



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

**EFFECTO DEL ESTRÉS ANTEMORTEM EN LA
CALIDAD Y VIDA DE ANAQUEL DE LA CARNE DE
CONEJO**

VERÓNICA RESÉNDIZ CRUZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

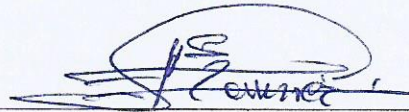
2016

La presente tesis titulada “Efecto del estrés *antemortem* en la calidad y vida de anaquel de la carne de conejo”, realizada por la alumna **Verónica Reséndiz Cruz**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

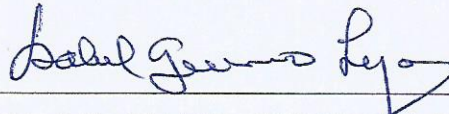
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



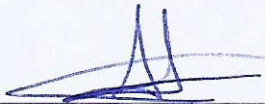
DR. J. EFRÉN RAMIREZ BRIBIESCA

ASESOR



DRA. MA. ISABEL GUERRERO LEGARRETA

ASESOR



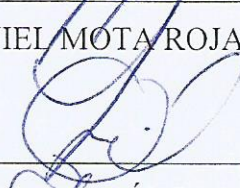
DRA. ROSY GABRIELA CRUZ MONTERROSA

ASESOR



DR. DANIEL MOTA ROJAS

ASESOR



DR. DAVID HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio, 2016.

RESUMEN GENERAL

EFFECTO DEL ESTRÉS ANTEMORTEM EN LA CALIDAD Y VIDA DE ANAQUEL DE LA CARNE DE CONEJO

Verónica Reséndiz Cruz, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2016

El estudio se dividió en dos fases 1) Evaluación del estrés en conejos por transporte y por vibración en una plataforma fija, sobre los parámetros bioquímicos en sangre y fisicoquímicos en carne. 2) Evaluar el tiempo de vida útil (0, 7, 14 y 21 días) de la carne a 4 °C con tres tipos de empaques (testigo (T), semipermeable (SP) y vacío (V)) a través de la concentración de aminas biogénicas (AB) (putrescina (PU), cadaverina (CA) e histamina (HI)) y conteo microbiológico. Se utilizaron 160 conejos de la raza Nueva Zelanda, con 2 meses de edad y un peso promedio de 2.35 kg. En la primera etapa, los animales se estresaron por transporte vehicular y con la simulación de movimientos en plataforma fija. Se hicieron cinco tratamientos: testigo (sin estrés), estrés con transporte corto (30 min), estrés con transporte largo (60 min), estrés con plataforma de vibración corto (30 min), y estrés con plataforma de vibración largo (60 minutos). Se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2 x 2, comparando las medias de los tratamientos con la prueba de contrastes ortogonales y la prueba de Tukey. En la segunda etapa, el color, pH, concentración de aminas biogénicas y la carga microbiana (enterobacterias y mesófilos aerobios) se analizaron con el procedimiento PROC MIXED y la comparación de medias se llevó a cabo con PDIFF (SAS, 9.3). El estrés afectó las variables bioquímicas ($P < 0.05$) de los conejos en ambos tipos de transporte. El transporte, disminuyó el potasio hemático en ambos sexos (< 5.2 mmol/L). La concentración de glucosa y lactato incrementaron ($P < 0.05$) en los conejos transportados (> 219

y >61 mg/dL, respectivamente). La PCO₂ en los machos disminuyó (P<0.05) <7.5 mmHG en los tratamientos con estrés vs sin estrés. La glucosa incrementó (P<0.01) 55.5 mg/dL para hembras y 44.0 mg/dL para machos. En la segunda fase, el empaque T causó diferencias (P<0.05) en el pH, cuando se comparó el día 0, 7 y 14 vs. 21 días. La luminosidad (L*) disminuyó (P<0.05) en los días de conservación. Los valores de a* y b* incrementaron (P<0.05) con el tiempo de conservación en los empaques. La concentración de PU aumentó a los 14 d de almacenamiento, y fue mayor en el empaque SP. La concentración de CA fue mayor (P<0.05) en el empaque V y la HI en el empaque T. El conteo de las enterobacterias al día 14 de refrigeración fue mayor (P<0.05) en el empaque SP y menor en el V. El conteo de los mesófilos aerobios incrementó (P<0.05) los a 14 d en el grupos T vs. empaque V. En conclusión, la concentración de AB fue mayor en el día 21 de almacenamiento. La cantidad de enterobacterias no se alteró por el tiempo de conservación. Los mesófilos aerobios incrementaron al final del periodo de la evaluación.

Palabras clave: conejos, estrés, parámetros sanguíneos, aminas biogénicas en carne, carga microbiana.

GENERAL ABSTRACT

ANTE MORTEM OF STRESS EFFECT ON THE QUALITY AND SHELF LIFE OF RABBIT MEAT

Verónica Reséndiz Cruz, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2016

The study was divided into two phases 1) evaluate the effect of transport stress and vibration on a fixed platform, rabbits, on the response of biochemical parameters in blood and flesh physiochemical. 2) shelf life time evaluate (0, 7, 14 and 21 days) of meat at 4 ° C with 3 types of packaging (witness (T), semipermeable (SP) and vacuum (V)) through the concentration was evaluated biogenic amine (AB) (putrescine (PU), cadaverine (CA) and histamine (HI)) and microbiological count. 160 rabbits of New Zealand race were used, with 2 months of age and an average weight of 2.35 kg. In the first stage, the animals were stressed by vehicular transportation and the motion simulation fixed platform. Five treatments were: witness (no stress), short stress transport (30 min), stress transported long (60 min), stress platform short vibration (30 min), and stress platform long vibration (60 min). The experimental design was completely randomized factorial arrangement 3 x 2 x 2, comparing the statistical differences with orthogonal contrasts test and Tukey test. In the second stage, color, pH, concentration of biogenic amines and microbial load (enterobacteriaceae and aerobic mesophilic bacteria) were analyzed using PROC MIXED process and means comparison It was carried out PDIFF (SAS 9.3). Results: Stress affected biochemical variables (P <0.05) of the rabbits in both groups of transport. Transportation, potassium decreased blood counts in both sexes (<5.2 mmol / L). The concentration of glucose and lactate increased transported rabbits (> 219 and > 61 mg / dL, respectively). PCO2 decreased

in males <7.5 mm Hg *vs.* stress treatments without stress. Increased glucose 55.5 mg / dL for females and 44.0 mg / dL for males ($P < 0.01$). In the second phase, packaging T cause significant differences ($p < 0.05$) in pH, when compared on day 0, 7 and 14 *vs.* 21 days. Luminosity (L) decreased ($p < 0.05$) in the days of conservation. The a^* and b^* increased with storage time in the packages. PU concentration increased storage 14d was greater in SP packaging. The concentration of CA was higher in the packaging V and on the package T. HI counting Enterobacteriaceae to 14d cooling was higher in the SP and the lower packing V. The count of aerobic mesophilic increased to 14d in the groups T *vs.* packaging V. In conclusion, the concentration of AB was higher 21 d of storage. The amount of enterobacteriaceae not altered by the shelf. They increased aerobic mesophilic at the end of the evaluation period.

Keywords: rabbits, stress, blood parameters, biogenic amines in meat, microbial load.

DEDICATORIA

A mi madre **Virginia Cruz Oidor**, por la vida, el amor y el apoyo de manera incondicional a lo largo de mi existencia.

A mis hijas, **Hyadi Estefanía y Diana Paola** por ser las niñas más comprensivas y pacientes para poder concluir este logro más de mi vida.

A mi esposo **Pablo Vázquez Baxcajay** por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A mi sobrina **Patricia Nayeli** por su ayuda incondicional para la culminación de esta tesis.

A mis hermanas, hermanos y cuñados por el apoyo y cariño que siempre me han mostrado, sobre todo en los momentos más difíciles.

Y a los amigos y compañeros que siempre estuvieron dispuestos a apoyarme.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**-México, por la beca otorgada para realizar los estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados, por financiar parcialmente esta investigación y brindarme la oportunidad de seguir preparándome profesionalmente.

Al Fideicomiso No. 167304 y la Línea 7 (Inocuidad, calidad de alimentos y bioseguridad), del Colegio de Postgraduados, por financiar parcialmente esta investigación

Al Laboratorio de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de México FES Cuautitlán, por el apoyo brindado para realizar la presente investigación.

A todos los Doctores del programa de Ganadería del **Colegio de Postgraduados** por su experiencia transmitida para mi formación académica.

A los miembros del Consejo Particular, Dr. Efrén Ramírez Bribiesca, Dra. María Isabel Guerrero Legarreta, Dra. Rosy Gabriela Cruz Monterrosa, Dr. Daniel Mota Rojas y Dr. David Hernández Sánchez, por su colaboración, dedicación y sugerencias para la realización de esta investigación y sobre todo por la confianza que depositaron en mí.

A la Dra. Rosy Gabriela Cruz Monterrosa y el M.C. Rubén, por el gran apoyo que me brindaron en la fase de laboratorio de la investigación.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de esta tesis.

CONTENIDO

RESUMEN GENERAL.....	ii
GENERAL ABSTRACT ANTE MORTEM OF STRESS EFFECT ON THE QUALITY AND SHELF LIFE OF RABBIT MEAT	iv
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Literatura citada	3
CAPÍTULO I	5
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Implications.....	8
Introduction.....	9
Material and Methods	11
Results.....	16
Discussion	26
Literatura citada	31
CAPÍTULO II	36
Resumen.....	37
Implicaciones	39
Abstract.....	40
Introducción	42
Materiales y métodos	44
Resultados	49
Conclusiones.....	63
Literatura Citada	64
Conclusiones generales.....	69

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO I

Tabla 1. Values of hematological variables of rabbit in females in relation to type of stress.....	17
Tabla 2. Values of hematological variables of rabbit in males in relation to type of stress.....	18
Tabla 3. Effects of stress on production parameters measurements from the rabbits	22

CAPÍTULO II

Cuadro 1. Efecto del tiempo de almacenamiento y de los tipos de empaque en el pH y color de la carne de conejo	51
Cuadro 2. Efecto del tiempo de almacenamiento y de los tipos de empaque en el contenido de aminas biogénicas (mg/kg) y conteo microbiano (Log ufc/g).....	53

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Fig. 1. Effect of transportation vs. vibration stress on levels PCO₂ in different treatments.....19

Fig. 2. Effect of transportation vs. vibration stress on glucose levels in different treatments.....21

CAPÍTULO II

Figura 1. Concentración de aminos biogénicas en carne de conejo en el empaque testigo. 55

Figura 2. Concentración de aminos biogénicas en carne de conejo en el empaque semipermeable..... 55

Figura 3. Concentración de aminos biogénicas en carne de conejo en el empaque al vacío. 56

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las granjas ganaderas por lo general, se encuentran ubicadas en puntos distantes a los establecimientos para el sacrificio de los animales, e implica la necesidad de transportarlos para realizar esta actividad; proceso mediante el cual experimentan situaciones como la manipulación, confinamiento y contacto con el hombre, provocándoles estrés y con ello diferencias en su comportamiento (Fisher *et al.*, 2010). Por lo que el organismo del animal activa los mecanismos fisiológicos para estabilizar las alteraciones hemodinámicas que se presentan, como temperatura, frecuencia respiratoria, nivel energético, concentración de la hemoglobina y el hematocrito (Tadich *et al.*, 2009; Becerril *et al.*, 2010; Mota-Rojas *et al.*, 2012). Estas alteraciones influyen en los parámetros fisicoquímicos de la carne. En bovinos, ovinos y cerdos el efecto que tiene el estrés sobre la calidad de la carne está documentado (Pérez *et al.*, 2002; Villarroel *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2012; Schwartzkopf *et al.*, 2012).

Además la carne es uno de los alimentos más perecederos debido a su alto contenido de agua y nutrientes disponibles; esto es atribuido al crecimiento de microorganismos que producen alteraciones en el olor, color y sabor cuando no existen las condiciones idóneas de conservación. Estas alteraciones se relacionan con la utilización de azúcares y aminoácidos libres en la carne, por microorganismos oportunistas. La carga bacteriana igual o mayor a 10^7 UFC cm^2 propicia mal olor, pero cuando incrementa a 10^9 UFC cm^2 , el olor es pútrido, ocasionado por la descarboxilación de algunos aminoácidos específicos libre (Ercolini *et al.*, 2006) produciéndose la formación y acumulación de aminas biogénicas (AB); estas son bases orgánicas de bajo peso molecular caracterizado por la presencia de un grupo amino adicional al alfa-amino original del aminoácido (Tamim y Doerr, 2003; Aquiles *et al.*, 2015). La identificación de las AB indica una actividad

microbiana en la carne, deteriorando su valor nutritivo (Kaniou *et al.*, 2001; Vinci y Antonella, 2002; Galgano *et al.*, 2009; Aquiles *et al.*, 2015). La ingesta de AB causa dolor de cabeza, hipertensión, fiebre y trastorno cardíaco en el consumidor (Min *et al.*, 2007). Por lo anterior, es importante aplicar métodos de conservación como los empaques, para asegurar un producto inocuo durante la comercialización (Charles *et al.*, 2006).

Sin embargo, la información científica disponible, relacionada con el efecto del estrés en los parámetros sanguíneos de los del conejo y la calidad de la carne es escasa (Liste *et al.*, 2004; Lambertini *et al.*, 2006; María *et al.*, 2006). Así mismo, no se cuenta con información en carne de conejo, relacionado con el efecto que tiene el empaque en la producción de aminas biogénicas, en comparación con productos cárnicos en otras especies animales como los bovinos, ovinos, aves y cerdos (Pérez *et al.*, 2002; Villarroel *et al.*, 2003; Galgano *et al.*, 2009; Schwartzkopf *et al.*, 2012).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del estrés en las alteraciones de los componentes sanguíneos y su repercusión en algunas características fisicoquímicas de la carne de conejo; así como el efecto del tiempo de conservación en la concentración de aminas biogénicas y carga microbiana en carne empacada con diferentes tipos de empaques.

Literatura citada

Aquiles, L. C., Conte, J. C. A., Canto, C. A., Guerra, M. M. L., Costa, L. B., Gomes, C. A., Teixeira, M. E., Maia, F. R. 2015. Biogenic amines as bacterial quality indicators in different poultry meat species. *LWT - Food Science and Technology* 60, 15-21.

Becerril- Herrera, M., Alonso, S. M., Trujillo, O. M. E., Guerrero, L. I., Ramírez, N. R., Roldan, S. P., Pérez, S. M., Soní, G. E., & Mota-Rojas, D. (2010). Changes in blood constituents of swine transported for 8 or 16 h to an Abattoir. *Meat Science* 86, 945-948.

Charles, N., Williams, S. K., Rodrick, G. E. 2006. Effects of Packaging Systems on the Natural Microflora and Acceptability of Chicken Breast Meat. *Poultry Science* 85, 1798-1801.

Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., Villani, F. 2006. Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (7), 4663-467.

Fisher, A. D., Colditz, I. G., Lee, C., & Ferguson, D. M. (2009). The influence of land transport on animal welfare in extensive farming systems. *Journal of Veterinary Behavior* 4, 157-162.

Galgano, F., Favati, F., Bonadio, M., Lorusso, V., Romano, P. 2009. Role of biogenic amines as index of freshness in beef meat packed with different biopolymeric materials. *Food Research International* 42, 1147-1152.

Kaniou, I., Samouris, G., Mouratidou, T., Eleftheriadou, A., Zantopoulos, N. 2001. Determination of biogenic amines in fresh unpacked and vacuum-packed beef during storage at 4° C. *Food Chemistry* 74, 515-519.

Lambertini, L., Vignola, G., Badiani, A., Zaghini, G., & Gormigoni, A. (2006). The effect of journey time and stocking density during transport on carcass and meat quality in rabbits. *Meat Science* 72, 641-646.

Liste, G., María, G.A., Villarroel, M., López, M., Olleta, J.L., Sañudo, C., & Buil, T. (2004). Efecto del transporte sobre la calidad de la carne y el bienestar animal en conejos comerciales durante la estación calida en Aragón. XXIX Symposium de Cunicultura de ASESCU. Universidad de Zaragoza, España.

María, G. A., Buil, T., Liste, G., Villarroel, M., Sañudo, C., & Olleta, J. L. (2006). Effects of transport time and season on aspects of rabbit meat quality. *Meat Science* 72, 773-777.

Min, J. S., Lee, S. A., Jang, A., Jo, C., Lee, M. 2007. Irradiation and organic acid treatment for microbial control and the production of biogenic amines in beef and pork. *Food Chemistry* 104, 791-799.

Mota-Rojas D., Becerril, H. M., Roldan, S. P., Alonso, S. M., Flores, P. S., Ramírez, N. R., Ramírez, T. J. A., Mora, M. P., Pérez, M., Molina, E., Soni, E., & Trujillo, O. M. E. (2012). Effects of long distance transportation and CO₂ stunning on critical blood values in pigs. *Meat Science* 90, 893-898.

Pérez M. P., Palacio, J., Santolaria, M. P., Aceña, M.C., Chacon, G., Gascón, M., Calvo, J. H., Zaragoza, P., Beltran, J. A., & García-Belenguer. (2002). Effect of transport time on welfare and meat quality in pigs. *Meat Science* 61, 425-433.

Schwartzkopf-Genswein, K. S., Faucitano, L., Dadgar, S., Shand, P., González, L. A., & Crowe, T. G. (2012). Road transport of cattle, swine and poultry in North America and its impact on animal welfare, carcass and meat quality: A review. *Meat Science* 92, 227-243.

Tadich, N., Gallo, C., Brito, M. L., & Broom, D. M. (2009). Effects of weaning and 48 h transport by road and ferry on some blood indicators of welfare in lambs. *Livestock Science* 121, 132-136.

Tamin, N. M., Doerr, J. A. 2003. Effect of Putrefaction of Poultry Carcasses Prior to Rendering on Biogenic Amine Production. *Poultry Science* 12, 456-460.

Villarroel, M., María, G. A., Sañudo, C., Olleta, J. L., & Gebresenbet, G. (2003). Effect of transport time on sensorial aspects of beef meat quality. *Meat Science* 63, 353-357.

Vinci, G., Antonelli, M. L. 2002. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. *Food Control* 13, 519-524.

CAPÍTULO I

EFECTO DEL ESTRÉS EN LAS RESPUESTA HEMATOLOGICAS Y PARÁMETROS FISICOQUIMICOS DEL MÚSCULO-CARNE EN CONEJOS.

**THE EFFECT OF STRESS ON HEMATOLOGIC RESPONSE AND PHYSICOCHEMICAL
PARAMETERS OF MUSCLE-MEAT IN RABBITS.**

CAPÍTULO I

EFECTO DEL ESTRÉS EN LAS RESPUESTA HEMATOLOGICAS Y PARÁMETROS FISICOQUIMICOS DEL MÚSCULO-CARNE EN CONEJOS.

Verónica Reséndiz Cruz, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2016.

Resumen

Se estudió el efecto del estrés en las características fisiológicas, producción y calidad de la carne de conejos. Doscientos conejos divididos en una proporción similar de hembras y machos, fueron estresados por transporte y con simulación de movimientos, usando una plataforma de vibración. Se agruparon en cinco grupos: testigo (sin estrés), estrés con trasporte corto (30 min), estrés con transportados largo (60 min), estrés con plataforma de vibración corto (30 min), y estrés con plataforma de vibración largo (60 min). Como resultado, el transporte causó una disminución de potasio hemático en ambos sexos (<5.2 mmol/L). La concentración de glucosa y lactato incrementaron en los conejos transportados (>219 y >61 mg/dL, respectivamente). Considerando la diferencia entre los sexos, la PCO₂ en los machos disminuyó <8.5 mmHG en los tratamientos con estrés vs. sin estrés. La comparación del control vs. estresados incrementó la glucosa en 55.5 mg/dL en hembras y 44.0 mg/dL en machos ($P < 0.01$). Las variables de comportamiento productivo no fueron afectadas ($P > 0.05$) por el efecto del estrés *antemortem*. Tampoco se observaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) en las variables de calidad del músculo-carne. Solamente la capacidad de retención de agua fue diferente ($P < 0.05$), siendo mayor en los animales transportados. Se concluye que los conejos inducidos al estrés por transporte incrementaron notoriamente los metabolitos energéticos en el tejido sanguíneo. Este incremento, no afectó los parámetros productivos y la calidad del músculo-carne.

Palabras clave: conejos; inducción de estrés; respuestas hematológicas; parámetros de producción; calidad de músculo-carne.

CHAPTER I
THE EFFECT OF STRESS ON HEMATOLOGIC RESPONSE AND
PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS OF MUSCLE-MEAT IN RABBITS.

Verónica Reséndiz Cruz, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2016.

Abstract

The ante-mortem study of stress in rabbits are few and can potentially impact the hematologic response and physicochemical parameters of Muscle-Meat. The aim of the study was to investigate the induction of stress by transport and simulation at two different times. Two hundred rabbits divided in a similar proportion of male and female, were stressed by vehicular transportation and with motion simulation, using a vibration platform. They were grouped into five groups: witness (without stress), Stress with Short Transportation (30 min), Stress with Long Transportation (60 min), Stress with Short Vibration Platform (30 min) and Stress with Long Vibration Platform (60 min). As a result, transportation caused a decrease in the hematic potassium in both sexes (<5.2 mmol/L). The glucose and lactate concentration increased in the transported rabbits (> 219 and > 61 mg/dL, respectively). Considering the differences between sexes showed that the $p\text{CO}_2$ in males decreased <8.5 mm Hg in stress groups vs. without stress group. Differences between control vs. stressed increased glucose by 55.5 mg/dL in females and 44.0 mg/dL in males ($P<0.01$). Productive behavior variables were not affected ($P> 0.05$) for the effect of stress *antemortem*. Nor statistical difference ($P>0.05$) were observed in the quality variables of muscle-meat. Only the water retention capacity was statistically different ($P <00.5$) was higher in transported animals. We concluded that rabbits induced stress by transport increased the energetic metabolites in the blood tissue. This increase did not affect the production parameters and the quality of muscle-meat.

Keywords: rabbits; induced stress; response hematologic; production parameters; quality muscle-meat.

Implications

Ante-mortem stress strongly influences in physiological and metabolic alterations in domestic animals, consequently the overall quality of the meat is altered. A study was designed to investigate the effect of vehicular transportation and with motion simulation (using a vibration platform) in physiological stress. Results of this experiment reveal that transportation by 60 minutes in rabbits before slaughter produces a significant increase in energetic metabolites in the blood tissue. We recommend in particular that times of transportation to slaughterhouse should be considered carefully by farmers and Latin government norms to maintain good implications for rabbits welfare.

Introduction

Maintaining high standards of farm animal's welfare during transportation, lairage, and slaughter, requires appropriate equipment and supervision of employees (Becerril-Herrera *et al.*, 2009ab; Mota-Rojas *et al.*, 2014). Rabbits are one of the most sensitive domestic animals to stress inductions (Liste *et al.*, 2009). *Antemortem* transportation of rabbits from farm to trail alters behavioral and physiological variables of the organism presenting signs of fear, anxiety, fasting, dehydration and injuries on the body (Buil *et al.*, 2004). This behavior ranges from mild to severe, largely depending on the number of rabbits introduced in the boarding cages, environmental variables, noise, and speed as well as the maneuvering of the vehicle. While undergoing stress induced by transportation, the organism of animals tries to activate physiological mechanisms to stabilize these hemodynamic changes. In recent years, analysis of physio-metabolic profiles have been used to assess the degree and impact of transport-induced stress and the lairage period, prior to slaughter in other species (Mota-Rojas *et al.*, 2009, 2011; Becerril-Herrera *et al.*, 2009ab, 2010; Uetake *et al.*, 2011). Some of the physiological constants that have alterations as a result of the stress produced by transportation in domestic animals are temperature, respiratory rate, energy level, hemoglobin and hematocrit concentrations (Tadich *et al.*, 2009; Becerril-Herrera *et al.*, 2010; Mota-Rojas *et al.*, 2012).

The response of physiological mechanisms during transport, as described above, can influence meat physicochemical parameters. In cattle, sheep and pigs, the effect of stress on meat quality is documented (Miranda *et al.*, 2012; Schwarzkopf *et al.*, 2012). Conversely, information is limited in rabbits (Lambertini *et al.*, 2006; María *et al.*, 2006), because it is one of the least studied species worldwide. The aim of this study is to evaluate the changes in metabolites, blood gases and

electrolytes. Physicochemical parameters related to immediate response to stress in the muscle-meat of rabbits were studied, Stress was previously induced by truck transport and movement simulations of two intensities, low (30 min) and high (60 min).

Material and Methods

The study was conducted with the approval and guidelines of the Colegio de Postgraduados and followed the principles and specific guidelines implemented by the Mexican Government.

Location

The trial was carried out in an intensive rabbit experimental farm of the Agricultural high school, Autonomous University of Chapingo, in Mexico State. This University is located at latitude 19°29' North, and at longitude 98°54' West, at 2240 masl; the climate is temperate, subhumid with summer rainfall, and the average ambient temperature during all experiment was 15 °C.

Animals and distribution of the groups

Two hundred New Zealand rabbits were selected two days before the experiment was started. All the animals were two months old, and were grouped into 80 males, average weight of $2.35 \pm .241$ kg, and 80 females, average weight of $2.44 \pm .314$ kg. The animals were fattened with commercial pelleted food containing 12% moisture, 10% ash, 16% fiber, 16% protein and 3% fat. The rabbits were housed in flat-deck cages of 88 cm x 48 cm x 45 cm equipped with a nipple drinker and hopper feeder in each cage. The shed was well ventilated with 32 m long x 10 m wide, had cemented floors, fences 1.30 m high, cyclone wire 90 cm high and a roof made of galvanized sheets with polyurethane insulation with 1 inch of spraying. Room temperature was 18°C throughout the experiment.

Truck transportation, use of a vibration platform and slaughtering were performed for six consecutive days. Each group selected per day fasted for 12 h. All rabbits were randomly distributed to five groups with four replicates of five rabbits per cage (20 males and 20 females rabbits per group), as follows:

T: Without Stress, Witness Group: The rabbits in this group, were removed from the cages immediately, and fattened through a window that connects the production hall with the rabbit slaughterhouse. The withdrawal time for slaughter was carried out in less than 1 min.

SST: Stress with Short Transportation (30 minutes) and **SLT:** Stress with Long Transportation (60 minutes): In these groups, each animals group were introduced to mobile plastic cages, and they were placed on the rear platform of a truck during the travel time of 30 or 60 minutes, depending on the group. A Nissan pickup was used and driven at a speed of 70 km/h, in a circuit of dirt roads (unpaved roads) of 1.6 km in diameter, located 100 m away from the rabbit production unit. The topography of the road is consistent with the characteristics of Class "E" roads, According to Department of Agriculture, Livestock, Fisheries, Alimentation and Rural Development of Mexico (SAGARPA, 2012). This means that it has a maximum transverse slope of 13%, allows an average maximum speed of 30 km/h, has vertical curves at 4m /%, to an over-elevation maximum of 10%, and a maximum crown width of 4 m.

SSVP: Stress with Short Vibration Platform (30 minutes) and **SLVP:** Stress with Long Vibration Platform (60 minutes): A vibration platform Bio-Compact Pro-form was used with an area of 70cm x 57cm x 27cm. Acceleration movements were programmed at a frequency of 60 Hertz during 30 and 60 minutes depending on the group.

Slaughtering conditions

Slaughtering took place in an abattoir specialized for rabbits 4m wide x 5m long and a height of 5m). Complying with the Official Mexican Standard NOM-033-ZOO-1995, it was divided into two parts: a) Stunning by through whiplash b) exsanguination by cutting the jugular vein in less than 30 sec after desensitization. During stunning body temperature of each animal was recorded, using an ear thermometer (ThermoScan Braun, Germany).

Blood Sample Collection for variable biochemical analysis

Arterial blood was collected through a direct puncture done at the left region of the heart, using a hypodermic syringe of 3 mL with 0.25 mL of heparin (to prevent blood clotting), for a maximum time of 20 sec after stunning. Blood samples were immediately transported in a bag with ice and injected into the gasholder equipment; procedure time was less than 30 seconds. The parameters were: Hematocrit (Ht), glucose, serum electrolytes (Na^+ , K^+ and Ca^{++}), lactate, partial pressure and tension of carbon dioxide ($p\text{CO}_2$, τCO_2), partial pressure and saturation of oxygen ($p\text{O}_2$ and $s\text{O}_2$), bicarbonate (HCO_3^-), bases excess (BE) and haemoglobin (Hb). Obtained using an automatic blood gas and electrolyte analyzer (GEM Premier 3000, Instrumentation Laboratory Company, Lexington, USA, and Instrumentation Laboratory SpA Milano, Italy).

Production parameters

Dressing percentage (DP) was determined using the Live Animal Weight (LW) before the fasting, and the Hot Carcass Weight (HCW) immediately after the slaughter: $\text{DP} = (\text{HCW}/\text{LW}) \times 100$

Muscle and meat quality parameters

These variables were analyzed to study the effect of stress on muscle and meat. Therefore, the pH and color were taken from the muscle (immediately after slaughter). While Water Holding Capacity (WHC) and texture were evaluated from the meat at 48 h *postmortem*.

pH

It was carried out directly on the muscle of the leg (*Biceps femoris*) immediately after slaughter. The muscle was pierced with a knife, and the electrode potentiometer (pH Model 1100) was introduced, recording the data when the reading stabilized. The potentiometer was calibrated at 15 °C with pH buffers of 4.0 and 7.0.

Color

A portable Hunter Lab, Chromameter CR-410, Konica Minolta Sensing, Inc. Japan colorimeter was used to measure the variables L * (lightness), a * (red-green) and b * (yellow-blue). It was calibrated with a mosaic (tile) which had reference coordinates as L * = 94.7, a * = 0.3130, b * = 0.3191); then, three points were measured on the external area of the *Longissimus thoracis et lumborum* muscle of each rabbit.

Water Holding Capacity (WHC)

Two grams of finely ground meat were weighed into a centrifuge tube. After it was homogenized with five mL of a 0.6M NaCl solution and stirred in a vortex for one minute, and allowed to stand in the refrigerator for 30 min, at 4° C. The samples were centrifuged for 15 min at 10,000 rpm in a Beckman J-MI centrifuge (CA, USA). The supernatant was decanted and measured in a test tube. The retained volume of distilled water was reported as the amount of water retained, calculated at 100 g of meat (Guerrero *et al.*, 2002).

Texture

It was carried out two days after slaughter, in samples of *Longissimus thoracis et lumborum* muscle with Warner-Bratzler blade, using a texture analyzer TA-XT2 (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY) equipment. Raw meat cubes of 1 cm² were measured, the force was applied perpendicular to fibre direction. The experimental conditions used were: test speed = 5.0 mm/s, returning speed = 5.0 mm/s, test distance = 40.0 mm/s, test cycle = 1; force applied= 0.1 g, sample height = 1 cm (Guerrero *et al.*, 2002).

Statistical analysis

Randomized design was used with a factorial arrangement of 3 x 2 x 2, considering the first factor: Without stress (C), the stress of transportation, and stress by vibration of the platform. The second factor was stress time: 30minutes and 60 minutes (SST, SLT, SSVP, and SLVP). The third factor was the sex: female or male. Statistical differences were compared, using a test of orthogonal contrasts, considering the control *vs.* stress groups and groups for the types of stress (SAS 2007). The comparison of means between each of the individual groups and sex were performed with the Tukey test (SAS 2007). The following model was used:

$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + (T \times S)_{ij} + \xi_{ijk}$. Where: Y_{ijk} = Variable response, μ = general mean T_i = Effect of group (transport period) Effect of sex $S_j = (T \times S)_{j_i}$ = Effect of group x sex interaction at i, j levels, ξ_{ijk} = Random Error.

Results

Assessment of the animals blood parameters

The results of the blood biochemical parameters in females and males are shown in Tables 1 and 2. The pH of blood in females decreased between 0.06 units and 0.08 units when they were exposed to stress due to transportation ($P<0.005$), and vibration ($P<0.001$), respectively. The comparison of these two types of stress showed no significant difference ($P>0.05$) in both sexes. Similarly, males showed no difference between the group T and the types of stress. The $p\text{CO}_2$ in females showed no statistical differences in any of the groups ($P>0.05$). However, the group of males showed decreases of 6.5 mmHg, 8.5 mmHg, and 7.5 mmHg when comparing the T group vs. SST, SLT; T vs. SSVP, SLVP, and T vs. SST, SLT, SSVP, SLVP ($P<0.001$), respectively. Females had greater ($P<0.05$) $p\text{CO}_2$ than males (57 vs. 48 mmHg) in the SLT. Figure 1.

Tabla 1. Values of hematological variables of rabbit in females in relation to type of stress.

Variables	Stress by transportation			Stress by vibration		SEM	Contrasts			
	Witness (no stress)	short (SST)	long (SLT)	short (SSVP)	Long (SLVP)		<i>T</i> vs <i>SST,SLT</i>	<i>T</i> vs <i>SSVP,SLVP</i>	<i>T</i> vs <i>SST,SLT,SSVP,SLVP</i>	<i>SST,SLT</i> vs <i>SSVP,SLVP</i>
Temp (°C)	37.97 bc	38.47 ab	37.27 c	38.20 ab	39.20 a	0.241	0.7274	0.0362	0.2762	0.0043
pH	7.39 a	7.34 ba	7.31 b	7.31 ba	7.31 b	0.018	0.0058	0.0018	0.0012	0.3609
pCO ₂ (mmHg)	52	53	57	55	54	1.833	0.2918	0.3251	0.2625	0.948
pO ₂ (mmHg)	18 b	23 ba	20 ba	29 a	24 ba	2.266	0.2914	0.0161	0.0499	0.0601
Na ⁺ (mmol/L)	144	144	144	149	142	1.639	0.7747	0.4709	0.5632	0.5866
K ⁺ (mmol/L)	5.5 a	4.6 b	4.7 b	5.9 a	5.6 a	0.148	<.0001	0.2237	0.0322	<.0001
Ca ⁺⁺ (mmol/L)	1.56	1.5	1.5	1.56	1.54	0.021	0.0155	0.6963	0.1337	0.0379
Glucose (mg/dL)	142 b	234 a	291 a	145 b	120 b	9.274	<.0001	0.6143	0.0005	<.0001
Lactate (mg/dL)	29 b	71 a	74 a	48 ba	32 b	5.779	<.0001	0.1621	0.0001	<.0001
Hematocrit, %	39 b	40 ba	40 ba	43 a	37 b	0.782	0.3175	0.3048	0.2569	0.8745
HCO ₃ ⁻ (mg/dL)	31.0 a	28.2 ba	28.4 ba	27.5 b	26.4 b	0.789	0.0022	0.0001	0.0001	0.1027
τCO ₂ (mg/dL)	32.6 a	29.7 ba	30.1 ba	29.1 b	27.9 b	0.795	0.0031	0.0001	0.0002	0.0962
BE (mg/dL)	4.6	3.4	3.6	2.4	4.4	0.767	0.1669	0.2008	0.1262	0.8829
sO ₂ %	26	34	28	45	30	4.684	0.3683	0.0791	0.1326	0.2252
Hb (mg/dL)	7.5 c	7.8 cb	7.7 cb	8.3 b	11.6 a	0.169	0.1417	<.0001	<.0001	<.0001

T= Witness (without stress); SST= Stress with Short Transportation (30 minutes); SLT= Stress with Long Transportation (60 minutes); SSVP= Stress with Short Vibration Platform (30 minutes); SLVP= Stress with Long Vibration Platform (60 minutes); SEM= Standard Error of Mean; Temp= Temperature; pCO₂= Partial pressure of carbon dioxide; pO₂= Partial pressure of oxygen; Na⁺=Sodium; K⁺=Potassium; Ca⁺⁺=Calcium; Ht= Haematocrit; HCO₃⁻= Bicarbonate; τCO₂=Tension of Carbon dioxide; BE= Bases excess; sO₂= Saturation of Oxygen; Hb=Haemoglobin.

Different letters in the same row indicate significant differences (P<0.05).

Tabla 2. Values of hematological variables of rabbit in males in relation to type of stress.

Variables	Witness (no stress)	Stress by transportation		Stress by vibration		SEM	Contrasts			
		short (SST)	long (SLT)	short (SSVP)	Long (SLVP)		<i>T vs</i> <i>SST,SLT</i>	<i>T vs</i> <i>SSVP,SLVP</i>	<i>T vs</i> <i>SST,SLT,SSVP,SLVP</i>	<i>SST,SLT vs</i> <i>SSVP,SLVP</i>
Temp (°C)	38.84 a	37.68 b	37.21 b	38.84 a	38.57 a	0.188	<.0001	0.5949	0.0004	<.0001
pH	7.33	7.33	7.03	7.37	7.28	0.125	0.3817	0.9873	0.6428	0.3792
pCO ₂ (mmHg)	58 a	55 ab	48 c	48 c	51 bc	2.401	<.0001	<.0001	<.0001	0.2434
pO ₂ (mmHg)	23	19	20	26	25	3.157	0.1587	0.2113	0.9875	0.0063
Na ⁺ (mmol/L)	144	143	145	146	145	1.484	0.8212	0.2016	0.5241	0.1226
K ⁺ (mmol/L)	5.9 a	5.2 bc	4.7 c	5.9 a	5.6 ab	0.244	<.0001	0.2935	0.0002	<.0001
Ca ⁺⁺ (mmol/L)	1.59 a	1.53 ab	1.44 c	1.49 bc	1.55 ab	0.032	<.0001	0.0015	<.0001	0.1126
Glucose (mg/dL)	136 b	237 a	219 a	148 b	116 b	13.361	<.0001	0.7725	0.0001	<.0001
Lactate (mg/dL)	33 b	70a	61 a	33 b	31 b	7.752	<.0001	0.9574	0.0018	<.0001
Ht %	39 ab	42 a	42 a	40 ab	36 b	1.81	0.0413	0.1944	0.7061	0.0012
HCO ₃₋ (mg/dL)	29.7 a	29.2 a	25.9 bc	27.3 ab	23.7 c	1.256	0.0131	<.0001	<.0001	0.0161
τCO ₂ (mg/dL)	31.3 a	30.9 a	27.4 bc	28.6 ab	25.1 c	1.271	0.0118	<.0001	<.0001	0.0113
BE (mg/dL)	3.7	3.9	3.5	2.3	3.7	0.939	0.9992	0.6309	0.7164	0.6353
sO _{2c} %	31	27	30	40	32	6.328	0.5492	0.2928	0.7627	0.0823
Hb (mg/dL)	7.6 b	8.1 b	8.0 b	7.6 b	11.2 a	0.420	0.0983	<.0001	<.0001	<.0001

T= Witness (without stress); SST= Stress with Short Transportation (30 minutes); SLT= Stress with Long Transportation (60 minutes); SSVP= Stress with Short Vibration Platform (30 minutes); SLVP= Stress with Long Vibration Platform (60 minutes); SEM= Standard Error of Mean; Temp= Temperature; pCO₂= Partial pressure of carbon dioxide; pO₂= Partial pressure of oxygen; Na⁺=Sodium; K⁺=Potassium; Ca⁺⁺=Calcium; Ht= Haematocrit; HCO₃₋= Bicarbonate; τCO₂=Tension of Carbon dioxide; BE= Bases excess; sO_{2c}= Saturation of Oxygen; Hb=Haemoglobin.

Different letters in the same row indicate significant differences (P<0.05).

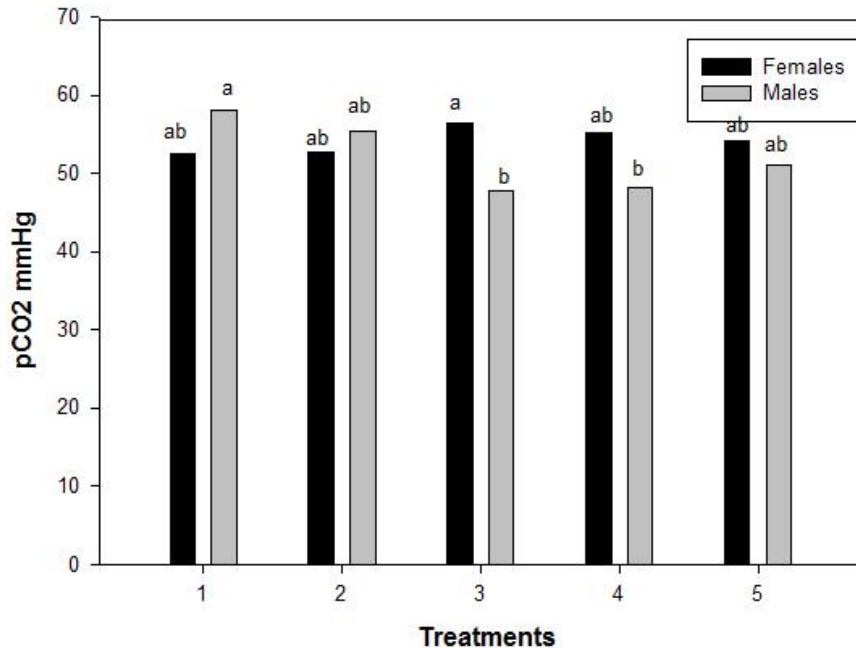


Fig. 1. Effect of transportation vs vibration stress on levels pCO₂ in different treatments.

1=Control (no stress); 2=Stress by transportation-short; 3=Stress by transportation-long; 4=Stress by vibration-short; 5=Stress by vibration-long.

Different letters in each treatment represent significant difference ($p < 0.05$)

The pO₂ in females had an increase of between 8.5 units of mmHg and 6 units of mmHg when compared with group T vs. SSVP, SLVP, and T vs. SST, SLT ($P < 0.04$). In males, SLVP and SSVP groups increased by 6.0 units of mmHg pO₂ on the average when compared with SST and SLT groups. The level of Na, BE and sO₂ showed no significant difference ($P > 0.05$) among the groups for females and males. Potassium showed a decrease of 0.9 mmol/L, when animals of both sexes were induced to SST and SLT respectively, and compared with group T. The groups of females and males in the groups of SST, SLT, SSVP, SLVP increased ($P < 0.03$) K⁺ (0.4 mmol/L) compared to group T. Within the types of stress, SSVP and SLVP groups increased the average K⁺ in 1.0 mmol/L ($P < 0.03$) compared to the groups of SST and SLT in both sexes. Ca⁺⁺ levels decreased ($P < 0.01$) by 0.08 mmol/L in both sexes, when group T vs. SST, SLT was compared.

Females with SLVP and SSVP groups increased ($P<.04$) the Ca level (0.05 mmol/L) compared to groups with SLT and SST. In group T, rabbit males decreased ($P<0.001$) Ca^{++} levels vs. SST, SLT and T vs. SST, SLT, SSVP, SLVP by 0.07 mmol/L and 0.09 mmol/L, respectively. The glucose level in both sexes is increased to 107 mg/dL when the T group was compared with SLT and SST groups. Among the types of stress, the average SST and SLT increased by 130 mg/dL and 96 mg/dL in females and males, respectively, compared with the average of SLVP and SSVP. Differences between T vs. SST, SLT, SSVP, SLVP increased glucose by 55.5 mg/dL for females and 44.0 mg/dL for males. Glucose levels differed between the sexes (Figure 2). There was an increase ($P<0.001$) of lactate by 38 mg/dL and 21.5 mg/dL in both sexes when the T vs. SST, SLT and T vs. SST, SLT, SSVP, SLVP were respectively compared. Similarly, in the comparison of SST, SLT vs. SSVP, SLVP increased ($P<0.001$) lactate by 33.0 mg/dL. The Ht did not have significant differences ($P>0.05$) in females. There was an increase of ($P<0.04$) Ht of 3% in the male groups, comparing T vs. SST, SST. Between stress groups, SLT and SST increased ($P<.001$) in HT by about 4% in respect to SLVP and SSVP. The decrease in bicarbonate and τCO_2 was constant in both sexes. The groups SST, SLT; SSVP, SLVP; and the sets of the two types of stress (SST, SLT, SSVP, SLVP) decreased ($P<0.002$) their amounts in 2.5, ~ 4.2 and ~ 3.3 mg/dL, respectively. Compared with group T. only that, the male group had differences between the types of stress. SSVP and SLVP groups decreased ($P<.01$) the content of bicarbonate and τCO_2 in ~ 2.4 mg/dL compared to SLT and SST. All groups involving stress decreased the amount of Hb, specifically SSVP, SLVP, and SST. SLT, SSVP, SLVP decreased ($P<0.001$) Hb by 2.2mg/dL and 1.3mg/dL compared to group T. The Hb of groups SST and SLT decreased ($P<0.001$) on an average of 2.2 and 1.4 mg/dL for females and males, when compared with SLVP and SSVP groups.

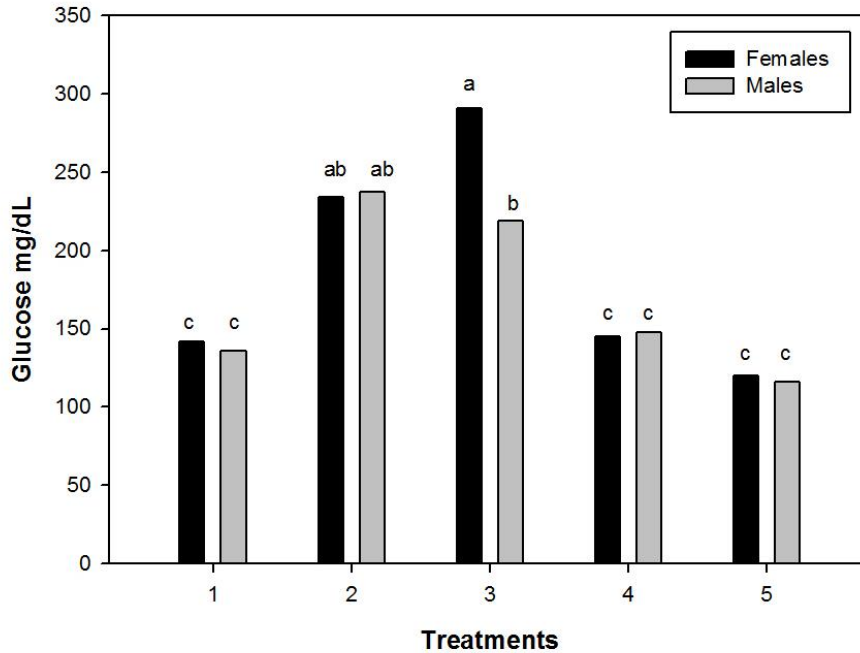


Fig. 2. Effect of transportation vs vibration stress on glucose levels in different treatments.

1= Control (no stress); 2= Stress by transportation-short; 3= Stress by transportation-long;
 4= Stress by vibration-short; 5= Stress by vibration-long.
 Different letters in each treatment represent significant differences ($p < 0.05$).

Production Parameters

The types of stress in all the groups of the rabbits had no significant effect ($P > 0.05$) on the variables of BW, HCW, and DP (Table 3). The averages of these variables in females and males were 2,450kg, 1,296kg, 52.94% and 2,359kg, 1,281kg, 54.25% to LW, HCW and DP, respectively. There were no significant differences ($P > 0.05$) when comparing groups T vs. SST, SLT; T vs. SSVP, VA; T vs. SST, SLT, SSVP, SLVP; SST, SLT vs. SSVP, SLVP, in both sexes.

Tabla 3. Effects of stress on production parameters measurements from the rabbits

Variables	Witness (no stress)	Stress by transportation		Stress by vibration		SEM	Contrasts			
		short (SST)	long (SLT)	short (SSVP)	long (SLVP)		T vs SST,SLT	T vs $SSVP,SLVP$	T vs $SST,SLT,SSVP,SLV$ P	SST,SLT vs $SSVP,SLVP$
<i>Female</i>										
LW (kg)	2.512	2.505	2.357	2.407	2.468	0.081	0.3633	0.4756	0.3698	0.9383
HCW (kg)	1.362	1.339	1.266	1.251	1.262	0.050	0.2609	0.0881	0.1086	0.3712
DP (%)	54.25	53.54	53.42	52.49	50.99	1.179	0.4981	0.0610	0.1390	0.1212
<i>Males</i>										
LW (kg)	2.360	2.326	2.359	2.280	2.471	0.054	0.7692	0.8196	0.9860	0.5854
HCW (kg)	1.308	1.278	1.267	1.246	1.307	0.040	0.4001	0.5161	0.4028	0.9203
DP (%)	55.37	55.04	53.53	54.47	52.82	0.846	0.2288	0.0943	0.1001	0.4806

T= Witness (without stress); SST= Stress with short transportation (30 minutes); SLT= Stress with long transportation (60 minutes); SSVP= Stress with short vibration platform (30 minutes); and SLVP) Stress with long vibration platform (60 minutes). SEM= Standard Error of Mean; LW= Live weight; HCW= Hot Carcass Weight; DP= Dressing percentage. Different letters in the same row indicate significant differences (P<0.05).

Meat physicochemical parameters

The results of pH, lightness (L*) value a*, b*, WHC, and texture, are shown in Table 4 for both sexes. The variables measured in muscle (immediately after slaughter) pH and color (L*, a*, and b*), showed no statistical differences in females ($P>0.05$) with an average of 6.70, 61.71, 12.88, 2.86 for pH, L*, a* and b*, respectively. Similarly, in the male group, there was no statistical difference between groups ($P>0.05$). Only the value b* in males was statistically different ($P<0.03$) with SST, SLT vs. SSVP, SLVP.

Table 4. Post-mortem measurements taken for quality of muscle-meat parameters from the rabbits in different treatments

Variables	Witness (no stress)	Stress by transportation		Stress by vibration		SEM	Contrasts			
		short (SST)	long (SLT)	short (SSVP)	Long (SLVP)		<i>T</i> vs <i>SST,SLT</i>	<i>T</i> vs <i>SSVP,SLVP</i>	<i>T</i> vs <i>SST,SLT,SSVP,SLVP</i>	<i>SST,SLT</i> vs <i>SSVP,SLVP</i>
<i>Female</i>										
pH	6.75	6.68	6.71	6.77	6.60	0.046	0.2409	0.2481	0.1925	0.8487
L*	62.95	63.04	60.39	60.53	61.65	1.093	0.3948	0.2183	0.2623	0.5583
a*	12.37	12.24	14.86	12.89	12.05	0.781	0.2800	0.9318	0.5364	0.1834
b*	3.06	2.36	3.77	2.64	2.45	0.528	0.9963	0.5335	0.7311	0.3883
WHC (mL/g)	45.53 b	48.66 b	71.60 a	48.38 b	56.72 ab	4.662	0.0219	0.2754	0.0664	0.1316
Texture (g)	3048.1	2770.5	2784.4	2900.0	2906.5	199.841	0.2423	0.5727	0.3476	0.5458
<i>Male</i>										
pH	6.71	6.67	6.69	6.75	6.67	0.054	0.6098	0.9779	0.7743	0.6369
L	60.70	63.17	60.47	61.18	62.17	0.927	0.2799	0.3583	0.2594	0.8782
a*	14.23	13.09	15.60	13.04	13.20	0.842	0.8999	0.2519	0.5571	0.1708
b*	3.31	3.18	4.42	2.41	2.58	0.582	0.4634	0.2240	0.7731	0.0391
WHC (mL/g)	52.8 ab	70.5 a	69.0 ab	49.2 b	54.7 ab	5.222	0.0081	0.8912	0.1297	0.0021
texture (g)	3177.7	3103.8	3322.9	3132.9	3128.3	177.50	0.8680	0.8162	0.9751	0.6727

Witness = Testigo (without stress); SST= Stress with short transportation (30 minutes); SLT= Stress with long transportation (60 minutes); SSVP= Stress with short vibration platform (30 minutes); SLVP= Stress with long vibration platform (60 minutes). SEM= Standard Error of Mean; L*= Luminosity; a*= Red index; b*= Yellow index; WHC= Water holding capacity. Different letters in the same row indicate significant differences (P<0.05).

The texture of meat measurements had no statistical difference ($P>0.05$) with averages of 2881.9 g and 3173.1 g for females and males, respectively. The WHC in females was lower in group T (45.53 mL/g) compared to SLT (71.60 mL/g), but the group T was similar to the group of SST and SSVP, with an average of 47.52 (mL/g). In males, the WHC did not differ statistically between T group and animals, stressed by transport and vibration (SST, SLT, SSVP, SLVP), with an average of 59.2 mL/100g of meat. However, there was a difference ($P<0.05$) between the two types of stress. The WHC was higher in the SST (70.5 mL/g) compared to SSVP (49.2 mL/g). SLT increased ($P<0.02$) by 14.6 mL/100g and 17.0 mL/100g of meat in females and males, respectively. However, the males also showed a decrease ($P<0.002$) of 17.8 mL/100 g of meat, when comparing the SST, SLT vs. SSVP, SLVP.

Interaction effect

There was a significant effect on the variables K^+ , glucose, lactate and τCO_2 . Glucose, lactate and τCO_2 were higher in females ($P<0.02$). However, the K^+ was higher in males ($P<0.05$).

Discussion

The experiment carried out in this study, simulated the minimum conditions of animal welfare, which are given routinely during the marketing process in Mexico and several Latin American countries.

Blood parameters

The conditions described, affected the blood components, and these are sensitive indicators of physiological responses in stressed animals (Tadich *et al.*, 2009) and indirectly reflect the health of animals and adaptation. In this study, the concentration of Ht did not differ among groups of rabbits. However, it could be increased by the stress of transportation (Alende, 2010). Likewise, during the slaughtering of animals, loading, transport, unloading and rest before slaughter, the lactate and glucose content increased (Werner and Gallo, 2008). Due to a glycogenolytic effect mediated by catecholamines, given that these stimulate the secretion of glucagon and increase the concentration of blood glucose by the stimulus that gives glycogenolysis (Alende, 2010). Specifically, the increase of Ht in rabbits transported by the vehicle, compared to the stress induced by the vibrating platform is attributed to dehydration due to transport. This effect possibly induced the release of catecholamine and splenic contraction (Becerril-Herrera *et al.*, 2010), during the transportation activity, where the animals were exposed to radiation from the sun. Unexpected movements of the vehicle braking, the wind, dust, and speed; factors that were not present in the simulated stress. Other research conducted in pigs (Becerril-Herrera *et al.*, 2010; Mota-Rojas *et al.*, 2012) reported increased Ht levels for 8h and 16 h of transport in more than 40% of the group.

The low K^+ levels which were caused by stress due to transportation can be attributed to respiratory alterations; the animal tries to dissipate the heat with an increase in the water renewal rate. As a result, increasing the glucose concentrations and K^+ in the urine (Chaiyabutr *et al.*, 1997). Sweat glands of rabbits are not functional (Liu *et al.*, 2012), it is a very sensitive species, and consequently, the urinary K^+ excretion is increased during stress.

Glucose and lactate also reflect the changes in the energetic metabolism of rabbits; these metabolites increased by more than 40% due to stress caused by transportation. Specifically, the increase of hematic glucose is attributed to the triggering of glycogenolysis, which is modulated by catecholamines (Werner and Gallo, 2008). Minimizing transportation activities which are involved in producing stress in rabbits could lower glucose levels in the blood that are increased by *antemortem* stress induction and therefore, improve the welfare of the animal. Information published in pigs (Becerril-Herrera *et al.*, 2010; Mota-Rojas *et al.*, 2012) and lambs (Tadich *et al.*, 2009), also cite increases in glucose and lactate (over 100mmol/L and 87 mmol/L, respectively) when transported for 3 -16 h.

The increase in pCO_2 in the male rabbits reflected the presence of a metabolic acidosis that tried to be modulated by hyperventilation (Kiwull-Schöne *et al.*, 2007). A physiological reason that explains the differences in pCO_2 levels regarding sexes was not found. On the other hand, changes in τCO_2 are regulated by changes in the concentration of bicarbonate (Dalmau and Diaz, 2008). Bicarbonate reduction can be explained because it buffers the protons that are released into the plasma, thereby, lowering the base-ions (Kiwull-Schöne *et al.*, 2007).

Production Parameters

In rabbit production, one of the most important factors is heat stress, this is because, it is a species susceptible to temperature change, thereby, causing an alteration of the production parameters (Marai *et al.*, 2002). However, there is also evidence that transportation might affect these parameters (Lambertini *et al.*, 2006); these authors transported rabbits for 1, 2 and 4 h, recording less carcass weight and performance while increasing the transportation time. It is assumed that any activity which these animals are subjected to, can affect their physiological and productive behavior, but this is not always the case. Mazzone *et al.* (2010) compared two boarding processes: relaxed and rude. The variables were the noise and the transfer time, not finding significant differences in LW and DP. Similarly, no statistical differences in these variables were found in this study.

Meat physicochemical parameters

The diet in the productive stage influences the quality of meat in the rabbit (Peiretti and Meineri, 2008; Papadomichelakis *et al.*, 2010; Volek and Marounek, 2011), but the effect of stress on meat quality is small (Liu *et al.*, 2012). The pH, color and WHC are the main factors that affect the appearance and juiciness of the meat; and consequently, the acceptance or rejection by the consumer (Sánchez *et al.*, 2008; Menon *et al.*, 2014.). Males and females did not differ in the values of pH, L *, a * and b *, as it has been published in rabbits (Liste *et al.*, 2009; Mazzone *et al.*, 2010). However, Lambertini *et al.* (2006) while evaluating rabbits with 1, 2 and 4h of transportation, reported significant differences, in our case, the maximum transport time was 60

min. The color of the meat in ruminants and pigs is measured on the surface of the cuts, while in rabbits, it is made directly from the carcass, which seems to be a better criterion, since rabbits' carcasses are mainly sold whole (Blasco and Ouhayoun, 1993). The color of meat is one of the main characteristics influencing the purchase decision, because, consumers relate it to freshness (Mancini and Hunt, 2005; Sánchez *et al.*, 2008). During the period prior to slaughter, they may be exposed to multiple stressors such as transportation; that can cause changes in the blood components. An increase in the physiological stress or physical activity during transport, leads to depletion of muscle glycogen before slaughter, resulting in an association between pH and WHC and it was due to the isoelectric point of the protein that increases the number of negative charges. Thus, the force of attraction to water is intensified and is reflected in the increase of WHC (Hargreaves *et al.*, 2004; Ekiz *et al.*, 2012).

Glycogen concentration in muscle and liver was higher in transported animals than in those without transportation, confirming the result of increased mobilization of glycogen due to stress (Amtmann *et al.*, 2006). In this study, the glucose and lactate content was greater in animals in SLT and SST group, about those in group C, where both females and males, are associated with the value of the WHC. Stressed animals had higher WHC in comparison to those who were not subjected to any stress. However, in our study, we could not correlate the pH to the WHC, as the pH was immediately determined at the time of sacrifice and not after 24 h, like other authors. Although it has been seen that transportation produces stress in several domestic animals and directly affects the production parameters and quality of the meat (Fisher *et al.*, 2009), in rabbits, the results are more variable. The influencing factors are the effects prior to slaughter, the time of shipment, transportation, production method, and so on (Liste *et al.*, 2009; Mazzone *et al.*, 2010).

Conclusion

Blood metabolites that relate to energy, increased in rabbits subjected to stress for transport compared to stress induced vibration platform with animals. Rabbits with transportation, had slower or sudden movements; this was due to drafts, dust and environmental changes caused by the speed and distance travelled. Rising energy metabolites did not affect the production parameters and meat quality.

Literatura citada

- Alende M 2010. El bienestar animal en el transporte de bovinos para faena. *Revista Argentina de Producción Animal* 30, 117-129.
- Amtmann VA, Gallo C, Schaik GV, and Tadich N 2006. Relaciones entre el manejo antemortem, variables sanguíneas indicadoras de estrés y pH de la canal en novillos. *Archivos de Medicina Veterinaria* 38, 259-264.
- Becerril-Herrera M, Alonso-Spilsbury M, Lemus-Flores C, Guerrero-Legarreta I, Olmos-Hernández A, Ramírez-Necochea R and Mota-Rojas D 2009a. CO2 stunning may compromise swine welfare compared with electrical stunning. *Meat Science* 81, 233-237.
- Becerril-Herrera M, Mota-Rojas D, Guerrero-Legarreta I, De Aluja AS, Lemus-Flores C, Gonzalez-Lozano M, Ramirez-Necochea R and Alonso-Spilsbury M 2009b. Relevant aspects of swine welfare in transit. *Veterinaria México* 40, 315-329.
- Becerril-Herrera M, Alonso S M, Trujillo OME, Guerrero LI, Ramírez NR, Roldan SP, Pérez SM, Soní GE and Mota-Rojas D 2010. Changes in blood constituents of swine transported for 8 or 16 h to an Abattoir. *Meat Science* 86, 945-948.
- Blasco A and Ouhayoun J 1993. Harmonization of criteria and terminology in rabbit meat research. Revised proposal. *World Rabbit Science* 4, 93-99.
- Buil T, Maria GA, Villarroel M, Liste G, López M 2004. Critical points in the transport of commercial rabbits to slaughter in Spain that could compromise animals' welfare. *World Rabbit Science* 12, 269-279.
- Chaiyabutr N, Komolvanich S, Sawangkoon S and Chanpongsang S 1997. Alterations in potassium homeostasis during heat stress in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Journal of Thermal Biology* 22, 207-212.

- Dalmau BEA and Díaz RCA 2008. Valores de electrolitos, gases sanguíneos, nitrógeno ureico y glucosa en sangre venosa en caninos, ubicados a 2600 msnm. *Revista de Medicina Veterinaria* 16, 53-61.
- Ekiz B, Ergul EE, Kocak O, Yalcintan H and Yilma, A 2012. Effect of pre-slaughter management regarding transportation and time in lairage on certain stress parameters, carcass and meat quality characteristics in Kivircik lambs. *Meat Science* 90, 967-976.
- Fisher AD, Colditz IG, Lee C and Ferguson DM 2009. The influence of land transport on animal welfare in extensive farming systems. *Journal of Veterinary Behavior* 4, 157-162.
- Guerrero LI, Ponce AE and Pérez ML 2002. *Workshop technology of meat and fish*. Ed. Universidad Metropolitana Unidad Iztapalapa. D.F., México. 226p.
- Hargreaves A, Barrales L, Peña I, Larraín R and Zamorano L 2004. Factores que influyen en el pH último e incidencia de corte oscuro en canales de bovinos. *Ciencia de Investigación Agrícola* 31, 155-166.
- Kiwull-Schöne H, Kiwull P, Frede S and Wiemann M 2007. Role of Brainstem Sodium/Proton Exchanger 3 for Breathing Control during Chronic Acid–Base Imbalance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176, 513-519.
- Lambertini L, Vignola G, Badiani A, Zaghini G and Gormigoni A 2006. The effect of journey time and stocking density during transport on carcass and meat quality in rabbits. *Meat Science* 72, 641-646.
- Liste G, Villarroel M, Chacón G, Sañudo C, Olleta J L, García BS, Alierta S and María GA 2009. Effect of lairage duration on rabbit welfare and meat quality. *Meat Science* 82, 71-76.

- Liu H, Zhou D, Tong J and Vaddella V 2012. Influence of chestnut tannins on welfare, carcass characteristics, meat quality, and lipid oxidation in rabbits under high ambient temperature. *Meat Science* 90, 164-169.
- Marai IFM, Habeeb AAM and Gad AE 2002. Rabbit's productive, reproductive and physiological performance traits as affected by heat stress: a review. *Livestock Production Science* 78, 71-90.
- María GA, Buil T, Liste G, Villarroel M, Sañudo C and Olleta J L 2006. Effects of transport time and season on aspects of rabbit meat quality. *Meat Science* 72, 773-777.
- Mancini RA and Hunt MC 2005. Current research in meat color. *Meat Science* 71, 100-121.
- Mazzone G, Vignola G, Giammarco M, Manetta AC and Lambertini L 2010. Effects of loading methods on rabbit welfare and meat quality. *Meat Science* 85, 33-39.
- Menon DG, Bennett DC, Uttaro B, Schaefer AL and Cheng K M 2014. Carcass yields and meat quality characteristics of adult emus (*Dromaius novaehollandiae*) transported for 6 h before slaughter. *Meat Science* 98, 240-246.
- Miranda de Lama GC, Salazar-Sotelo MI, Pérez-Linares C, Figueroa-Saavedra F, Villarroel M, Sañudo C and María GA 2012. Effects of two transport systems on lamb welfare and meat quality. *Meat Science* 92, 554-561.
- Mota-Rojas D, Becerril-Herrera M, Trujillo-Ortega ME, Alonso-Spilsbury M, Flores-Peinado SC and Guerrero-Legarreta I 2009. Effects of Pre-Slaughter Transport, Lairage and Sex on Pig Chemical Serologic Profiles. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8, 246-250.
- Mota-Rojas D, Orozco-Gregorio H, González-Lozano M, Roldan-Santiago P, Martínez-Rodríguez R and Sánchez-Hernández M 2011. Therapeutic approaches in animals to reduce the impact

- of stress during transport to the slaughterhouse: A review. *International Journal of Pharmacology* 7, 568-578.
- Mota-Rojas D, Becerril HM, Roldan SP, Alonso SM, Flores PS, Ramírez N R, Ramírez TJA, Mora MP, Pérez M, Molina E, Soni E and Trujillo OME 2012. Effects of long distance transportation and CO₂ stunning on critical blood values in pigs. *Meat Science* 90, 893-898.
- Mota-Rojas D, Roldan-Santiago P, Pérez-Pedraza E, Martínez-Rodríguez R, Trujillo-Hernández E and Trujillo-Ortega M 2014. Stress factors in weaned piglet. *Veterinaria México Special issue* 37, 51.
- Papadomichelakis G, Karagiannidou A, Anastasopoulos V and Fegeros K 2010. Effect of dietary soybean oil addition on the odd-numbered and branched-chain fatty acids in rabbit meat. *Meat Science* 86, 264-269.
- Peiretti PG and Meineri G 2008. Effects on growth performance, carcass characteristics, and the fat and meat fatty acid profile of rabbits fed diets with chia (*Salvia hispanica* L.) seed supplements. *Meat Science* 80, 1116-1121.
- SAGARPA 2012. Topography applied to works and highways in Mexico. Department of Agriculture, Livestock, Fisheries, Alimentation and Rural Development, México DF.
- Sánchez EA, Torrescano UGR, Camou AJP, González MNF and Hernández WG 2008. Sistemas combinados de conservación para prolongar la vida útil de la carne y los productos cárnicos. *Nacameh*, 2, 124-159.
- SAS 2007. User's Guide: Statistics, Version 9.6th Edition. 2007. SAS Inst., Inc., Cary, NC.

- Schwartzkopf GKS, Faucitano L, Dadgar S, Shand P, González LA and Crowe TG 2012. Road transport of cattle, swine and poultry in North America and its impact on animal welfare, carcass and meat quality: A review. *Meat Science* 92, 227-243.
- Tadich N, Gallo C, Brito ML and Broom DM 2009. Effects of weaning and 48 h transport by road and ferry on some blood indicators of welfare in lambs. *Livestock Science* 121, 132-136.
- Uetake K, Ishiwata T, Tanaka T and Sato S 2011. Effects of haul distance and stocking density on young suckling calves transported in Japan. *Animal Science Journal* 82, 587-590.
- Volek Z and Marounek M 2011. Effect of feeding growing-fattening rabbits a diet supplemented with whole white lupin (*Lupinus albus* cv. Amiga) seeds on fatty acid composition and indexes related to human health in hind leg meat and perirenal fat. *Meat Science* 87, 40-45.
- Werner M and Gallo C 2008. Effects of transport, lairage and stunning on the concentrations of some blood constituents in horses destined for slaughter. *Livestock Science* 115, 94-98.

CAPÍTULO II

EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA FORMACIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS EN CARNE DE CONEJO CON DIFERENTES EMPAQUES

**EFFECT OF STORAGE IN FORMATION BIOGENIC AMINES IN RABBIT MEAT WITH
DIFFERENT PACKAGING**

CAPÍTULO II

EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA FORMACIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS EN CARNE DE CONEJO CON DIFERENTES EMPAQUES

Verónica Reséndiz Cruz, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2016.

Resumen

El objetivo del estudio fue identificar la concentración de aminas biogénicas (AB) y la carga microbiana en la carne de conejo (*Longissimus thoracis et lumborum*) usando tres tipos de empaques: Bolsa de plástico, grupo testigo (T), en bandeja de polietileno con película de plástico semipermeable (ES) y empaque al vacío (EV), midiéndose la putrescina (PU), cadaverina (CA) e histamina (HI). Las variables evaluadas fueron el color, pH, concentración de aminas biogénicas y la carga microbiana (enterobacterias y mesófilos aerobios) se analizaron con el procedimiento PROC MIXED y la comparación de medias se llevó a cabo con PDIFF (SAS, 9.3). En el empaque T, el valor de pH presentó diferencias ($P < 0.05$) cuando se comparó el día 0 vs. 7, 14 y 21 días. En color la luminosidad (L^*) fue diferente ($P < 0.05$) entre los días de refrigeración, el valor más alto se tuvo en el día 0 y posteriormente disminuyó 3.67 unidades al final del periodo experimental. Los valores de a^* y b^* del empaque testigo y semipermeable, tuvieron el menor valor en el día 0 y aumentaron ($P < 0.05$) con la refrigeración de las muestras en 3.3 y 4.0 unidades, respectivamente. La concentración de PU aumentó ($P < 0.05$) 17.3 y 41 unidades desde los días 14 y 21, respectivamente. La mayor ($P < 0.05$) concentración de PU se dio en el ES, la CA en el EV y la HI en el T todas al final del periodo experimental. El conteo de las enterobacterias a 14 d en el grupo ES (6.05) fue más bajo ($P < 0.05$) que en el grupo EV (1.98). El conteo bacteriano de mesófilos

aerobios no tuvo diferencias ($P>0.05$) en los días 0, 7 y 21d entre los tres tipos de empaques. Pero en el 14 d, la comparación entre los grupos T y EV disminuyó ($P<0.05$) 2.7 unidades. En conclusión, el contenido de AB se incrementó con el tiempo de almacenamiento, incrementándose la producción de AB a partir del 7 d. La cantidad de enterobacterias no alteró por el tiempo de conservación, pero esto no sucedió con el conteo de mesófilos aerobios, los cuales incrementaron al final del periodo de la evaluación.

Palabras clave: conejo, carne, almacenamiento, empaque, aminas biogenicas,

Implicaciones

La carne es uno de los principales alimentos al que se debe dar énfasis en la conservación íntegra, dado que por sus características nutricionales, es más sensible a la alteración en sus características físicas e inocuas, aspecto importantes a tomar en cuenta por parte del consumidor. El tipo de empaque es importante en la conservación de la carne, ya que el tiempo de almacenamiento influye tanto en la calidad de la carne como en la producción y concentración de aminas biogénicas. Su determinación implica la evaluación toxicológica y la indicación de frescura o calidad. Por ello, se diseñó un estudio para investigar el efecto del tiempo de almacenamiento y el tipo de empaque en el color de la carne y el contenido de aminas biogénicas. Los resultados de esta investigación indican una asociación entre el tiempo de conservación de la carne de conejo y la concentración de aminas biogénicas, principalmente la putrescina. En los tres tipos de empaques evaluados (testigo, semipermeable y vacío) el empaque al vacío tuvo menos concentración de aminas biogénicas y bacterias. Se recomienda que la carne de conejo no sea almacenada por más de 7 días en el caso de utilizar un empaque semipermeable, y si se desea prolongar su vida útil, es mejor utilizar un empaque al vacío.

CAPITULO II

EFFECT OF STORAGE IN FORMATION BIOGENIC AMINES IN RABBIT MEAT WITH DIFFERENT PACKAGING

Verónica Reséndiz Cruz, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2016.

Abstract

The aim of the study was to identify the concentration of biogenic amines (AB) and microbial load in rabbit meat (*Longissimus thoracis et lumborum*) using 3 different packaging: Plastic Bag, witness group (T), in tray polyethylene film semipermeable plastic (ES) and vacuum packaging (EV), measured putrescine (PU), cadaverine (CA) and histamine (HI). In the package T, the pH showed significant differences ($P < 0.05$) when compared on day 0 vs. 7, 14 and 21 days. Color brightness (L^*) was statistically different ($P < 0.05$) between the days of refrigeration, the highest value was taken on day 0 and then decreased 3.67 units at the end of the experimental period. The a^* and b^* semipermeable control and packaging had the lowest value on day 0 and increased with cooling of samples in 3.3 and 4.0 units ($p < 0.05$), respectively. PU concentration increased 17.3 and 41 units from 14 and 21 respectively. The highest concentration of PU was in the ES, the CA in the EV and HI in the T all at the end of the experimental period. The count of enterobacteria to 14d in the ES group (6.05) was lower than in the EV group (1.98). The coliform bacterial count was no statistical difference ($P > 0.05$) on days 0, 7 and 21d between the three types of packaging. However, 14d, the comparison between groups T and EV decreased 2.7 units. In conclusion, the

AB content increased with the storage time, increasing production from AB 7d. The amount of Enterobacteriaceae not altered by the shelf, but this did not happen with the count of aerobic mesophilic bacteria, which increased at the end of the evaluation period.

Keywords: rabbit, meat, storage, packaging, biogenic amines.

Introducción

La carne es uno de los alimentos más perecederos debido a su alto contenido de agua y nutrientes disponibles. Su deterioro puede ser detectado a través de los cambios físicos como el color, olor, textura y oxidación, haciéndolo inaceptable para el consumidor. Las alteraciones en las propiedades de la carne son atribuidas al crecimiento de microorganismos, cuando no existen las condiciones idóneas de conservación. La carga bacteriana mayor de 10^7 UFC cm^2 en empaques de carne, ocasiona mal olor, pero cuando incrementa a 10^9 UFC cm^2 , el olor es pútrido y se produce la descarboxilación de algunos aminoácidos específicos que se encuentran en su forma libre (Ercolini *et al.*, 2006), produciéndose la formación y acumulación de aminas biogénicas (**AB**); descritas como bases orgánicas de bajo peso molecular, caracterizadas por la presencia de un grupo amino adicional al grupo alfa-amino del aminoácido en su forma original (Tamim y Doerr, 2003; Aquiles *et al.*, 2015). La identificación de las AB indica una actividad microbiana en la carne y el deterioro de su valor nutritivo (Kaniou *et al.*, 2001; Vinci y Antonella, 2002; Galgano *et al.*, 2009; Aquiles *et al.*, 2015). La ingesta de AB en el ser humano causa dolor de cabeza, hipertensión, fiebre y trastorno cardíaco (Min *et al.*, 2007).

Por otra parte, es importante aplicar adecuadamente métodos de conservación en la carne que asegure un producto inocuo durante la comercialización. Actualmente en los mercados minoristas que comercializan carne de conejo, existen dos sistemas de envasado muy comunes, conocidos como la bandeja de espuma de poliestireno convencional (con o sin un almohadilla absorbente y una cubierta de cloruro de polivinilo) y el envasado al vacío (Charles *et al.*, 2006).

En la literatura consultada no se encontró información científica sobre la vida de anaquel y la concentración de AB en la carne de conejo, por lo tanto, el objetivo del estudio fue identificar la concentración de AB y la carga microbiana en la carne de conejo usando empaques semipermeables y al envasado al vacío.

Materiales y métodos

Animales

El estudio se realizó en la granja cunícola de la preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma de Chapingo, localizada en el Municipio de Texcoco, Edo. de México a una altitud de 19° 29´ Latitud Norte, 98° 54´ Longitud Oeste, a 2240 msnm. El clima de la región es templado subhúmedo con lluvias en verano, la precipitación promedio anual es de 620 mm. La temperatura ambiental promedio anual es de 15° C (García, 1989).

Se seleccionaron 60 Conejos de la raza Nueva Zelanda, con 2 meses de edad y con un peso promedio de 2.35 kg. Los animales fueron engordados con un alimento peletizado que contenía 12 % de humedad, 10 % de cenizas, 16 % de fibra cruda, 16 % de proteína, 3 % de grasa y 43 % de E.L.N. Las jaulas donde se alojaron los conejos tuvieron una dimensión de 88 x 48 x 45 cm, asignando 8 conejos por jaula. La nave en la que se alojaron los animales durante la engorda tiene 32 m de largo x 10 m de ancho, cuenta con piso de concreto, bardas de 1.30 m de altura, ventanas de maya ciclónica de 90 cm de alto; el techo es de lámina galvanizada con un aislante de poliuretano con 2.54 cm de espreado. Durante la fase experimental que se llevó a cabo en el mes de enero la nave mantuvo una temperatura interna promedio de 18.8 °C.

Sacrificio de los animales

Los animales permanecieron en ayuno 12 h antes del sacrificio y fueron transportados al rastro en una camioneta sin camper modelo 2000, por un tiempo máximo de 30 min a una velocidad de 70 km/h. Al tiempo de arribo, todos los animales se introdujeron al rastro, diseñado con dimensiones de 4 m de ancho x 5 m de largo, y una altura de 5 m. La instalación cumplió con las especificaciones

de la Norma oficial Mexicana NOM-008-ZOO-1994, y la matanza se realizó con lo establecido en la NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, dividida en dos partes: a) Insensibilización por medio del desnucamiento y b) Desangrando por corte de la vena yugular, en un tiempo menor de 30 s, después de la insensibilización. Posteriormente la canal se dejó reposar durante 4 h a temperatura de 4° C para dar paso a la maduración de la carne.

Obtención de muestras

Se recolectaron 10 g de carne del musculo *Longissimus thoracis et lumborum* de cada conejo. Las muestras se envasaron con tres tipos de empaques **1**) Bolsa de plástico, grupo testigo (T): Se utilizó una bolsa de plástico (polietileno), transparente y delgada (calibre 120), de 15 x 25 cm. **2**) En bandeja de polietileno con película de plástico semipermeable (ES): Se usó un plato circular de unigel de 11 cm de diámetro marca Reyma y una película elástica de grado alimenticio con un calibre de 12 micras y **3**) Empaque al vacío (EV): Se utilizó una empacadora marca Torrey modelo Evd20. El tiempo de vacío fue de 40 s y el sellado fue de 2 s. Utilizando bolsas especiales para vacío de 15 x 20 cm y 90 micras/ 2.8 msi (milésimas de pulgada). De cada conejo se obtuvieron muestras por triplicado para realizar el análisis de color y pH, aminos biogénicos y determinar el conteo microbiano. Las muestras se envasaron y conservaron en refrigeración a 4°C en los diferentes tiempos: Cero (se guardó en el refrigerador por menos de 24h), 7, 14 y 21 d. Después de permanecer 0 d en refrigeración, las muestras fueron retiradas para ser procesadas y determinar el contenido de AB. Al cumplir los tiempos de 7, 14 y 21 días el resto de la muestras, también se les determinó el perfil de AB.

Determinación del pH y color de la carne

pH: Se utilizó un potenciómetro portátil de la marca Hanna modelo HI 99163, se calibró a temperatura ambiental (18°C), con los estándares de pH 4.0 y 7.0. El electrodo se introdujo a una profundidad de 1 cm y la lectura del pH se registró cuatro veces consecutivas, reportando el promedio de estas mediciones.

Color de la carne: Se utilizó un colorímetro portátil Hunter Lab, Chroma meter CR-410, Konica Minolta Sensing, Inc. Japan, para medir las variables L*(luminosidad), a*(rojo-verde) y b*(amarillo- azul). Se calibró con el mosaico (tile) a las coordenadas de referencia: L*=94.7, a*=0.3130, b*=0.3191); posteriormente, se midieron tres puntos sobre el área superficial de la muestra de carne obtenida del músculo *Longissimus thoracis et lumborum* del conejo.

Determinación de aminas biogénicas

Se determinaron en tres fases:

Primera fase: Preparación de la solución stock y estándares individuales de las aminas biogénicas (AB): En un tubo de ensayo se pesaron por separado los estándares de las aminas de putrescina (PU), cadaverina (CA), histamina (HI) con el objetivo de conseguir una concentración final de 10 mg/mL de cada una. Cada estándar se diluyó en 1 mL de ácido clorhídrico y homogenizó (solución stock). A partir de las soluciones stock, se tomaron 50 µL de cada amina (0.5 mg) y se depositaron en un tubo de ensayo, adicionando 950 µL de agua Milli Q. Posteriormente se adicionó 1 mL de NaOH y se mezcló. Después se colocaron 20 µL de cloruro de benzoil y se homogenizó, dejando reposar durante 20 min a temperatura ambiente. Enseguida se agregaron 2 mL de cloruro de sodio, se homogenizó y se adicionó 1 mL de éter etílico a la solución. La solución se separó en dos fases,

recuperándose sólo la parte superior (fase etérea). Se agregó nuevamente 1 mL de éter etílico y se recuperó de la misma manera antes mencionada. Por último se evaporó con nitrógeno la fase etérea y se adicionaron 500 μ L de agua Milli Q y 500 μ L de acetonitrilo.

Segunda fase: Proceso de extracción y derivatización. Las muestras de carne se procesaron de acuerdo con un procedimiento propuesto y modificado por Lázaro *et al.* (2013). Proceso de extracción: las muestras de carne fueron retiradas del refrigerador, posteriormente se les desprendió la grasa en caso que tuviera y se cortaron finamente. Se pesaron 5 g de carne en un tubo de ensayo y se adicionaron 5 mL de ácido perclórico al 6%, se homogenizó en vórtex y se dejó reposar por una 1 h en refrigeración. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 10 min a 4°C y después se filtró la solución a través de papel filtro Whatman N° 4, al filtrado se le adicionó 1 mL de NaOH 2M y finalmente se homogenizó. El pH de la solución se ajustó a 6 con NaOH, posteriormente los tubos se coloraron en agua con hielo durante 20 min. Proceso de derivatización: después del proceso anterior, se adicionaron 20 μ L de cloruro de benzoil en cada uno de los tubos con las muestras y se homogenizo. Se dejó reposar durante 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 2 mL de cloruro de sodio 5 M y se homogenizó en vórtex. Se adicionó 1 mL de éter etílico a la solución y se realizó una ligera homogenización manual, después de esto se observó la formación de dos fases, recuperándose la parte superior (fase etérea) con el uso de una pipeta y se colocó en otro tubo de ensayo. Se adicionó nuevamente 1 mL de éter etílico y se recuperó a la fase de la misma manera. Luego se evaporó el éter con corriente de nitrógeno (10 min.) y se colocaron 500 μ L de agua Milli Q y 500 μ L de acetonitrilo se homogenizó en vórtex. De esta manera, la muestra estaba lista para inyectarse en el equipo de HPLC y hacer el análisis.

Tercera fase: Análisis en el HPLC: La muestra filtrada (1 mL) se inyectó en un aparato de HPLC que cuenta con una matriz de detector de diodos (Modelo 1100 HP con inyector automático Agilent Technologies Inc., Wilmington, EE.UU.), equipado con una columna ACE de 18 carbonos (250 x 4.6 mm de dimensión) y un tamaño de partícula de 5 micrómetros. Luego se usó un programa de gradiente de elución con una mezcla de 50:50, acetonitrilo como disolvente A y agua ultrapura purificada como disolvente B. Ambos disolventes se filtraron al vacío utilizando un filtro de membrana (47 mm PTFE 0,45 μ m, Pall Co., Ann Arbor, EE.UU) y se desgasificó con un ultrasonicador (5210, Branson Ultrasonic Co., Danbury, EE.UU). El caudal usado fue de 1 mL/min. El gradiente se inició a 50% y terminó a 90% después de 19 min. El análisis posterior se retrasó por 10 min para alcanzar el equilibrio. La temperatura de la columna fue de 40 °C y el efluente de la columna se analizó a 254 nm. Las lecturas se realizaron por triplicado.

Población microbiana

Se utilizaron medios de cultivo de Agar Cuenta Estándar (ACE), Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV) y Solución Salina Fisiológica (SSF). Los análisis bacteriológicos se realizaron por duplicado de la siguiente manera: Una muestra de 10 g de carne se mezcló con 90 mL de solución salina fisiológica (SSF) y se licuó. Posteriormente se una alícuota de 1 mL se colocó en un tubo que contenía 9 mL de SSF (dilución 1:10), agitando por 30 veces. De la anterior dilución se tomó 1 mL y se colocó en un tubo de ensaye que contenía 9 mL de SSF, agitándose por otras 30 veces más. El procedimiento permitió obtener la dilución 1:100, tomándose una alícuota de 1 mL y se procedió de la misma forma antes mencionada hasta obtener una dilución 1:1000. De cada dilución se tomó una alícuota de 1 mL y se colocaron en cuatro cajas Petri; las primeras dos se les agregó Agar Cuenta Estándar (ACE) y las otras restantes se les agregaron Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV).

Posteriormente las cajas Petri preparadas con el medio y la muestra, se homogenizaron en sentido de las manecillas del reloj y de forma inversa, así como también de abajo hacia arriba. Las cajas fueron incubadas por 48 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. El recuento de ACE y ABRV fueron utilizados para determinar la cuenta total de bacterias aerobias mesófilas y enterobacterias, respectivamente.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico para el pH, color, AB y conteo microbiano en los 3 tipos de empaque relacionado con el tiempo de almacenamiento se realizó con el procedimiento de PROC MIXED y la comparación de medias se realizó con PDIF (SAS, 9.3). El número de colonias de cada medio de cultivo se multiplicó por el factor de dilución y se determinó el logaritmo natural para el análisis.

Resultados

Características de la carne

El Cuadro 1 presenta los datos de las variables evaluadas de pH y color de la carne de conejo durante el almacenamiento. En el empaque T el pH fue diferente ($P < 0.05$) cuando se comparó el día 0 vs. 7, 14 y 21. Durante los días 7 y 14 permanecieron igual, y al final del periodo de la evaluación hubo un incremento del 0.6 unidades a partir del día 7, pero el valor más alto se presentó al inicio de la evaluación. Con respecto al color, la luminosidad (L^*) fue diferente ($P < 0.05$) entre los días de refrigeración, el valor más alto se tuvo en el día 0 en el empaque T, y posteriormente disminuyó 3.67 unidades al final del periodo experimental; aunque a partir del día 14 se mantuvo igual. El índice rojo (a^*) y amarillo (b^*) tuvieron diferencias ($P < 0.05$) en los días 0 vs. 7, 14 y 21, manteniéndose constantes estos índices a partir del día 7 de almacenamiento. Del

día 0 al 21 se obtuvieron aumentos en 3.1 y 6.6 unidades en a^* y b^* , respectivamente. El grupo ES tuvo el mayor valor en pH al día 0, posteriormente disminuyó hasta el día 14. Pero al final del periodo de evaluación (21 días) se observó un incremento de 0.3 unidades a partir del séptimo día de almacenamiento. La variable L decreció conforme pasaron los días de conservación en 6.4 unidades, aunque del día 7 al 14 esta variable permanece igual. Los a^* y b^* tuvieron el menor valor en el día 0, se incrementaron conforme transcurrieron los días de conservación en 3.4 y 8.3 unidades, respectivamente; pero desde el día 7 permanecieron similares hasta el final de la valoración. El EV presentó diferencias significativas ($P>0.05$) en el pH durante el día 0 vs. 7, 14 y 21; estos 3 últimos periodos se mantuvieron constantes con un promedio de 5.72. La luminosidad disminuyó 5.8 unidades al transcurrir los días de almacenamiento. Los a^* y b^* del empaque control y semipermeable, tuvieron el menor valor en el día 0 y aumentaron con la refrigeración de las muestras en 3.3 y 4.0 unidades ($P<0.05$), respectivamente. Después del séptimo día y hasta el final del periodo de evaluación no hubo diferencias significativas ($P>0.05$), los promedios fueron de 17 para a^* y 7.2 para b^* .

La comparación de pH entre los tipos de empaques fue similar ($P>0.05$) hasta los 14 días de conservación, con promedios de 6.71, 5.70, 5.71 para los 0, 7 y 14 días, respectivamente. En el día 21 hubo diferencia ($P<0.05$) por el tipo de empaques; el pH más alto fue para el empaque T (6.28) y el menor para el EV (5.83), implicando una disminución de 0.4 unidades. La luminosidad fue diferente ($p<0.05$) en el día 0 entre el empaque T y EV, con un incremento en 2.9 unidades. Al día 21 de almacenamiento, el empaque T fue similar ($P>0.05$) al ES y EV; pero el ES fue diferente ($P<0.05$) al EV, incrementándose en 2.4 unidades. El valor de a^* no presentó diferencia ($P>0.05$) entre los tres tipos de empaques evaluados durante el periodo de almacenamiento, con promedios de 14.5, 17.4, 17.4 y 17.8 para 0, 7, 14, 21 d, respectivamente. El b^* solo fue igual entre los tres

empaques el día 0 (3.8). En el séptimo día de refrigeración el ES obtuvo el valor mayor ($P<0.05$) valor y el EV obtuvo el valor más bajo, ocasionando un decremento de 4.4 unidades. En el día 14, el T y ES fueron iguales con un promedio de 11.0, pero diferente al EV, disminuyendo 3.6 unidades. Al final de la evaluación (21 días) los tres empaques se comportaron diferente ($P<0.05$), siendo el ES el de mayor valor y el EV el de menor, representando una caída de 5.0 unidades.

Cuadro 1. Efecto del tiempo de almacenamiento y de los tipos de empaque en el pH y color de la carne de conejo

	Tiempo de almacenamiento (días)			
	0	7	14	21
<i>Testigo</i>				
pH	6.65 ^{cA} ± 0.05	5.70 ^{aA} ± 0.01	5.74 ^{aA} ± 0.05	6.28 ^{bC} ± 0.14
L*	58.97 ^{cA} ± 1.03	57.60 ^{bcA} ± 0.48	56.44 ^{abA} ± 0.47	55.30 ^{aAB} ± 0.53
a*	14.62 ^{aA} ± 0.86	17.34 ^{bA} ± 0.39	17.16 ^{bA} ± 0.46	17.93 ^{bA} ± 0.85
b*	4.11 ^{aA} ± 0.80	9.57 ^{bB} ± 0.23	10.54 ^{bB} ± 0.27	10.11 ^{bB} ± 0.31
<i>Semipermeable</i>				
pH	6.69 ^{cA} ± 0.05	5.74 ^{aA} ± 0.04	5.71 ^{aA} ± 0.03	6.07 ^{bB} ± 0.11
L*	60.05 ^{cAB} ± 1.26	57.55 ^{bA} ± 0.53	56.98 ^{bA} ± 0.66	53.64 ^{aA} ± 0.73
a*	15.06 ^{aA} ± 1.14	17.97 ^{bA} ± 0.43	17.96 ^{bA} ± 0.42	18.47 ^{bA} ± 0.47
b*	3.98 ^{aA} ± 0.88	11.45 ^{bC} ± 0.35	11.53 ^{bB} ± 0.27	12.29 ^{bC} ± 0.39
<i>Vacío</i>				
pH	6.80 ^{bA} ± 0.05	5.65 ^{aA} ± 0.03	5.68 ^{aA} ± 0.03	5.83 ^{aA} ± 0.03
L*	61.89 ^{cBC} ± 0.78	58.20 ^{bA} ± 0.51	56.50 ^{abA} ± 0.78	56.08 ^{aBC} ± 0.45
a*	13.71 ^{aA} ± 0.67	17.00 ^{bA} ± 0.36	16.95 ^{bA} ± 0.37	17.01 ^{bA} ± 0.29
b*	3.19 ^{aA} ± 0.41	7.06 ^{bA} ± 0.21	7.45 ^{bA} ± 0.21	7.26 ^{bA} ± 0.16

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma filas indican diferencias entre los días de almacenamiento ($P<0.05$). ^{A,B,C} Medias con distinta literal en la misma columna indican diferencias entre los tipos de empaques ($p<0.05$).

El Cuadro 2 muestra la concentración de las AB de PU, CA e HI y el conteo bacteriano en carne de conejo almacenada durante 21 d. En el empaque T la PU e HI fueron similares ($P>0.05$) hasta el día 7, con promedios de 1.30 y 5.79 mg/kg, respectivamente. Posteriormente, incrementaron 27.8 y 4.8 unidades la PU e HI respectivamente, del día 0 al 21. La CA fue similar ($P>0.05$) durante todo el periodo de valoración, con un promedio de 2.67 mg/kg. El ES fue similar ($P>0.05$) en la concentración de PU hasta el día 7 de refrigeración, con una media de 1.0 mg/kg. Sin embargo, después aumentó 17.3 y 41 unidades desde los días 14 y 21, respectivamente. En la comparación del día 14 vs. 21 hubo diferencia significativa ($P<0.05$), incrementando 23.7 unidades. La concentración de HI se mantuvo igual hasta el séptimo día (6.22 mg/kg promedio), y con el transcurso del tiempo se incrementó en 2.61 unidades. La CA del T no presentó cambios ($P>0.05$) durante el periodo de almacenamiento. La PU de EV fue constante ($P>0.05$) hasta los 14 d de refrigeración, con un promedio de 1.01 mg/kg. Sin embargo, al final de la evaluación incrementó 14.9 unidades. La CA no mostró diferencia ($P>0.05$) entre los días 0, 7 y 21 con un promedio de 3.18 mg/kg; pero en el 14d incrementó 2.41 unidades. La HI fue similar entre el día 0 y 7 y entre los días 0, 14 y 21 con medias de 5.40 y 7.06 mg/kg, respectivamente. El menor valor fue en el 7d y el mayor en el 21d, con aumento de 3.56 unidades.

Cuadro 2. Efecto del tiempo de almacenamiento y de los tipos de empaque en el contenido de aminas biogénicas (mg/kg) y conteo microbiano (Log ufc/g).

	Tiempo de almacenamiento (días)			
	0	7	14	21
Testigo				
<i>Aminas biogénicas</i>				
Putrescina	1.47 ^{aA} ± 0.23	1.13 ^{aA} ± 0.18	20.36 ^{bB} ± 9.26	29.08 ^{bAB} ± 7.42
Cadaverina	2.89 ^{aA} ± 0.45	2.75 ^{aA} ± 0.39	2.84 ^{aA} ± 0.47	2.20 ^{aA} ± 0.60
Histamina	6.09 ^{aA} ± 0.85	5.49 ^{aA} ± 0.26	8.47 ^{bA} ± 0.99	10.62 ^{bA} ± 1.59
<i>Recuento microbiano</i>				
Enterobacterias	NI	3.69 ^{aA} ± 0.89	3.83 ^{aAB} ± 1.23	6.02 ^{aB} ± 0.83
Mesófilos aerobios	2.24 ^{aA} ± 0.57	4.07 ^{abA} ± 0.24	5.66 ^{bB} ± 0.49	4.95 ^{bA} ± 0.77
Semipermeable				
<i>Aminas biogénicas</i>				
Putrescina	1.31 ^{aA} ± 0.20	0.67 ^{aA} ± 0.04	18.30 ^{bB} ± 7.34	41.98 ^{cA} ± 9.83
Cadaverina	2.84 ^{aA} ± 0.52	3.49 ^{aA} ± 0.44	2.03 ^{aA} ± 0.21	2.23 ^{aA} ± 0.20
Histamina	5.83 ^{aA} ± 0.64	6.60 ^{aA} ± 0.46	8.79 ^{bA} ± 0.91	8.87 ^{bA} ± 1.41
<i>Recuento microbiano</i>				
Enterobacterias	3.33 ^a ± 0.70	NI	6.05 ^{aB} ± 0.64	3.99 ^{aAB} ± 1.352
Mesófilos aerobios	3.54 ^{bcA} ± 0.58	2.53 ^{abA} ± 0.62	4.29 ^{bcAB} ± 1.19	4.87 ^{cA} ± 0.70
Vacío				
<i>Aminas biogénicas</i>				
Putrescina	1.40 ^{aA} ± 0.20	0.44 ^{aA} ± 0.03	1.19 ^{aA} ± 0.16	15.93 ^{bBC} ± 5.08
Cadaverina	2.71 ^{aA} ± 0.83	3.62 ^{aA} ± 0.64	5.59 ^{bB} ± 1.13	3.20 ^{aA} ± 1.30
Histamina	5.94 ^{abA} ± 0.54	4.86 ^{aA} ± 0.46	6.83 ^{bcA} ± 0.58	8.42 ^{bcA} ± 0.91
<i>Recuento microbiano</i>				
Enterobacterias	NI	3.30 ^{aA} ± 0.10	1.98 ^{aA} ± 0.08	2.32 ^{aA} ± 0.34
Mesófilos aerobios	3.19 ^{aA} ± 0.50	3.36 ^{aA} ± 0.27	2.99 ^{aA} ± 0.79	4.34 ^{aA} ± 1.03

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma filas indican diferencias entre los días de almacenamiento (P<0.05). ^{A,B,C} Medias con distinta literal en la misma columna indican diferencias entre los tipos de empaques (p<0.05).

El contenido de PU no mostró diferencias (P>0.05) entre los tipos de empaques a los 0 y 7 d de almacenamiento, obteniendo promedios de 1.39 y 0.75 mg/kg, respectivamente. En el 14 d el empaque T y ES tuvieron un contenido similar (19.33 mg/kg), mientras que el EV disminuyó (P<0.05) 18.14 unidades. Al día 21 de almacenamiento la PU en el empaque T y ES fue similar (P>0.05), pero los empaque ES y EV fue diferente (P<0.05) con un decremento del 26.05 unidades.

En CA no hubo diferencia ($P>0.05$) entre empaques a los 0, 7 y 21 d. En el días 14 el T y ES fueron similares, en promedio tuvieron 2.44 mg/kg, mientras el EV incrementó 3.16 unidades. La HI no presentó diferencias ($P>0.05$) entre los tipos de empaques durante los días de conservación. La mayor concentración de PU se dio en el ES, la CA en el EV y la HI en el T, todas al final del periodo experimental.

El conteo bacteriano de enterobacterias en el empaque T fue similar ($P>0.05$) durante todo el periodo de evaluación. La identificación de mesófilos aerobios fue similar hasta el 7 d, pero después hubo un incremento en los 14 y 21 d con 1.6 y 0.9 unidades, respectivamente. Los resultados de enterobacterias en el grupo ES, no presentó diferencias ($P>0.05$) durante los días de almacenamiento. En este mismo empaque la cantidad de mesófilos aerobios en los días 14 y 21 fueron mayores en comparación con el 7 d (1.8 y 2.34 unidades de incremento). Los conteos bacterianos del EV no tuvieron diferencias estadísticas ($P>0.05$).

La comparación entre los tipos de empaques en el conteo de enterobacterias al inicio del experimento (0 d), no se pudo realizar por falta de crecimiento bacteriano en el empaque T y EV. La cantidad de enterobacterias a los 7 d no presentó diferencias ($P>0.05$). Sin embargo, en el día 14, el mayor conteo se obtuvo en el grupo ES (6.05) y el más bajo en el EV (1.98). En el día 21 la comparación entre el empaque T y ES fueron similares ($P>0.05$), pero diferentes ($P<0.05$) entre el T y EV teniendo un decremento de 3.7 unidades. El conteo mesófilos aerobios no tuvo diferencias ($P>0.05$) en los días 0, 7 y 21 entre los tipos de empaques. Pero en el 14 d, la comparación entre los grupos T y EV disminuyó 2.7 unidades.

Las Gráficas 1, 2 y 3 muestran el contenido de AB, donde se observa que a partir del 7d de refrigeración se incrementó ($P<0.05$) el contenido de PU en el empaque T y ES. En el EV fue hasta

el 14 d. La CA e HI se mantuvieron constantes en los tres tipos de empaques al transcurrir los días en refrigeración de las muestras de carne de conejo.

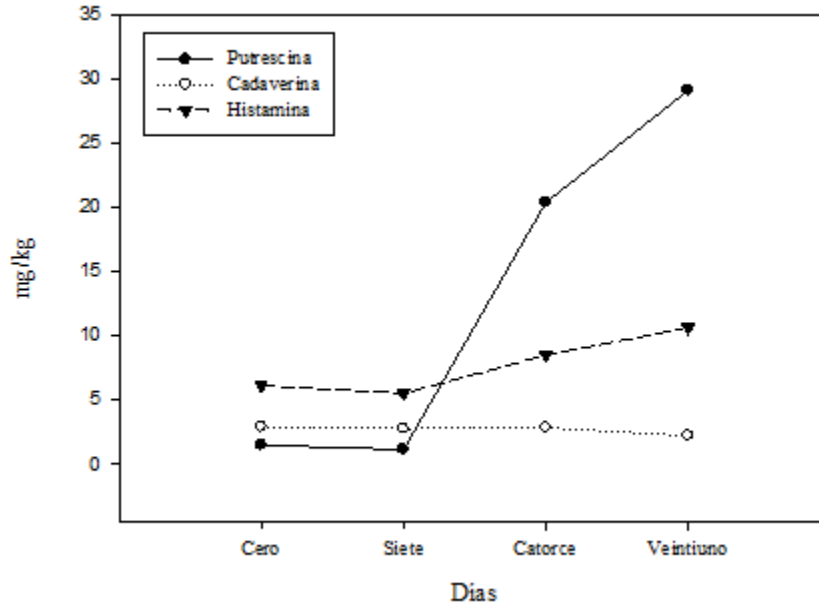


Figura 1. Concentración de aminas biogénicas en carne de conejo en el empaque testigo.

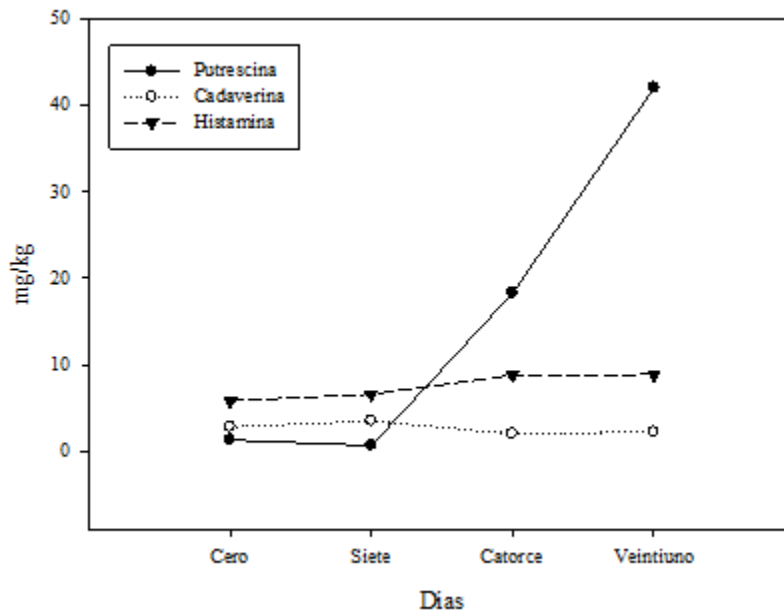


Figura 2. Concentración de aminas biogénicas en carne de conejo en el empaque semipermeable.

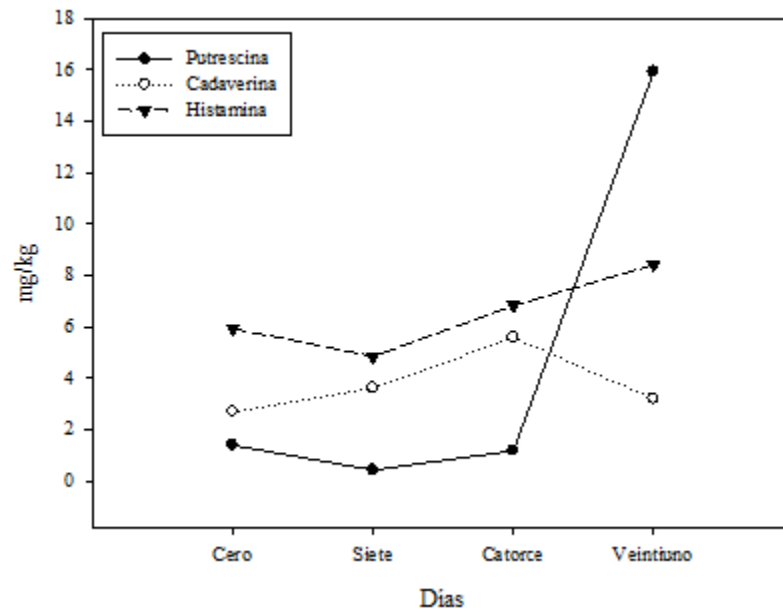


Figura 3. Concentración de aminas biogénicas en carne de conejo en el empaque al vacío.

Discusión

pH

El descenso del pH fue constante con el tiempo en el EV, mientras que en los grupos T y ES descendió a los 14 d de refrigeración y luego incrementó a los 21 d. Esta última respuesta indica falta de producción del ácido láctico en la carne (Amerling, 2001), ocasionado por la posible proliferación de bacterias piógenas en el tejido; lo cual se corroboró con el análisis del conteo bacteriano, encontrándose mesófilos aerobios y enterobacterias.

Cuando la carne se contamina con bacterias como *Acinobacter*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* y hongos como *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Sporotrichum*, se producen compuestos alcalinos que consumen el ácido láctico presente, y elevan nuevamente el pH (Barreriro y Sandoval, 2006; Huit et al., 2013). Al respecto, Signorini (2007) y Bitá *et al.* (2015) mencionan que después de la actividad microbiana durante el proceso de descomposición de la carne, se produce más amoníaco, indicando un catabolismo de aminoácidos y en consecuencia el aumento del pH es inevitable.

El pH de la carne de conejo se reporta de 6.4 y 5.8 a las 24 h de sacrificio (Lazzaroni *et al.* 2009), mientras no exceda de más de 6.5, se considera adecuado (María *et al.*, 2006). Sin embargo, la carne conservada sin empaque o con ES es más común que no descienda el pH a través del tiempo (Bitá *et al.* (2015). El EV permitió prolongar la vida de anaquel de la carne de conejo y el pH fue el principal factor limitante para el crecimiento bacteriano (Yang *et al.*, 2014).

Color

El color, es el principal atributo que el consumidor percibe y juzga a simple vista para adquirir el producto (Charles *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2008). En los 3 tipos de empaques evaluados, el índice L* disminuyó y los índices a* y b* aumentaron con el tiempo en refrigeración; comportamientos similares han sido reportado por otros autores en carne de bovino (Oliete *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2008). La L* depende del estado físico global de la carne, es decir, sus características dependen de las concentraciones de cada una de las 3 formas químicas que puede adoptar la mioglobina, la cual puede ser reducida a oximioglobina y metamioglobina. Esta última favorece su formación superficial en los almacenamientos prolongados, en consecuencia incrementa la concentración salina y hay deshidratación (Gil, 2010). El índice a* y b* se elevan durante la maduración de la carne, debido a una mayor penetración de la luz y a un aumento de la reflectancia (Irantzu, 2010). Cuando los empaques fueron abiertos después de cumplir sus tiempos en refrigeración; la mioglobina puede ser capaz de dar una coloración intensa (Li *et al.*, 2012). Esto es la razón por la cual el valor de a* y b* aumentaron con el almacenamiento y la exposición al aire, ya que si bien es cierto que el almacenamiento induce la oxidación de oximioglobina (color rojo brillante) en metamioglobina (color marrón), y en consecuencia disminuye el enrojecimiento a*, ocasionado por la desnaturalización del pigmento hemo (Maqsood *et al.*, 2016). También es que el contacto de la carne con el oxígeno hace que la mioglobina se transforme en oximioglobina, presentándose el color rojo brillante en la carne (Amerling, 2001).

Aminas y microbiología

La descomposición de la carne de conejo fue lenta durante los primeros siete días de almacenamiento, después de este periodo las concentraciones de las aminas incrementaron,

principalmente PU. Del mismo modo Tamim y Doerr (2003) y Bitá *et al.* (2015) no detectaron incrementos en la concentración de aminas biogénicas en los primeros días de observación. Otros autores también han reportado mayores concentraciones de PU (Kaniou *et al.*, 2001; Signorini y Guerrero, 2009) y CA (Balamatsia *et al.* 2006) en carne de pollo almacenada a 4° C durante 17 días, como resultado de una proliferación de *Pseudomonas*, ocasionada por las condiciones aerobias y algunos problemas en la falta de congelación (37 °C). La presencia de microflora especializada en la descarboxilación de la arginina o la existencia de una interacción entre diferentes grupos microbianos que, en conjunto, generen una mayor producción de PU. Al respecto, Tamin y Doerr, (2003) e Izquierdo *et al.* (2006) mencionan que la producción de PU requiere la acción combinada de bacterias ácido lácticas y enterobacterias, debido a que su precursor, la ornitina que no es un aminoácido proteínico requiere del crecimiento de microorganismos para la descarboxilación de otros aminoácidos. Por lo que la PU podría ser un indicador de que se está dando una descomposición de la carne por la contaminación de enterobacterias y bacterias ácido lácticas. En cambio CA se forma directamente a partir de la lisina a través de la lisina descarboxilasa y no requiere de entrada de microorganismos distintos de los que tienen la enzima lisina descarboxilasa. La mayor concentración de PU también puede ser porque su formación es por la degradación de glutamina, arginina y agmatina. La arginina se convierte fácilmente a agmatina mediante la descarboxilación de la arginina por la agmatina deiminasa, y es transformada a PU. La actividad bacteriana en la ornitina pueden ser degradada a PU por ornitina descarboxilasa (Bover *et al.*, 2005; Jairath *et al.*, 2015).

La mayor concentración de HI en comparación con CA también fue observada por otros autores (Kaniout *et al.* 2001; Galgano *et al.* 2009). Las concentraciones de CA e HI a los 7 días de almacenamiento fueron mayores en nuestro estudio, cuando se comparó con carne de bovino

(Galgano *et al.*, 2009: CA=1.85 e HI: 2.11 mg/kg). Pero las concentraciones halladas no representan peligro de intoxicación. En salchicha de pavo se menciona el límite tolerable de 10 mg, y 100 mg induce toxicidad media y 1000 mg es altamente tóxico (Rabie *et al.*, 2014; Jairath *et al.*, 2015). La putrescina y cadaverina tienen menos actividad biológica que la histamina, porque se necesitaría ingerir grandes cantidades de estas aminas antes de observar las reacciones de intoxicación. La importancia de ambas aminas, radica en su capacidad para potenciar las respuestas tóxicas causadas por la histamina, mediante un aumento en su tasa de absorción (Andreea, 2000; Pircher *et al.*, 2007; Gonca *et al.*, 2011). Pero la determinación exacta del umbral de toxicidad de aminas biogénicas en un producto alimenticio es extremadamente difícil, porque su efecto no depende de su presencia por sí sola, sino también es influenciado por otros compuestos y por la eficiencia específica de los mecanismos de desintoxicación del individuo (Jairath *et al.*, 2015). En base a los resultados obtenidos, la vida de anaquel de la carne de conejo puede ser de hasta 14 días. Al igual, el empaque más apropiado para conservar en buen estado la carne fue el EV, al contener menor concentración de aminas biogénicas en comparación con el T y ES.

En nuestra investigación, el incremento en los niveles de AB se dio con el tiempo de refrigeración y fueron menores a lo reportado en la carne de pollo (Balamatsia *et al.*, 2006; Aquiles *et al.*, 2015). Sin embargo, la calidad en la carne no debe superar valores de 10-35 mg/kg de PU o CA (Matejková *et al.*, 2013). Vinci y Antonelli (2002) evaluaron el contenido de AB en carne roja (bovino) y carne blanca (pollo); encontrando que éstas difieren por los dos tipos de carne durante el almacenamiento. Las diferencias entre las especies pueden ser debidas al tamaño de fibras musculares; en las aves son más cortas y como consecuencia son fácilmente atacadas por las enzimas proteolíticas; ocasionando que haya mejor disponibilidad de precursores de aminoácidos

para la producción de AB. La carne de conejo también tiene fibras pequeñas, pero el contenido de colágeno del *Longissimus* es mayor (7.0 mg/g) cuando se compara con el colágeno de cerdos (5.9 mg/g), bovinos (3.4-5.8 mg/g) y pollos (3-4 mg/g), el valor ocasiona mayor dureza de la carne y posiblemente impide el ataque de las enzima proteolíticas y como consecuencia una menor disponibilidad de los precursores de los aminoácidos para la formación de AB (Pascual y Pla, 2008). Así que el menor contenido de AB en la carne de conejo se puede deber a éste efecto explicado y también a la actividad aminoacil-descarboxilasa influida por bacterias (Balamatsia *et al.*, 2006; Galgano, 2009) y efectos de la temperatura, disponibilidad de oxígeno, potencial redox, y el pH (Álvarez, 2005; Fraqueza *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a que las AB son metabolitos formados a partir de la descarboxilación de aminoácidos a causa de las enzimas de las bacterias (Baptista *et al.*, 2014), su contenido puede variar durante el almacenamiento por cambios los grupos de bacterias productoras de éstas AB (Izquierdo *et al.*, 2006).

La composición de los gases en un ambiente dado (aeróbico/vacío) determina el tipo de flora microbiana (bacterias Gram-negativas frente a Gram-positiva) que domina el sustrato (Balamatsia *et al.*, 2006). Por ello los empaques influyen en el retraso de la producción de AB, debido a la inhibición de los microorganismos o la enzima producidas (Jairath *et al.*, 2015). Después de valorar los días de almacenamiento con los tres tipos de empaques, se observó que el EV tuvo una menor concentración de AB y bacterias, lo que demuestra su eficacia en la conservación de la carne de conejo (Kaniou *et al.*, 2001; Signorini *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2008). Según Maqsood *et al.* (2016). La carne con EV extiende la vida útil por las condiciones de anaerobiosis, limitando el crecimiento de bacterias dependientes del oxígeno. Las bacterias más comunes son acido lácticas,

éstas ayudan a controlar el crecimiento de otras como los mesófilos aerobios y enterobacterias (Balamatsia *et al.*, 2006; Gómez y Lorenzo, 2012).

La carne de conejo es rica en lisina (8.7 mg/g) que es el aminoácido precursor de la CA (Blas, 2010) y su producción se asocia con la presencia de enterobacterias (Bover *et al.*, 2005). Sin embargo, durante todo el periodo experimental el contenido de estas bacterias se mantuvo constante en los tres tipos de empaques y la cantidad fue menor a lo reportado por otros autores (Balamatsia *et al.*, 2006; Galgano *et al.*, 2009), lo que hace suponer que la menor cantidad se asocia con menor concentración de CA. Pero la producción de PU se asocia con la presencia de mesofilos, éstas bacterias aumentan con los días de almacenamiento (Ercolini *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2009). Es difícil tener una correlación directa entre los recuentos de microorganismos y contenido de AB, ya que las capacidades de las diferentes bacterias productoras de aminos difieren ampliamente (Bover *et al.*, 2005). La importancia en el recuento de las bacterias incide más en el grupo de enterobacterias como productoras importantes de AB. Actualmente hay interés en su detección en los alimentos, debido a que estos compuestos son un riesgo para la salud pública por sus efectos toxicológicos relacionados con el consumo de productos con altas concentraciones de algunas aminos (tiramina, histamina) y concentración indica la calidad higiénica de la carne (Balamatsia *et al.*, 2006; Ercolini *et al.*, 2006; Bunkov un *et al.*, 2010; Hutarova *et al.*, 2013; Bitá *et al.*, 2015; Aquiles *et al.*, 2015).

Conclusiones

El almacenamiento afectó el color de la carne y la concentración de AB, se disminuyó la luminosidad e incrementó los valores a^* y b^* . La putrescina, cadaverina e histamina estuvieron condicionadas por el tiempo de conservación y el tipo de empaque. La principal amina formada en la carne de conejo fue la PU, por ello se sugiere que la carne de conejo pueda ser almacenada en condiciones de refrigeración hasta por 7 días sin empacar. Pero si se desea prolongar la vida de anaquel, lo más recomendable es el EV. La producción de AB está directamente relacionada con el crecimiento microbiano.

Literatura Citada

- Álvarez GMA 2005. Las aminos biógenas en los alimentos. *Agrocsic CTC Alimentación* 26, 84-90.
- Amerling C. 2001. *Tecnología de la Carne, Antología*. Primera Edición. Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica.
- Andree NC 2000. The quantification of biogenic amines in low-temperature stored vacuum-packaged and carbon dioxide modified atmosphere-packaged fresh pork. Thesis of The University of Manitoba, Ottawa Canada.
- Aquiles, L. C., Conte, J. C. A., Canto, C. A., Guerra, M. M. L., Costa, L. B., Gomes, C. A., Teixeira, M. E., Maia FR 2015. Biogenic amines as bacterial quality indicators in different poultry meat species. *LWT - Food Science and Technology* 60, 15-21.
- Balamatsia CC, Paleologos EK, Kontominas MG, Savvaidis IN 2006. Correlation between microbial flora, sensory changes and biogenic amines formation in fresh chicken meat stored aerobically or under modified atmosphere packaging at 4 oC: possible role of biogenic amines as spoilage indicators. *Antonie van Leeuwenhoek* 89, 9-17.
- Barreiro MJA y Sandoval BAJ 2006. *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas*. Primera Edición, segunda reimpresión. Editorial Equinoccio. Caracas, Venezuela.
- Blas C, Wiseman J, 2010. *Nutrition of the Rabbit*. Segunda Edición. Impreso en Reino Unido: CPI Anthony Rowe Ltd.

- Bitá S, Malekpouri P, Mohammadian T, Najafzadeh VH, Kochanian P, 2015. Changes in biogenic amines and microbial loads in the muscle of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) during ice storage. *J Food Sci Technol* 52 (1), 240-248.
- Bover CS, Latorre MML, Garriga M, Vidal CMC 2005. Aminas biógenas en productos cárnicos: un repaso a su origen, importancia y control. *EUROCARNE* 141, 1-6.
- Charles N, Williams SK, Rodrick GE 2006. Effects of Packaging Systems on the Natural Microflora and Acceptability of Chicken Breast Meat. *Poultry Science* 85, 1798-1801.
- Ercolini D, Russo F, Torrieri E, Masi P, Villani F 2006. Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (7), 4663-467.
- Flores RC, Leal M, Ruiz RJ, Sánchez E, Moreno M, Castro G, Barboza Y. 2011. Tiempo de almacenamiento e identificación de bacterias ácido lácticas en carnes de res picada empacadas al vacío. *Revista Científica FCV-LUZ* 21 (5), 425-433.
- Franco J, Feed O, Bianchi G, Garibotto G, Ballesteros F, Nan F, Percovich M, Piriz M, Bentancur O 2008. Parámetros de calidad de carne en cinco músculos de novillos Holando durante la maduración post-mortem. *Agrociencia* 12 (1), 69-73.
- Gil HA 2010. Tratado de Nutrición. Tomo II. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Segunda Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Galgano F, Favati F, Bonadio M, Lorusso V, Romano P. 2009. Role of biogenic amines as index of freshness in beef meat packed with different biopolymeric materials. *Food Research International* 42, 1147-1152.
- Goenaga UI 2010. Estabilidad del color de la carne de ternera. Tesis. Universidad Pública de Navarra. Pamplona, Navarra, España.

- Gonca A, Sükriye AH, Olcay H, Hüseyin G 2011. Biogenic amines formation in Atlantic bonito (*Sarda sarda*) Wllets packaged with modiWed atmosphere and vacuum, wrapped in chitosan and cling Wlm at 4 °C. *Eur Food Res Technol* 232, 23-28.
- Hui YH, Guerrero I, Rosmini MR 2013. *Ciencia y tecnología de carnes*. Editorial Limusa. México D. F.
- Jairath G, Kumar SP, Chaudhari M, Singh DR, Rani M. 2015. Biogenic amines in meat and meat products and its public health significance: a review. *Food Scientists & Technologists*.
- Izquierdo P, Allara M, García A, Torres G, Rojas E, Piñero MY 2006. Aminas biógenas y bacterias en salchichón tipo milano: efecto del tiempo de almacenamiento. *Revista Científica, FCV-LUZ* 26 (2), 186-194.
- Kaniou I, Samouris G, Mouratidou T, Eleftheriadou A, Zantopoulos N 2001. Determination of biogenic amines in fresh unpacked and vacuum-packed beef during storage at 4 °C. *Food Chemistry* 74, 515-519.
- Kaniou I, Samouris G, Mouratidou T, Eleftheriadou A, Zantopoulos N 2001. Determination of biogenic amines in fresh unpacked and vacuum-packed beef during storage at 4oC. *Food Chemistry*. 74: 515-519.
- Lázaro CA, Conte-Júnior CA, Cunha FL, Mársico ET, Mano SB, Franco RM 2013. Validation of an HPLC Methodology for the Identification and Quantification of Biogenic Amines in Chicken Meat. *Food Anal. Methods* 6, 1024-1032.
- Lazzaroni C, Biagini D, Lussiana C 2009. Different rearing systems for fattening rabbits: Performance and carcass characteristics. *Meat Science* 82, 200-204.

- Li X, Lindahl G, Zamaratskai G, Lundstrom 2012. Influence of vacuum skin packaging on color stability of beef longissimus lumborum compared with vacuum and high-oxygen modified atmosphere packaging. *Meat Science* 92, 604-609.
- Maqsood S, Haddad NAA, Mudgil P, 2016. Vacuum packaging as an effective strategy to retard off-odour development, microbial spoilage, protein degradation and retain sensory quality of camel meat. *Food Science and Technology* 72, 55-62.
- María GA, Buil T, Liste G, Villaroel M, Sañudo C and Olleta J L 2006. Effects of transport time and season on aspects of rabbit meat quality. *Meat Science* 72, 773-777.
- Matejková K, Krížek M, Vácha F, Dadáková E 2013. Effect of high-pressure treatment on biogenic amines formation in vacuum-packed trout flesh (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry* 137, 31-36.
- Min JS, Lee SA, Jang A, Jo C, Lee M 2007. Irradiation and organic acid treatment for microbial control and the production of biogenic amines in beef and pork. *Food Chemistry* 104, 791-799.
- Oliete B, Moreno T, Carballo JA, Monserrat L, Sánchez L 2006. Estudio de la calidad de la carne de ternera de raza rubia gallega a lo largo de la maduración al vacío. *Arch. Zootec* 55 (209), 3-14.
- Pascual M, Pla M 2008. Changes in collagen, texture and sensory properties of meat when selecting rabbits for growth rate. *Meat Science* 78, 375-380.
- Pircher A, Bauer F, Paulsen P 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *Eur Food Res Technol* 226, 225-231.

- Rabie MA, Peres C, Malcata FX 2014. Evolution of amino acids and biogenic amines throughout storage in sausages made of horse, beef and turkey meats. *Meat Science* 96, 82-87.
- Ruiz CC and Jiménez CF 2004. Biogenic amine content in Spanish retail market meat products treated with protective atmosphere and high pressure. *Eur Food Res Technol* 218, 237-241.
- Signorini M 2007. Microbiología de carnes envasadas al vacío y la biopreservación como medio para prolongar la vida de anaquel. *NACAMEH* 1 (1), 26-40.
- Signorini ML, Guerrero LI 2009. Producción de aminas biogénicas en carne de bovino conservada con ácido láctico de origen químico y bacteriano. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 8 (1), 41-49.
- Tamin NM, Doerr JA 2003. Effect of Putrefaction of Poultry Carcasses Prior to Rendering on Biogenic Amine Production. *Poultry Science* 12, 456-460.
- Vinci G, Antonelli ML 2002. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. *Food Control* 13, 519-524.
- Yang X, Youssef MK, Gill CO, Badoni M, López CO 2014. Effects of meat pH on growth of 11 species of psychrotolerant clostridia on vacuum packaged beef and blown pack spoilage of the product. *Food Microbiology* 39, 13-18.

Conclusiones generales

La respuesta a los diferentes tipos de estrés en los conejos con plataforma fija con vibración, y con transporte presentaron diferencias fisiológicas. El transporte de los conejos ya sea en periodos cortos (30 min) o largos (60 min) puede causar respuestas significativas en algunos parámetros sanguíneos como es el aumento de glucosa y lactato, pero estas alteraciones no afectaron las características fisicoquímicas de la carne. Lo que puede resultar una ventaja para la carne de conejo en comparación con otras especies animales; las cuales el transporte sí las afecta. Sin embargo, a pesar de que el estrés no repercutió en la calidad físico-química de la carne, existen otros aspectos a lo que también se le tiene que poner énfasis en lo que respecta a la inocuidad; tal es el caso del tiempo y forma de conservación. En la carne de conejo se incrementó la concentración de AB con los días de almacenamiento en refrigeración. La amina con mayor presencia en este tipo de carne fue la putrescina a partir del séptimo día; por lo que se sugiere, consumir antes de los 7 días cuando ésta carne no está empacada. En el caso de que se utilicen empaques semipermeables; la conservación es por más tiempo, considerando que el empaque al vacío prolonga la vida de anaquel de la carne y retarda la proliferación de bacterias y concentración de AB.