentran en el músculo esquelético de mayoría de los animales vertebrados (Boldryev *et al.* 2013; Marušić *et al.*, 2013).

Los dipéptidos de histidina han permitido identificar las especies animales utilizadas como ingredientes en productos cárnicos, así como la presencia de proteínas de origen animal en piensos para rumiantes (Aristoy y Toldrá, 2004), pero también, poseen características de actividad biológica, como: antioxidantes, protectores contra radicales libres, neurotransmisores, reguladores de glucosa en sangre, vasodilatadores, tamponantes y reguladores de iones. De igual modo, han sido relacionados con la percepción sensorial de alimentos e inclusive en la generación de compuestos de aroma y sabor en productos cárnicos (Aristoy *et al.*, 2016; Boldryev *et al.*, 2013; Peiretti *et al.*, 2011; Sauerhofer *et al.*, 2007; Leinsoo *et al.*, 2006; Chen y Ho, 2002; Pereira-Lima *et al.*, 2000).

El contenido de estos dipéptidos es especialmente elevado en músculos con metabolismo glucolítico, aunque éste también va a depender de la especie animal, la edad y la dieta (Aristoy *et al.*, 2016; Mora *et al.*, 2007). La balenina se encuentra en altos niveles en el tejido muscular de mamíferos cetáceos, como ballenas y delfines; y en reptiles, como las serpientes. Además, dentro de los mamíferos terrestres, la balenina se encuentra presente en mayor concentración en lomo de cerdo que en otros tipos y cortes

de carne, cuyas concentraciones son muy bajas o no detectables. Por otro lado, la carnosina se encuentra en niveles elevados en carnes de cerdo y vaca; mientras que la anserina es predominante en aves, pescados y focas. Sin embargo, la homocarnosina se ha detectado en mayor proporción en cerebro que en músculo esquelético en mamíferos (Boldyrev *et al.*, 2013; Aristoy y Toldrá, 2004).

La técnica más utilizada para el análisis de los dipéptidos de histidina es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); esto se debe a su versatilidad, corto tiempo de análisis y gran eficacia (Mora *et al.*, 2007). Los métodos que incluye son: i) cromatografía por intercambio iónico y detección UV o tras derivatización post-columna con OPA, aumentando la sensibilidad con detección fluorescente; también se ha empleado la detección amperométrica de pulsos. ii) cromatografía líquida por fase reversa con derivatización pre-columna y detección UV o fluorescente. iii) o la cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) y detección UV (Aristoy *et al.*, 2016; Mora, 2010; Aristoy *et al.*, 2004; Nardiello y Cataldi, 2004).

Si bien es cierto, ya se han desarrollado investigaciones de carnosina y anserina en carnes (Jung *et al.*, 2013; Mateescu *et al.*, 2012; Peiretti *et al.*, 2011), hasta la actualidad, hay muy pocos estudios sobre la presencia de balenina en diferentes tipos de carne y productos cárnicos. Una de las complicaciones para este análisis, es que las casas comerciales de reactivos no disponen de balenina patrón.

Por lo tanto, los objetivos de la presente investigación fueron:

- ◆ Optimización de la metodología de extracción de balenina y otros dipéptidos de histidina a partir de lomo de cerdo.
- ◆ Extracción, aislamiento y confirmación de la identidad de la balenina extraída.
- ◆ Desalado y valoración de la disolución estándar de balenina.
- ◆ Análisis de dipéptidos de histidina (balenina, carnosina y anserina) en diversos cortes de carne (cerdo, pollo, ternera y conejo) y productos cárnicos derivados del cerdo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras

Los cortes de carne de cerdo: lomo caña (*Longissimus*), lomo cabecero (*Trapezius*) y jamón (*Biceps femoris*); pollo: pechuga (*Pectoralis major*), contramuslo (*Iliotibialis*) y muslo (*Quadriceps femoris*); ternera: aguja (*Trapezius*); conejo: lomo (*Longissimus*); y el lomo curado (de cerdo “Duroc” y de cerdo “Ibérico”) provinieron de supermercados locales. Mientras, el jamón “serrano”, salchichón y chorizo fueron elaborados en la planta piloto del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC).

2.2. Reactivos químicos

Acetonitrilo, metanol y etanol absolutos (HPLC ultragradiante) y ácido clorhídrico al 37% de Scharlau (Barcelona, España). Nitrato de plata, acetato sódico anhidro, fosfato sódico dibásico anhidro, cloruro de sodio y fenol cristalizado de Panreac (Madrid, España). L-carnosina, sal de L-anserina nitrato, β -alanina, 1-metil-L-histidina, L-histidina, 3-metil-L-histidina, ácido γ -aminobutírico, trans-4-hydroxy-L-proline, ácido trifluoroacético (TFA), fenilisotiocianato (PITC) y trietilamina (TEA) de Sigma Aldrich (San Luis, MO, USA).

2.3. Preparación de muestras

La preparación de muestras incluye la extracción de los dipéptidos y desproteización del extracto para evitar interferencias. La puesta a punto se realizó empleando lomo caña (*Longissimus*) de cerdo. Se ensayó 5 métodos que se clasificaron en dos apartados.

2.3.1. EXTRACCIÓN CON HCl Y DESPROTEIZACIÓN CON DISOLVENTES ORGÁNICOS

Los 3 primeros métodos de extracción se realizaron empleando HCl 0.1 N y para la posterior desproteización, se empleó respectivamente tres disolventes orgánicos (acetonitrilo, etanol y metanol absolutos), realizándose una adaptación de los métodos propuestos por Mora (2010), Mora *et al.* (2007) y Aristoy *et al.* (2004).

Se tomó una muestra de lomo (aproximadamente 25 g), se trituró finamente y se pesó 5 g por cada método. Se homogenizó cada muestra con 20 mL de HCl 0.1 N en el stomacher (IUL, España) a 4°C por 8 min. Se centrifugó el homogenizado a 15 000 rpm x 20 min a 4°C (modelo Avanti J-26 XP, Beckman Coulter, USA). Se filtró el sobrenadante con lana de vidrio. A 2 mL de cada uno de los 3 extractos obtenidos, se les adicionó 6 mL de acetonitrilo, etanol y metanol respectivamente (proporción 1:3, v/v) y se centrifugó en las mismas condiciones. Se filtró el sobrenadante utilizando filtros de jeringa de membrana de nylon (diámetro de poro de 0.45 μ m) y se colocó en viales de inyección para su posterior análisis por HPLC. Se almacenó el extracto restante en congelación a -18°C. Se realizó 3 repeticiones.

2.3.2. EXTRACCIÓN Y DESPROTEIZACIÓN SIMULTÁNEA POR AGUA CALIENTE (95 \pm 5°C) EN AGITACIÓN

Para la extracción de dipéptidos, Schöner (2002) empleó agua como disolvente, una relación de muestra y agua bidestilada 1:4 (p/v) en agitación durante 2 h a temperatura ambiente, filtró el extracto y realizó una desproteización con ácido 5-sulfosalicílico. Por otra parte, Aristoy y Toldrá (2004) manifiestan que los dipéptidos de histidina presentan buena estabilidad a tratamientos con calor, inclusive a temperatura alta de 120°C por 20 min.

Aprovechando esta información, se evaluó utilizar como método de extracción agua caliente ($95\pm 5^{\circ}\text{C}$) en agitación, que permitía la desprotección simultánea de la muestra, buscando así, obtener extractos menos diluidos.

Por lo cual, se ensayó dos proporciones de muestra- agua 1:4 y 1:10 (p/v) (se les llamará "AC 1:4" y "AC 1:10" respectivamente de aquí en adelante). Para ello, se pesó dos porciones de 5 g de lomo triturado, que se introdujeron respectivamente en dos tubos sovirel con 20 y 50 mL de H_2O bidestilada. Se mantuvo los tubos en baño María a $95\pm 5^{\circ}\text{C}$ por 30 min, en agitación magnética a 560 rpm. Se dejó enfriar los extractos y se centrifugaron a 15 000 rpm x 20 min a 4°C . Se realizó dos filtraciones consecutivas de cada sobrenadante, la primera con papel Whatman (diámetro 70 mm, retención de partículas $> 11 \mu\text{m}$) y la segunda con filtro de jeringa de membrana de nylon (diámetro de poro de $0.45 \mu\text{m}$); y se colocaron en viales de inyección para su posterior análisis por HPLC. Se almacenó el extracto restante en congelación a -18°C . Se realizó 3 repeticiones.

2.4. Análisis cromatográfico por HPLC

Los dipéptidos fueron analizados por intercambio catiónico mediante cromatografía líquida de alta resolución (IC-HPLC) tal como describen Aristoy y Toldrá (2004), pero con cambios, ya que no se realizó la derivatización post-columna y la detección fue por UV a una longitud de onda de 214 nm.

Para este análisis, 5 μL de cada extracto se inyectaron a una columna Waters Spherisorb SCX de 4.0 X 250 mm (Waters, Wexford, Irlanda) en un sistema HPLC modelo 1100 de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). La fase móvil estuvo compuesta por: fase A, 20% acetonitrilo en HCl 6 mM y la fase B, compuesta por fase A con 0.8 M NaCl. El flujo fue de 1 mL/ min. La separación se logró mediante un gradiente del disolvente B como sigue: después de 5 min de elución isocrática con 20% B, se aplicó un gradiente de 10 min hasta 50% B, seguido de un lavado de 10 min con 100% B, se retornó a condiciones iniciales y se tuvo un tiempo de espera de 15 min antes de la siguiente inyección. Se trabajó a una temperatura de 40°C .

2.5. Obtención de rectas de calibrado con disoluciones patrón de dipéptidos de histidina

Se obtuvo las rectas de calibrado de carnosina y anserina a partir del análisis por regresión lineal de los nanogramos inyectados versus las áreas de pico de disoluciones de los dipéptidos, empleando 5 niveles de concentración (0.11, 0.23, 0.68, 1.14 y 1.60 mg carnosina/ mL y 0.01, 0.03, 0.09, 0.15 y 0.20 mg anserina/ mL). Para determinar las áreas de pico, se realizó un análisis cromatográfico por IC-HPLC, inyectando 5 μL de cada disolución, bajo las condiciones explicadas en el apartado 2.4. La recta de calibrado de balenina se calculó después de obtener una disolución y valorarla, como se describe en el siguiente apartado.

2.6. Obtención de una disolución valorada de balenina patrón

2.6.1. EXTRACCIÓN Y CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA

La disolución valorada de balenina se obtuvo a partir del lomo de cerdo, procediéndose a la extracción y desproteinización "AC-1:4", explicado en el apartado 2.3.2. El proceso se repitió 2 veces.

De igual manera, se procedió a la separación cromatográfica de los extractos por IC-HPLC, bajo el procedimiento descrito en el apartado 2.4, pero inyectando 100 μ L. Se realizó repetidas inyecciones y se fue recogiendo la fracción correspondiente al pico que eluía a 14.1 min (concentración de 0.39 M NaCl) *. Así, se realizó 40 inyecciones por extracto, obteniéndose un volumen recogido total de 40 mL de fracción pico por cada extracto (extracto 1 y extracto 2). Las fracciones (40 mL por cada extracto) se llevaron a sequedad, independientemente, mediante evaporación rotatoria a 40°C.

La identidad de la balenina en los extractos fue confirmada por hidrólisis y análisis de aminoácidos componentes (ver apartados 2.6.2 y 2.6.3).

(*) Cabe resaltar que también se recolectó las fracciones de los picos correspondientes a carnosina y anserina, que eluían a 11.9 y 12.7 min (a concentraciones de 0.33 y 0.35 M NaCl respectivamente); y se reservaron en congelación a -18°C.

2.6.2. HIDRÓLISIS

Las fracciones secas 1 y 2 se redisolviéron respectivamente en 2 mL metanol- H₂O (75:25) (según se optimizó, como se describirá en el apartado 2.7). Las disoluciones se filtraron rápidamente empleando filtros de jeringa de membrana de nylon (diámetro de poro de 0.45 μ m), de tal manera que, la mayor cantidad de sal quedó sin disolver y/o retenida en los filtros. Para la hidrólisis, se tomó 100 μ L de cada disolución de los extractos (estimando que se tendría 3.8 μ g de balenina aproximadamente por extracto, empleando la recta de calibrado de anserina), se los colocó en tubos de hidrólisis y se agregó 20 μ L de hidroxiprolina 1mM (0.13 mg/ mL) como patrón interno (PI) a cada tubo.

Siguiendo la metodología de Aristoy *et al.* (2004), la hidrólisis de los extractos de balenina se realizó a vacío, con HCl 6 N y conteniendo fenol al 1% (p/v), en fase vapor, a 110°C por 22 h en un equipo "Pico Tag™ Workstation" (Waters, Milford, MA, USA). Transcurrido el tiempo de la hidrólisis, se dejó enfriar, se retiró el exceso de HCl de los tubos de hidrólisis con paños húmedos y se evaporaron a sequedad.

2.6.3. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

Para confirmar la identidad de los dipéptidos, se procedió a la identificación de los aminoácidos tras la hidrólisis, ayudándose de patrones. Para ello, se preparó 5 disoluciones patrón a concentración 1 mM de: β -alanina (0.09 mg/mL), 1-metil-L-histidina (0.17 mg/mL), L-histidina (0.21 mg/mL), 3-metil-L-histidina (0.17 mg/mL) y γ -aminobutírico (0.10 mg /mL). A

partir de estas disoluciones, se preparó mezclas de cada aminoácido (50 μ L), con 50 μ L de hidroxiprolina 1mM (0.13 mg/ mL), como patrón interno, en tubos Eppendorf; se llevaron a sequedad en un evaporador centrífugo a vacío (Jouan, USA) y se sometieron al análisis de aminoácidos.

El análisis de aminoácidos se realizó previa derivatización de los aminoácidos con fenilisotiocianato y cromatografía de fase reversa, de acuerdo a un método adaptado de Pérez-Palacios *et al.* (2010), como se describe a continuación.

2.6.3.1. Derivatización

La derivatización de los aminoácidos fue llevada a cabo con fenilisotiocianato (PITC). Para lo cual, a cada tubo con muestras de dipéptidos hidrolizados y disoluciones patrón de aminoácidos, se le agregó 20 μ L de reactivo de secado (metanol: agua: trietilamina 2:2:1, v/v/v) y se llevó a sequedad. A continuación, se les añadió 15 μ L de reactivo de derivatización (metanol: agua: trietilamina: fenilisotiocianato 7:1:1:1, v/v/v/v) en cada tubo a analizar, se dejó reaccionar por 20 min y se secó de nuevo, quedando listos para el análisis cromatográfico.

2.6.3.2. Análisis cromatográfico por HPLC

El contenido de aminoácidos fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (FR-HPLC), utilizando un cromatógrafo Agilent 1200 (Agilent Chromatography, Milford, MA, USA) y una columna Pico Tag^R (3.9 x 300 mm) para análisis de aminoácidos libres (Waters Co., Wexford, Irlanda, E.U). La detección de los aminoácidos se realizó por UV a una longitud de onda de 254 nm. El flujo fue de 1 mL/ min a un gradiente del disolvente B como sigue: inicial 0% B, 13.5 min de gradiente lineal a 3.0% B, 3 min de gradiente lineal a 3.1% B, 2.5 min de gradiente lineal a 3.5% B, 2 min hasta 4.5% B, 3 min hasta 6.0% B, 1 min hasta 6.9% B, 1 min hasta 8.0% B, 2 min hasta 8.8% B, 2.5 min hasta 9.0% B, 20 min hasta 34% B y se mantuvo por 10 min a 34% B, se lavó la columna a 100% B durante 10 min. La columna se equilibró durante 20 min en condiciones iniciales, antes de la siguiente inyección. La columna se mantuvo a 52°C.

Para el análisis, se disolvió la muestra (disolución hidrolizada de balenina con PI) y las disoluciones patrón de aminoácidos en 300 μ L de disolvente (fosfato sódico dibásico anhidro 5 mM a pH 7.4 con ácido fosfórico y con 5% de acetonitrilo). Las muestras se centrifugaron a 13 000 rpm x 5 min a 5°C en una microcentrífuga (modelo 22R, Beckman Coulter, USA) y se colocó el sobrenadante en viales para su análisis por FR-HPLC.

Se inyectó 20 μ L de cada muestra y cada solución patrón derivatizada. Como se conocía la composición de los dipéptidos de histidina (balenina = β -alanina +1-metil-L-histidina ; carnosina = β -alanina + L-histidina; anserina = β -alanina +3-metil-L-histidina y homocarnosina = γ -aminobutírico +L-histidina), la identificación se basó en el tiempo de retención de picos cromatográficos resultantes (β -alanina= 9.56 min, 1-metil-L-histidina= 12.95 min, L-histidina= 11.64 min, 3-metil-L-histidina= 20.90 min y γ -aminobutírico= 12.60 min). Por

consiguiente, si los tiempos de retención de los aminoácidos tras la hidrólisis de la balenina coincidían con los de los patrones de β -alanina y 1-metil-L-histidina, entonces se confirmaba la presencia de balenina en la muestra.

2.6.4. VALORACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE BALENINA

Se analizó la concentración de balenina en la disolución obtenida, a partir del análisis de cualquiera de sus aminoácidos componentes, en base a que: "1 mol balenina = 1 mol β -alanina + 1 mol 1-metil-L-histidina". Para este ensayo, se empleó la β -alanina y se obtuvo previamente una recta de calibrado de este aminoácido en relación al patrón interno hidroxiprolina, evaluando mezclas de 50 μ L de hidroxiprolina 1mM (0.13 mg/ mL) y 20, 40, 60 y 80 μ L de la disolución β -alanina 1 mM (descrita en el apartado 2.6.3). La recta se obtuvo por regresión lineal de los mg β -alanina/ mg patrón interno versus las áreas β -alanina/ áreas patrón interno, obtenidas realizando el análisis aminoácidos explicado en el apartado 2.6.3.

2.7. Desalado

Los extractos de balenina obtenidos a partir de la cromatografía por intercambio catiónico presentaron una muy alta concentración de sal que interesó reducir al máximo. Se estudió la forma de desalar los extractos de balenina (0.39 M NaCl, tiempo de retención= 14.10 min), debido a que la sal no volatiliza y puede producir interferencias en el análisis de aminoácidos o en estudios posteriores de medidas de actividad biológica de balenina purificada (Macià *et al.*, 2012; Mora, 2010). Se diseñó dos procedimientos de desalado para los extractos.

El primer procedimiento de desalado estuvo basado en el método empleado por Macià *et al.* (2012), donde utilizaron una columna de extracción en fase sólida (SPE: "solid phase extraction") con sorbente HLB. Se tomó una alícuota de 3 mL del extracto cárnico inicial "AC 1:4" (apartado 2.6.1) y se diluyó en 3 mL de TFA 0.1% (se llamará al conjunto "muestra inicial"). Se acondicionó la columna SPE (Oasis HLB 6cc-200 mg, Waters Corporation, USA) con 3 mL de acetonitrilo y 3 mL de TFA 0.1%. Se cargó la muestra inicial y se recolectó el eluido. Se inyectó, respectivamente, 20 μ L de la muestra inicial y del eluido filtrados (filtro de jeringa de membrana de nylon, diámetro de poro de 0.45 μ m) para realizar un análisis por IC-HPLC y analizar la presencia de los dipéptidos (de acuerdo a las condiciones cromatográficas del apartado 2.4). Igualmente, se les realizó una prueba con nitrato de plata para detectar la presencia de sal en ellos, al formarse un precipitado blanco de cloruro de plata.

Por otro lado, Ferraro *et al.* (2011) afirman que los solventes orgánicos son utilizados frecuentemente en aplicaciones analíticas e industriales para precipitar especies inorgánicas, como NaCl, de soluciones acuosas, ya que permiten la recuperación proteínas, péptidos y aminoácidos disueltos en ellas.

El segundo procedimiento de desalado se basó en encontrar la proporción de metanol-agua o etanol-agua que impidiera la solubilización de la sal y a la

vez, permitiera la mayor solubilización de balenina y con ello, su mayor recuperación a partir de un extracto seco de la misma.

Para el presente ensayo, se calculó (mediante el análisis cromatográfico del apartado 2.6.1.) la cantidad de carnosina que hay en una fracción (84 mL) recogida tras repetidas inyecciones (40 inyecciones) del extracto de carne. La fracción contenía 6 mg de carnosina (mediante recta de calibrado de figura 2) y sabiendo que este dipéptido eluía a una concentración de 0.33 M NaCl (tiempo de retención= 11.9 min), se estimó que la fracción contenía 1.62 g sal aproximadamente. Las mezclas de disolventes que se ensayaron fueron: metanol-agua (75:25 y 50:50) y etanol-agua (75:25 y 50:50), así 5 mL de cada una de estas mezclas, por duplicado, se adicionaron a los 6 mg carnosina y 1.62 g sal, dispuestos en vasos de precipitados previamente tarados. Se agitó para su disolución, se dejó reposar, se retiró el sobrenadante de cada vaso cuidadosamente y se analizó por IC-HPLC, bajo las condiciones del apartado 2.4. El residuo de cada vaso fue secado por estufa a 50°C para ser pesado posteriormente y determinar la cantidad de sal no disuelta. A partir de los resultados, se determinó qué proporción de disolvente permite la mayor recuperación de dipéptidos con una menor disolución de sal.

2.8. Análisis de dipéptidos en diferentes especies animales y productos cárnicos

En base al método de extracción y desproteinización simultánea “AC 1:4” (apartado 2.3.2), se procedió a preparar las muestras de cortes de carne de cerdo: lomo caña (*Longissimus*), lomo cabecero (*Trapezius*) y jamón (*Biceps femoris*); pollo: pechuga (*Pectoralis major*), contramuslo (*Iliotibialis*) y muslo (*Quadriceps femoris*); ternera: aguja (*Trapezius*) y conejo: lomo (*Longissimus*). De igual forma, se analizó muestras de productos cárnicos derivados del cerdo como: jamón “serrano”; lomo curado de cerdo “Duroc” y de cerdo “Ibérico”; salchichón y chorizo. Posteriormente, la cuantificación de balenina, carnosina y anserina presentes en las muestras descritas, se realizó mediante las condiciones de IC-HPLC indicadas en el apartado 2.4. y con las rectas de calibrado de carnosina y anserina calculadas según el apartado 3.1; además, de la recta de calibrado de balenina obtenida tras la preparación de su disolución valorada, conforme al apartado 3.3.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Optimización de la extracción de la muestra

Como se describió en el apartado 2.3, se analizó 5 métodos de preparación de muestra, de los cuales 3 emplearon HCl para la extracción y disolventes orgánicos (acetonitrilo, etanol y metanol absolutos respectivamente) para la desproteinización. Mientras, en los otros 2 métodos, se realizó la extracción y desproteinización simultánea por agua caliente (95±5°C) en agitación, en proporciones muestra- agua 1:4 y 1:10 (p/v) (“AC 1:4” y “AC 1:10”).

Cuando se realizó la desproteínización con etanol, se pudo observar que el extracto obtenido tenía apariencia gelatinosa y no se podía separar tras la centrifugación. En consecuencia, sólo se realizó el análisis de dipéptidos por IC-HPLC a los extractos de los 4 métodos restantes. La elección del mejor método de extracción y desproteínización se basó en la mayor sencillez y rendimiento en la extracción de carnosina y anserina, evaluada por el análisis de dipéptidos mediante IC-HPLC.

Los cromatogramas obtenidos se ilustran en la figura 1, donde se aprecia que la carnosina y la anserina eluyen a tiempos de retención de 11.9 y 12.7 min (a concentraciones de 0.33 y 0.35 M NaCl respectivamente). De igual manera, se puede ver que aparece un tercer pico ("P3"), que eluye a 14.1 min y había sido identificado previamente como balenina (Aristoy *et al.*, 2004), de estructura β -alanil-1-metil-L-histidina. No obstante, otros autores no lo identifican como balenina, sino como homocarnosina (Aldini *et al.*, 2004), de estructura γ -aminobutírico-L-histidina. Por esta razón, hubo que confirmar la identidad de dicho compuesto mediante el análisis de aminoácidos, como se explicará posteriormente.

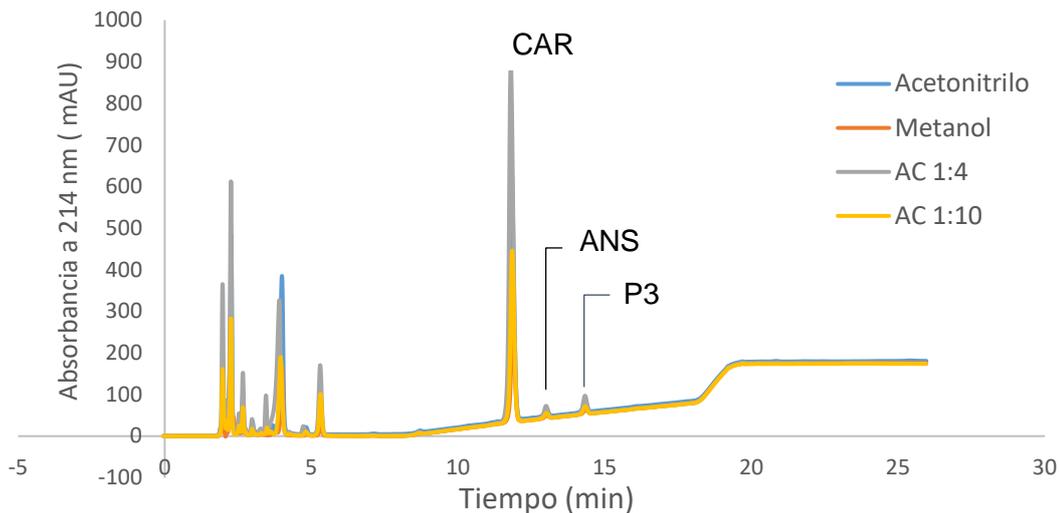


FIGURA 1. Comparación de cromatogramas de los métodos de extracción y desproteínización analizados.

Una vez identificados los dipéptidos de carnosina y anserina, empleando patrones, se utilizó sus respectivas rectas de calibrado (ver figuras 2 y 3) para determinar la concentración de los dipéptidos en los extractos, cuyos resultados se exponen en la tabla 1.

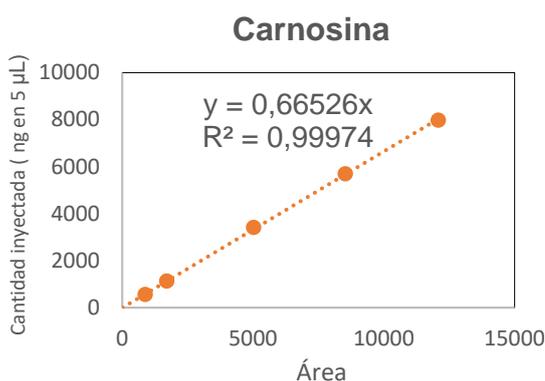


FIGURA 2. Recta de calibrado de patrón de carnosina.

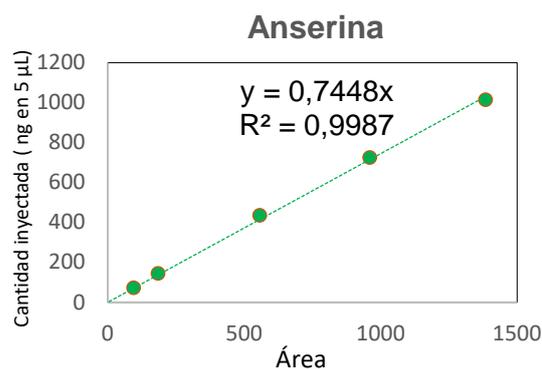


FIGURA 3. Recta de calibrado de patrón de anserina.

TABLA 1. Concentración* de dipéptidos (mg dipéptido/ 100 g muestra húmeda) por método de extracción y desproteinización.

MÉTODO	CARNOSINA		ANSERINA		P3**	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
Acetonitrilo	363.94	7.91	12.91	0.08	20.90	0.69
Metanol	444.37	5.23	17.23	1.63	26.72	0.83
AC 1:4	511.81	3.49	22.00	1.77	29.72	1.62
AC 1:10	478.25	26.95	18.21	0.31	28.88	2.30

(*) Datos calculados de 3 repeticiones.

(**) Valor estimativo. Se empleó la misma recta de calibrado de anserina para calcular la concentración de "P3", debido a que se carece de patrón comercial para el dipéptido en cuestión (balenina u homocarnosina) y lograr la obtención de este patrón es uno de los objetivos de esta investigación.

Se determinó que el mejor método extracción y desproteinización fue el de agua caliente ($95\pm 5^{\circ}\text{C}$) en agitación, proporción muestra-agua 1:4 (p/v) (denominado "AC 1:4"), debido a que permitió obtener las concentraciones más altas de carnosina, anserina y "P3" (511.81 mg, 22.00 y 29.72 mg dipéptido/ 100 g muestra húmeda respectivamente). Ello probablemente se deba, a que la muestra fue menos diluida y sufría menos daños mediante este método. En consecuencia, se eligió este tratamiento para la obtención de la disolución valorada de balenina patrón a partir de lomo caña de cerdo (músculo *Longissimus*).

3.2. Optimización de desalado

Como se indicó en el apartado 2.7, se estudió dos métodos para el desalado del extracto de balenina, por la posibilidad de que su concentración rica en sal (0.39 M NaCl) genere interferencias en los análisis posteriores.

En el primer procedimiento de desalado, se empleó una columna SPE con sorbente HLB, que permitía la elución directa de los dipéptidos del extracto "AC 1:4" y la separación de la sal, confirmándose mediante el análisis por IC-

HPLC y prueba del nitrato de plata respectivamente, tanto a la muestra inicial como al eluido obtenido; y cuyos resultados se presentan en las figuras 4 y 5. Como indicaban Macià *et al.* (2012), la sal sí quedaba retenida en la columna, ya que no se formaba el precipitado blanco, luego de agregar el nitrato de plata al eluido, tras cargar la muestra en la columna. Sin embargo, menos del 50% de los dipéptidos de la muestra se detectaron en el eluido (ver figura 5). Por ello, se estableció que la columna SPE no pudo eluir cuantitativamente los dipéptidos en estudio y se descartó su aplicación posterior en el desalado del extracto de balenina.

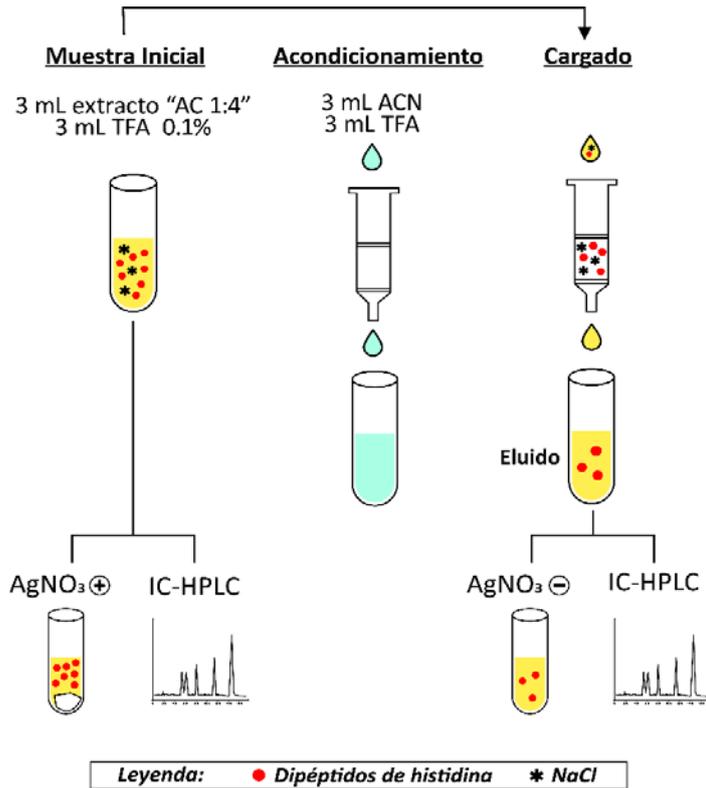


FIGURA 4. Resultados de desalado de con columna SPE.

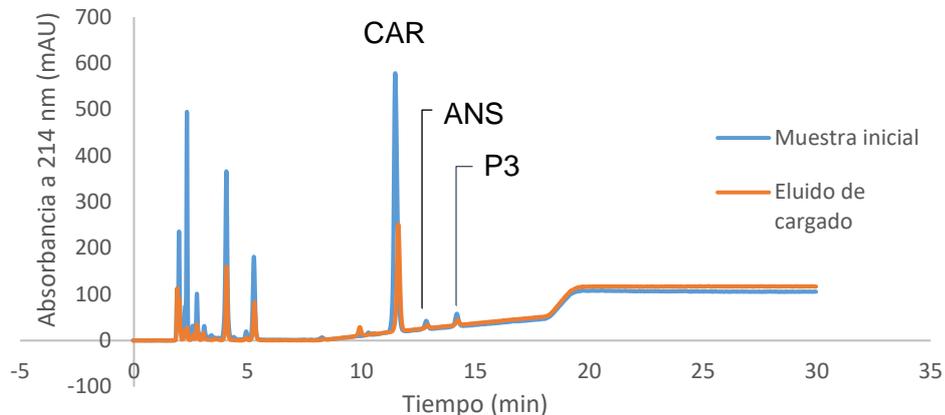


FIGURA 5. Comparación de cromatogramas de muestra inicial y eluido de cargado con columna SPE.

En el segundo procedimiento, se demostró que la mezcla de disolvente que permitía una óptima reducción de sal (88.34%) y la mayor recuperación de carnosina (98.51%) fue la de metanol-agua (75:25), tal como lo evidencian la tabla 2 y la figura 6. Asimismo, este método permitía desalar mayor cantidad de muestra a menor costo que el primero (con columna SPE). Por lo tanto, este procedimiento y esta mezcla de disolvente es la que se utilizó para desalar la disolución aislada de balenina previa hidrólisis (ver apartado 2.6.2).

TABLA 2. Valores* de carnosina recuperada y sal no disuelta con mezclas de disolventes.

Mezcla de disolvente	Peso NaCl no disuelto (g)	%NaCl no disuelto	Concentración carnosina recuperada (mg/mL)	%Carnosina recuperada
Metanol-H ₂ O (75:25)	1.43	88.34	1.18	98.51
Metanol-H ₂ O (50:50)	1.13	69.80	1.18	94.82
Etanol-H ₂ O (75:25)	1.45	90.63	1.17	94.30
Etanol-H ₂ O (50:50)	1.16	71.64	1.22	97.15

(*) Datos calculados de promedio de dos repeticiones

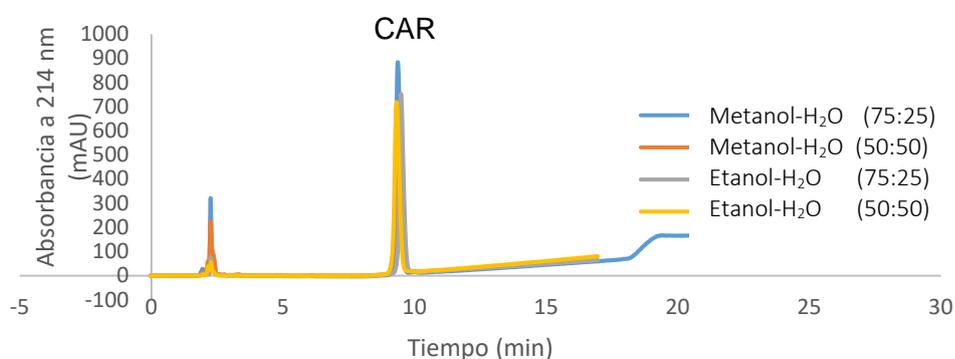


FIGURA 6. Comparación de cromatogramas de mezclas de disolventes.

3.3. Identificación de balenina y valoración de la disolución obtenida

Aldini *et al.* (2004) observaron que el dipéptido homocarnosina (γ -aminobutil-L- histidina), presenta un tiempo de retención cercano al de balenina (β -alanil-1-metil-L-histidina) y lograron la diferenciación de estos mediante la cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS). En la presente investigación, la confirmación de la identidad de la balenina se realizó mediante su aislamiento, hidrólisis y análisis de sus aminoácidos componentes.

El resultado de la hidrólisis del pico “P3” dio β -alanina y 1-metil-L-histidina, aminoácidos componentes de balenina. De igual modo, se estudió los otros dos picos correspondientes a la carnosina y anserina, confirmando su identificación y en ninguno de los picos aislados en los extractos, se detectó γ -aminobutírico, aminoácido característico de homocarnosina.

La valoración de la disolución de balenina se realizó en función a su concentración de β -alanina, ya que son equimolares, como se describió en el apartado 2.6.4. Una vez identificada y cuantificada la β -alanina (ver figura 7), se determinó la concentración de la disolución preparada de balenina en los extractos 1 y 2 (ver tabla 3), obteniéndose que estos presentaban valores de balenina muy similares (29,82 y 28,91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente), lo que señala que el método de extracción/desproteínización aplicado es reproducible.

Una vez cuantificada la balenina en los extractos, se procedió a calcular su factor de respuesta mediante una recta de calibrado (ver figura 8), empleando como disolución patrón al extracto 1 (29.82 μg balenina/mL), teniendo en cuenta 9 niveles de concentración (2.98, 5.96, 8.95, 11.93, 14.91, 17.89, 20.87, 23.86 y 29.82 μg balenina/mL) y siguiendo las condiciones cromatográficas IC-HPLC del apartado 2.4.

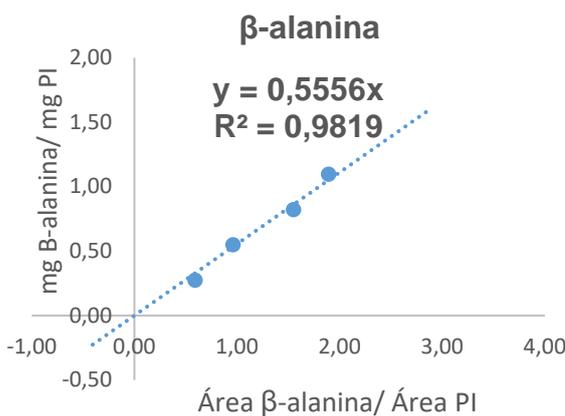


FIGURA 7. Recta de calibrado de β -alanina.

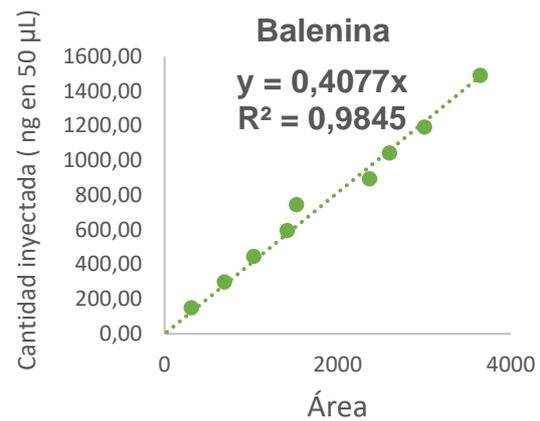


FIGURA 8. Recta de calibrado de balenina.

TABLA 3. Comparación de resultados de determinación de concentración de balenina en los extractos aislados 1 y 2.

Extracto	Peso β -alanina (μg)	μmoles β -alanina	Peso balenina(μg)	Concentración de balenina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SD
1	1.12	0.01	2.98	29.82	0.64
2	1.08	0.01	2.89	28.91	

3.4. Análisis de dipéptidos en diferentes especies animales y productos cárnicos

En la tabla 4, se expone los resultados de cuantificación de balenina, carnosina y anserina (mg/100 g de peso de muestra húmeda) en cortes de carne de diferentes especies animales y productos cárnicos derivados del cerdo (cuyos extractos se obtuvieron en base al apartado 2.8). Para lo cual, se tuvo en cuenta los valores de área de los dipéptidos por análisis IC-HPLC y los factores de respuesta de balenina, carnosina y anserina calculados (ver figuras 8, 2 y 3 respectivamente).

TABLA 4. Concentración* (mg/100 g peso de muestra húmeda) de balenina, carnosina y anserina (expresada como promedio \pm desviación estándar) en cortes de carne de diferentes especies animales y productos cárnicos.

TIPO DE CARNE		BALENINA		CARNOSINA		ANSERINA	
ESPECIE	CORTE	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
Cerdo	Lomo caña (<i>Longissimus</i>)	14.19	3.63	469.01	23.99	13.68	3.15
	Lomo cabecero (<i>Trapezius</i>)	7.03	0.99	288.90	16.13	11.15	0.70
	Jamón (<i>B. femoris</i>)	8.84	0.28	395.99	9.75	15.71	1.70
Pollo	Pechuga (<i>P.major</i>)	3.66	0.23	142.18	0.88	399.59	15.09
	Contramuslo (<i>Iliotibialis</i>)	1.51	0.05	65.25	0.85	201.36	10.19
	Muslo (<i>Q. femoris</i>)	0.96	0.14	55.39	5.46	85.03	0.74
Ternera	Aguja (<i>Trapezius</i>)	0.50	0.14	159.40	4.34	20.27	0.46
Conejo	Lomo (<i>Longissimus</i>)	ND		72.82	8.15	131.69	15.82
TIPO DE PRODUCTO CÁRNICO							
Jamón "serrano"		12.56	1.14	374.20	67.85	24.51	2.81
Lomo curado "Ibérico"		38.86	1.20	777.40	2.29	34.19	0.46
Lomo curado "Duroc"		19.18	1.59	695.28	7.47	29.56	2.86
Salchichón		11.75	1.40	389.00	24.37	17.78	1.91
Chorizo		15.46	1.37	344.12	44.01	19.39	1.75

(*) Datos calculados de 3 repeticiones
ND: No determinado

Como se aprecia en la tabla 6, el tipo y corte de carne que presenta mayor contenido de balenina fue el lomo caña, proveniente del músculo *Longissimus* de cerdo (14.19 mg/ 100 g). Este valor fue inferior al calculado por Aristoy y Toldrá (2004), que fue de 36.5 mg/100 g. Por otro lado, Boldyrev *et al.* (2013) afirmaron que la concentración de balenina en carne de cerdo > pollo> ternera; mientras que, en la carne de conejo, no se detectaba presencia del dipéptido. Este comportamiento se corroboró con los datos obtenidos en esta investigación, donde los contenidos de balenina en esas carnes fueron de: 8.84-14.19 mg/ 100 g (cerdo), 0.96-3.66 mg/ 100 g (pollo) y 0.50 mg/ 100 g (ternera). Asimismo, el lomo de conejo fue el único corte de carne que mostró ausencia del dipéptido.

Mora *et al.* (2007) examinaron el contenido de carnosina en diferentes músculos de cerdo, encontrándose que este valor difiere según el tipo de metabolismo del músculo. En general, los músculos de metabolismo glicolítico como "*Longissimus thoracis*", tienen un mayor contenido de carnosina que los que tienen uno oxidativo. Esto se evidenció en el presente estudio, donde en carne de cerdo analizada, la concentración de carnosina en el músculo *Longissimus* > *Biceps femoris* > *Trapezius* (469.01, 395.99 y 288.90 mg/ 100 g respectivamente). De igual manera, en pollo, el contenido de carnosina en pechuga > contramuslo> muslo (Jung *et al.*, 2013; Aristoy y Toldrá, 2004); tendencia observada en este trabajo, donde las concentraciones del dipéptido en esas muestras fueron de: 142.18, 65.25 y 55.39 mg carnosina/ 100 g correspondientemente.

Por otra parte, el contenido de carnosina es predominante en carnes de cerdo y ternera, mientras es bajo en pollo (Boldyrev *et al.* 2013; Aristoy y Toldrá, 2004). Ello se verificó en esta investigación, debido a que las concentraciones de carnosina en carnes de cerdo (288.90-469.01 mg/ 100 g) y ternera (159.40 mg/ 100 g) fueron muy superiores a la de pollo (55.39-142.18 mg/ 100 g).

La anserina se encuentra en abundancia en pollo, sobre todo en la pechuga (Aristoy *et al.* 2016), pero su contenido es mucho menor en tejidos mamíferos, a excepción del conejo, donde el contenido de ésta casi duplica al de carnosina (Peiretti y Meineri, 2015; Arihara, 2006). Este comportamiento se comprobó con los valores obtenidos en este estudio, donde el dipéptido se halló en mayor cantidad en pechuga de pollo (399.59 mg/ 100 g); mientras, en carnes de cerdo y ternera, en conjunto, sólo se encontraron entre 11.15 y 20.27 mg/100 g. Sin embargo, el valor de anserina en lomo de conejo fue casi dos veces el de carnosina (131.69 mg y 72.82 mg/ 100 g respectivamente).

De igual forma, el lomo curado ibérico fue el producto cárnico con mayor concentración de balenina, carnosina y anserina (38.86, 777.40 y 34.19 mg / 100 g respectivamente). En cambio, el salchichón fue el producto cárnico con menor contenido de balenina y anserina (11.75 y 17.78 mg/ 100 g correspondientemente); y el chorizo, el de menor valor de carnosina (344.12 mg/100 g).

Para estimar lo que sucede con relación a la concentración de los dipéptidos histidina en jamón durante el proceso de curado, se referenció los datos (tabla 6) a peso seco; así, considerando una humedad en la carne fresca de cerdo de 70%, los contenidos de balenina, carnosina y anserina en jamón

fresco serían de 29.47, 1319.97 y 52.37 mg/ 100 g muestra seca respectivamente. Al someter al jamón a 9 meses de curado y humedad final de 58%, los valores de los dipéptidos fueron de 29.90; 890.95 y 58.36 mg/ 100 g muestra seca correspondientemente. Por ende, se consideró que, tras el curado del jamón, hay una disminución de la concentración de carnosina, mientras que la anserina y balenina no se vieron aparentemente afectadas. Aristoy *et al.* (2016), afirmaron que el curado puede generar una ligera hidrólisis de carnosina a sus aminoácidos componentes y una parcial conversión de carnosina a anserina por metilación.

4. CONCLUSIONES

Se optimizó un método de determinación de balenina, carnosina y anserina en muestras cárnicas mediante la cromatografía líquida de alta resolución por intercambio catiónico (IC-HPLC). El método de preparación de muestra que permitía la mayor recuperación de los dipéptidos fue el de extracción y desproteización por agua caliente ($95\pm 5^{\circ}\text{C}$) en agitación, proporción muestra- agua 1:4 (p/v).

El aislamiento de balenina por IC-HPLC, secado de la fracción y redisolución empleando metanol-agua (75:25) permitió obtener una disolución de balenina enriquecida en el dipéptido y con baja concentración de sal.

La valoración de la disolución de balenina obtenida posibilitó su análisis en cortes de carne de diferentes especies animales y productos cárnicos derivados del cerdo.

El lomo caña (*Longissimus*) de cerdo presentó la mayor concentración de balenina y carnosina; la pechuga de pollo, el más alto contenido de anserina; y el lomo curado ibérico fue el producto cárnico con mayor concentración de balenina, carnosina y anserina. Además, se estimó que la concentración de carnosina disminuyó durante el proceso de curado del jamón, mientras los valores de anserina y balenina no mostraron cambios aparentes.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la Virgen de la Puerta por su guía constante. A mi familia, por su amor incondicional. Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España, por la beca otorgada para estudiar el máster; y a la Universidad Politécnica de Valencia, por los conocimientos impartidos. A los miembros del Grupo de Bioquímica, Tecnología e Innovación de la Carne y Productos Cárnicos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), por permitirme realizar el presente trabajo en sus instalaciones y por su continua orientación.

6. REFERENCIAS

- Aldini, G.; Orioli, M.; Carini, M.; Maffei Facino, R. 2004. Profiling histidine-containing dipeptides in rat tissues by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **39(12)**: 1417-1428.
- Arihara, K. 2006. Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, **74(1)**: 219-229.
- Aristoy, M. C. y Toldrá, F. 2004. Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Science*, **67(2)**: 211-217.
- Aristoy, M. C.; Mora, L.; Toldrá, F. 2016. Histidine-containing dipeptides: Properties and occurrence in foods. *Encyclopedia of Food and Health*, 338-342.
- Aristoy, M. C.; Soler, C.; Toldrá, F. 2004. A simple, fast and reliable methodology for the analysis of histidine dipeptides as markers of the presence of animal origin proteins in feeds for ruminants. *Food Chemistry*, **84(3)**: 485-491.
- Boldyrev, A. A., Aldini, G., & Derave, W. 2013. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological reviews*, **93(4)**: 1803-1845.
- Chen, Y. y Ho, C. T. 2002. Effects of carnosine on volatile generation from Maillard reaction of ribose and cysteine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50(8)**: 2372-2376.
- Ferraro, V.; Cruz, I. B.; Jorge, R. F.; Pintado, M. E.; Castro, P. M. 2011. Solvent extraction of sodium chloride from codfish (*Gadus morhua*) salting processing wastewater. *Desalination*, **281**: 42-48.
- Jung, S.; Bae, Y. S.; Kim, H. J.; Jayasena, D. D.; Lee, J. H.; Park, H. B.; Heo, K.N.; Jo, C. 2013. Carnosine, anserine, creatine, and inosine 5'-monophosphate contents in breast and thigh meats from 5 lines of Korean native chicken. *Poultry Science*, **92(12)**: 3275-3282.
- Leinsoo, T. A.; Abe, H.; Boldyrev, A. A. 2006. Carnosine and related compounds protect the double-chain DNA from oxidative damages. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **42(5)**: 570-574.
- Macià, A.; Motilva, M. J.; Romero, M. P.; Labrador, A.; Domínguez, A.; Peiro, L. 2012. Improved liquid-chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of the bioactive dipeptides, carnosine and anserine: Application to analysis in chicken broth. *Talanta*, **93**: 293-300.
- Marušić, N.; Aristoy, M. C.; Toldrá, F. 2013. Nutritional pork meat compounds as affected by ham dry-curing. *Meat Science*, **93(1)**: 53-60.
- Mateescu, R. G.; Garmyn, A. J.; O'Neil, M. A.; Tait Jr, R. G.; Abuzaid, A.; Mayes, M. S.; Garrick, D. J.; Van Eenennaam, A. L.; Van Overbeke, D. L.; Hilton, G. G.; Beitz, D. C. 2012. Genetic parameters for carnitine, creatine, creatinine, carnosine, and anserine concentration in longissimus muscle and their association with palatability traits in *Angus* cattle. *Journal of Animal Science*, **90(12)**: 4248-4255.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio ambiente, Gobierno de España. *Informe del consumo de alimentación en España 2017*, [en línea]. Madrid: Julio de 2018. Dirección URL: <<http://www.mapama.gob.es>>. [Consulta: 01 Sep. 2018].
- Mora, L. 2010. Determinación de compuestos bioquímicos para el control de calidad en la elaboración de jamón cocido y jamón "serrano". Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Mora, L.; Sentandreu, M. A.; Toldrá, F. 2007. Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55(12)**: 4664-4669.

- Nardiello, D. y Cataldi, T. R. 2004. Determination of carnosine in feed and meat by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, **1035(2)**: 285-289.
- Peiretti, P. G. y Meineri, G. 2015. Carnosine and its homologs in foods. En: Preedy, V.R. (ed). *Imidazole Dipeptides*. The Royal Society of Chemistry, Reino Unido, 23-39.
- Peiretti, P. G.; Medana, C.; Visentin, S.; Giancotti, V.; Zunino, V.; Meineri, G. 2011. Determination of carnosine, anserine, homocarnosine, pentosidine and thiobarbituric acid reactive substances contents in meat from different animal species. *Food Chemistry*, **126(4)**: 1939-1947.
- Pereira-Lima, C. I.; Ordoñez, J. A.; De Fernando, G. D. G.; Cambero, M. I. 2000. Influence of heat treatment on carnosine, anserine and free amino acid composition of beef broth and its role in flavour development. *European Food Research and Technology*, **210(3)**: 165-172.
- Pérez-Palacios, T.; Ruiz, J.; Barat, J. M.; Aristoy, M. C.; Antequera, T. 2010. Influence of pre-cure freezing of Iberian ham on proteolytic changes throughout the ripening process. *Meat Science*, **85(1)**: 121-126.
- Sauerhöfer, S.; Yuan, G.; Braun, G. S.; Deinzer, M.; Neumaier, M.; Gretz, N.; Floege, J.; Kriz, W.; Van der Woude, F.; Moeller, M. J. 2007. L-carnosine, a substrate of carnosinase-1, influences glucose metabolism. *Diabetes*, **56(10)**: 2425-2432.
- Schönherr, J. 2002. Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine and related dipeptides by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50(7)**: 1945-1950.
- Song, B. C.; Joo, N. S.; Aldini, G.; Yeum, K. J. 2014. Biological functions of histidine-dipeptides and metabolic syndrome. *Nutrition Research and Practice*, **8(1)**: 3-10.
- Toldrá, F. 2010. Compuestos bioactivos de la carne de cerdo. *Alimentación, Nutrición y Salud*, **17(1)**: 9-17.