



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIDAD IZTAPALAPA

**EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE ROMERO
(*Rosmarinus officinalis* L.), DE SALVIA DE BOLITA (*Buddleia
perfoliata* Kunth) Y DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.) Y
CAMBIOS EN LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y
FUNCIONALES DE UNA PASTA DE CARNE CRUDA DE CERDO**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A
M. en B. Elvia Hernández Hernández**

Directora de tesis: Dra. Isabel Guerrero Legarreta

México, D. F., Abril de 2009

El posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón Nacional de Posgrado (PNP) del CONACYT, con categoría de alto nivel, con el convenio 471-0/Doctorado en Biotecnología.

Este trabajo de investigación fue realizado con una beca de grado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Iztapalapa, D. F., a 14 de Abril de 2009.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.), DE SALVIA DE BOLITA (*Buddleia perfoliata* Kunth) Y DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.) Y CAMBIOS EN LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES DE UNA PASTA DE CARNE CRUDA DE CERDO

que presentó

ELVIA HERNANDEZ HERNANDEZ

Directora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

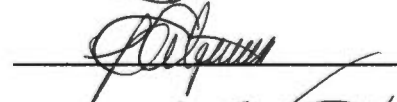


Jurado:

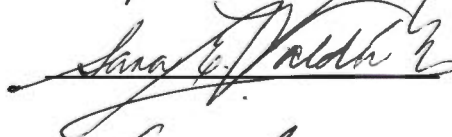
Asesora: Dra. María Eugenia Jaramillo Flores
Instituto Politécnico Nacional



Asesora: Dra. Edith Ponce Alquicira
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



Sinodal: Dra. Sara Esther Valdés Martínez
Universidad Nacional Autónoma de México



Sinodal: Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



DEDICATORIA

- ❖ A dios por prestarme la vida y permitirme hacer realidad el deseo de ser Doctora en Biotecnología.
 - ❖ A César por ser un esposo que siempre me ha brindado comprensión y apoyo, por mostrarme que con cariño, dedicación y paciencia podemos alcanzar las metas que nos hemos fijado.
 - ❖ A Gustavo y David, mis queridos hijos. Gracias por estar conmigo apoyándome, escuchándome, dándome su cariño y tenerme paciencia en todo momento.
 - ❖ A Manuel y Margarita, por ser excelentes padres que siempre me han animado y apoyado en los proyectos que me he trazado sin importar todos los sacrificios que ello representara.
 - ❖ A María Luisa, mi suegra por su ayuda y afecto incondicional.
 - ❖ A Daniel mi hermano, Natalia, Elizabeth y Daniel, porque con su cariño, apoyo y comprensión he alcanzado la meta propuesta.
 - ❖ A Joel y Gabriel, mis hermanos, Aurora, Abraham y Ariana que aunque estén lejos siempre me han apoyado.
 - ❖ A Olga, Enrique, Marlene, Enrique y Allan, por su cariño, comprensión y ayuda.
 - ❖ A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta por mostrarme que el trabajo con ahinco y el interés por las personas que nos rodean hace que se disfrute la realización de las tareas propuestas. Gracias por escucharme y guiarme cada vez que fue necesario.
 - ❖ A las Dras. Edith Ponce Alquicira y María Eugenia Jaramillo Flores por asesorarme en el desarrollo de esta tesis.
 - ❖ A Raquelita y Miriam por ser tan especiales escuchándome y apoyándome en todo este tiempo, por brindarme sus conocimientos y animarme en la escritura de la tesis y, por hacerme participe de momentos tan agradables e inolvidables.
 - ❖ A Jarumi, Basy, Octavio, Magda, Yeny, Isadora, Miriam Ivette y Lety, por el gran apoyo que me brindaron siempre que lo necesité y por ser excelentes compañeros.
-

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa por haberme dado la oportunidad de formarme como Ingeniero en Alimentos, Maestra en Biotecnología y ahora como Doctora en Biotecnología.
 - ❖ A CONACYT por el apoyo económico recibido durante el desarrollo del Doctorado en Biotecnología.
 - ❖ A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta por brindarme su apoyo, confianza, consejos y comprensión en momentos difíciles que se presentaron durante el desarrollo de esta tesis.
 - ❖ Al Dr. Francisco Cruz Sosa por su atención y comentarios sobre botánica.
 - ❖ Al Dr. Raúl Alcántara García por brindarme su tiempo y resolver mis dudas en química orgánica.
 - ❖ Al Dr. José Ramón Verde Calvo por apoyarme en la resolución de dudas relacionadas con el cromatógrafo de líquidos.
 - ❖ A los Drs. Adolfo Espejo Serna, Ana Rosa López Ferrari y Jorge Santana, del Herbario Metropolitano "Dr. Ramón Riba y Nava Esparza" de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, por la identificación taxonómica del orégano.
 - ❖ A las Dras. Sara Esther Valdés Martínez y Gabriela Mariana Rodríguez Serrano por la revisión y sugerencias a esta tesis.
-

Sé optimista:

Sé tan fuerte que nada pueda turbar la paz de tu mente.

Habla a todos de salud, felicidad y prosperidad.

Haz que los demás sientan siempre que hay algo bueno en ellos.

Mira siempre el lado luminoso de las cosas y haz que tu optimismo se realice.

Sé tan entusiasta del éxito de tu amigo como si se tratara de tu propio éxito.

Olvida los errores del pasado y lucha por las grandes consecuencias del futuro.

Sonríe siempre y que tu sonrisa sea para todos.

*Dedica tanto tiempo a tu adelanto personal que no te quede un momento por
encontrar defecto en los demás.*

*Sé suficientemente tolerante, firme y generoso para combatir la pesadumbre y el
miedo, y suficientemente feliz para no permitir la presencia de la inquietud.*

RESUMEN

La utilización de antioxidantes naturales ha aumentado, no sólo por la demanda del consumidor por alimentos naturales, también por un incremento en las limitaciones legales sobre la utilización de antioxidantes sintéticos, debido a sus posibles efectos carcinogénicos. Las hierbas y especias se utilizan como ingredientes tradicionales de los alimentos, además de sus características antioxidantes. Se han hecho estudios sobre la actividad antioxidante de las plantas completas de especias y de sus extractos; los resultados indican que una gran cantidad de extractos son tan efectivos como los antioxidantes sintéticos BHA, BHT. Son de primera importancia los compuestos fenólicos debido a su capacidad antioxidante.

Una pasta cárnica es un sistema de dispersión similar a una emulsión aceite en agua. Las pastas cárnicas, debido a su composición que incluye compuestos fácilmente oxidables como los pigmentos (hemoglobina y mioglobina) y lípidos insaturados, están sujetas a la acción de diversos agentes oxidantes, lo que deteriora su calidad. La oxidación de los pigmentos y de los lípidos puede retrasarse de varias formas, una de ellas es por la utilización de antioxidantes.

El objetivo de la presente tesis fue determinar el efecto antioxidante de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), salvia de bolita (*Buddleia perfoliata* Kunth) y orégano (*Origanum vulgare* L.) en pastas de carne cruda de cerdo, así como posibles alteraciones en las características fisicoquímicas y funcionales de estas pastas.

En la primera parte del estudio, el objetivo fue conocer las condiciones óptimas para la extracción de los compuestos antioxidantes presentes en las hierbas estudiadas; se estudió de igual forma la concentración y estabilidad de los compuestos con actividad antioxidante en los extractos de las hierbas, de los compuestos con capacidad antioxidante en forma individual, aislados de los extractos, y se compararon con compuestos puros (reactivos analíticos). En esta parte, también se estudió el efecto antioxidante de las quinonas aisladas del ácido carnósico, y el efecto de la madurez fisiológica de las hierbas en la concentración de los compuestos con capacidad antioxidante. En la segunda parte, se estudió el efecto de los extractos y compuestos

aislados añadidos en pastas cárnicas, determinando parámetros fisicoquímicos (color, pH, TBARS, degradación proteica) y físicos (tamaño de partícula).

Los extractos de romero fresco en cloroformo presentaron mayor contenido de carnosol y ácido carnósico comparado con los de orégano seco y salvia fresca, mientras que la concentración más alta de ácido rosmarínico se obtuvo en el extracto de orégano seco con etanol. Sin embargo, la eficiencia en la actividad antioxidante de los extractos no dependió de su concentración de fenoles totales, sino de la concentración, polaridad y estructura de los compuestos que forman parte de ellos; la actividad antioxidante, a la vez, depende de la concentración de compuestos con actividad antioxidante (la cual estuvo en función del disolvente utilizado) y a factores como la composición química y microbiológica de la pasta, así como del tiempo y temperatura de almacenamiento de las mismas. En general, bajo condiciones de bajo grado de oxidación de las pastas, el extracto etanólico de orégano seco es una buena alternativa como antioxidante natural. Sin embargo, el extracto de romero fresco en cloroformo fue más eficiente como antioxidante que los extractos etanólicos de la misma hierba.

Con respecto a los disolventes empleados, se extrajo mayor cantidad de ácido carnósico y carnosol a partir de romero fresco y de orégano fresco y seco utilizando cloroformo, mientras que se obtuvo mayor cantidad de ácido rosmarínico en extractos etanólicos de romero fresco, orégano fresco y seco y salvia fresca, si bien la concentración de ácido rosmarínico en los extractos dependió del estado de madurez de las hierbas utilizadas. Se encontró que el ácido rosmarínico fue más estable que el ácido carnósico, ya que una vez extraído de las hojas, el ácido carnósico se oxidó rápidamente para formar carnosol, entre otros compuestos. El tiempo óptimo de maceración en etanol para obtener un máximo de actividad antioxidante dependió de la hierba empleada: de 7 a 10 días para orégano seco y salvia fresca, y 3 h para romero fresco.

El color de las pastas estuvo relacionado con el grado de oxidación; a mayores TBARS, el color varió en un intervalo mayor. Si bien la deshidratación de la superficie de la pasta varía las coordenadas de color, a mayor temperatura de almacenamiento hubo una disminución en la intensidad y contribución del rojo en la pasta, además de aumentar la luminosidad. El extracto de romero fresco en cloroformo fue el más

eficiente para prevenir la oxidación de pigmentos; de igual forma, el extracto etanólico de romero fresco fue el más eficiente antioxidante comparado con los extractos de orégano seco y de salvia fresca. Los extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca disminuyeron en mayor extensión la oxidación de oximioglobina y TBARS que los compuestos antioxidantes por separado. De éstos, el ácido carnósico fue el más eficiente; este ácido presentó mayor capacidad antioxidante sobre la oximioglobina, que la quinona del ácido carnósico, si bien ésta dio lugar a la formación de compuestos con actividad antioxidante.

La pasta cárnica fue un fluido pseudoplástico con una distribución del tamaño de partícula monodispersa, con diámetro medio de 150 μm . El tamaño de partícula medio más pequeño se observó en las pastas a las que no se les añadieron extractos de hierbas, mientras que los compuestos fenólicos presentes en los extractos etanólicos incrementaron el diámetro medio. El tamaño de partícula de estas pastas fue menor al observado en las muestras añadidas con ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico incorporados en forma individual. El arreglo molecular de los compuestos antioxidantes aislados influyó en la reactividad de los grupos hidroxilo; por ello las pastas con ácido carnósico aislado de los extractos presentaron mayor diámetro de partícula que las muestras con ácido rosmarínico y con carnosol.

Las pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia de bolita fresca pueden considerarse como alimentos funcionales debido a que contienen compuestos fenólicos con actividad antioxidante. Se observó también que los extractos etanólicos disminuyeron la degradación proteica.

SUMMARY

The use of natural antioxidants has considerably increased during the last years. This was due, not only because of consumers demand, but also as a result of regulations on the use of synthetic antioxidants in foods. Herbs and spices have been used for centuries as traditional food ingredients, in addition of having properties such as capacity to reduce oxidation. A number of studies on the antioxidant effect of herbs and their extracts have been reported; the results show that many of these extracts are as efficient antioxidants as synthetic compounds, such as BHA and BHT. The compounds mainly responsible for antioxidant properties are phenols.

A meat batter is a disperse system, similar to an oil-in-water emulsion. Due to its composition, including compounds easily undergoing oxidation such as pigments (hemoglobin and myoglobin) and unsaturated fats, meat batter quality rapidly deteriorates. Pigment and lipid oxidation can be delayed by several means, among others by adding antioxidants.

The objective of this thesis was to study the antioxidant effect of three herb extracts: rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), Mexican sage or "salvia de bolita" (*Buddleia perfoliata* Kunth) and oregano (*Origanum vulgare* L.), in raw pork batters. Alterations in physicochemical and functional properties were also studied.

The most suitable conditions for extracting antioxidant compound were studied. The concentration in herbs, and the stability of these compounds in the herb extracts were explored. Stability of the isolated compounds was compared to that of pure compounds (analytical reagents). Concentration of antioxidant compounds was also study as an effect of plant maturity. Quinones were isolated from carnosic acid, and their antioxidant effect studied. Finally, the effect of plant extracts and isolated antioxidant compounds, added to meat batters, was analyzed. The response variables were: physicochemical (color, pH, TBARS, protein degradation) and physical (particle size distribution).

Fresh rosemary chloroform extracts contained higher concentrations of carnosol and carnosic acid as compared to dry oregano and fresh sage extracts, whereas the highest rosmarinic acid concentration was obtained from dry oregano ethanol extracts;

rosmarinic acid concentration depends on plant maturity. However, the antioxidant efficiency of the extracts did not depend on total phenol concentration, but on polarity and structure of the phenol compounds. At the same time, antioxidant ability depend the extracting solvent, as well as factors such as batter chemical composition, initial microbial population, and storage time and temperature.

As far as solvents was concerned, chloroform was able to extract higher amounts of carnosic acid and carnosol from fresh rosemary, and fresh and dry oregano, whereas higher amounts of rosmarinic acid were obtained with ethanol from fresh rosemary, fresh and dry oregano, and fresh sage. However, fresh rosemary chloroform extracts was a more efficient antioxidant than fresh rosemary ethanol extracts.

Rosmarinic acid was more stable than carnosic acid; once extracted from the plant, carnosic acid easily underwent oxidation forming carnosol, among other compounds. The maximum antioxidant activity in ethanol extracts varied according to the herb: 7 to 10 days for dry oregano and fresh sage, and 3 h for fresh rosemary.

Meat batter color was related to oxidation degree (TBARS); the higher the value, the more the color variation. Meat batter surface dehydration altered the color coordinates; the higher the storage temperature, the lower the color intensity and redness, and the higher the lightness. Fresh rosemary chloroform extracts was more efficient to prevent pigment oxidation. In the same way, fresh rosemary ethanol extracts was the most efficient overall oxidant. Dry oregano, fresh rosemary and fresh sage extracts were more efficient in decreasing oxymyoglobin oxidation and TBARS than their antioxidant compounds applied separately. Carnosic acid reduced oxymyoglobin oxidation on a larger extent than carnosic acid quinones, although these compounds later formed antioxidant compounds.

The studied meat batter showed pseudoplastic characteristics, with monodisperse particle size distribution, 150 μm average size. The smallest average particle size was observed in batters with no herb extracts; phenol compounds in ethanol extracts increased the average particle size, although it was smaller than the one showed in batters with rosmarinic and carnosic acids, separately added. Hydroxyl group reactivity was affected by the antioxidant compounds molecular arrangement; therefore, batters

with carnosic acid showed larger particle size than those with rosmarinic acid and carnosol. Ethanol extracts also inhibited protein degradation.

Batters with dry oregano, fresh rosemary and fresh sage ethanol extracts can be considered as functional foods, due that they contain phenol compounds with high antioxidant activity. Under the experimental conditions, dry oregano ethanol extracts was a good alternative as a natural antioxidant in meat batters with low initial oxidation degree, being ethanol a GRAS substance.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice general	i
Índice de figuras	v
Índice de tablas	vii
Índice de anexos	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Extractos de plantas	4
2.1.1. Extracto de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	5
2.1.2. Extracto de salvia de bolita (<i>Buddleia perfoliata</i> Kunth)	9
2.1.3. Extracto de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	10
2.2. Clasificación de los productos cárnicos	11
2.3. Composición química de la carne	14
2.3.1. Proteínas	15
2.3.2. Carbohidratos	15
2.3.3. Lípidos	16
2.4. Propiedades fisicoquímicas	18
2.4.1. Color	18
2.4.2. ph	20
2.4.3. Oxidación de lípidos	20
2.4.3.1. Mecanismos de autooxidación	21
2.4.3.2. Antioxidantes	26
2.4.3.3. Análisis de la estabilidad oxidativa de lípidos	34
2.5. Propiedades funcionales	35
2.5.1. Solubilidad de las proteínas	36
2.5.2. Emulsificación	37
2.5.3. Viscosidad	38
2.5.4. Degradación proteica	39
2.5.5. Tamaño de partícula	40
3. JUSTIFICACIÓN	42

	Pág.
4. OBJETIVOS	42
4.1. General	42
4.2. Específicos	42
5. MATERIALES Y MÉTODOS	44
5.1. Obtención de los extractos de hierbas	44
5.1.1. Extractos de romero fresco en cloroformo y en etanol	44
5.1.2. Extracto de romero fresco en cloroformo/etanol	45
5.1.3. Extractos de orégano fresco y seco en cloroformo y en etanol	45
5.1.4. Extracto de salvia fresca en etanol	46
5.2. Análisis y fraccionamiento de los extractos	46
5.2.1. Determinación de la concentración de fenoles totales	46
5.2.2. Cuantificación de los compuestos con actividad antioxidante	46
5.2.3. Efecto de la madurez fisiológica de las hierbas en la concentración de compuestos con actividad antioxidante	47
5.2.4. Efecto del tiempo de maceración en la concentración de compuestos con actividad antioxidante	48
5.2.5. Solubilidad de los extractos	48
5.2.6. Aislamiento de los compuestos con actividad antioxidante de extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca	49
5.2.7. Estabilidad de los compuestos con actividad antioxidante	49
5.3. Obtención de la quinona del ácido carnósico	50
5.4. Preparación de la pasta cárnica	50
5.4.1. Incorporación de compuestos antioxidantes a la pasta cárnica	51
5.4.1.1. Extractos de hierbas	51
5.4.1.2. Extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca y sus compuestos con actividad antioxidante	51
5.4.1.3. Quinona del ácido carnósico	52
5.4.2. Condiciones de almacenamiento y muestreo de las pastas cárnicas incorporadas con compuestos antioxidantes	53
5.5. Propiedades fisicoquímicas de la pasta cárnica	54
5.5.1. Color	54
5.5.2. pH	54

	Pág.
5.5.3. Oxidación de lípidos	54
5.6. Propiedades funcionales de la pasta cárnica	55
5.6.1. Viscosidad aparente	55
5.6.2. Actividad proteolítica presente en las pastas cárnicas	55
5.6.2.1. Extracción de proteínas miofibrilares	55
5.6.2.2. Caracterización de las fracciones proteicas	55
5.6.3. Tamaño de partícula	56
5.7. Diseño experimental y análisis estadístico	56
5.8. Estrategia experimental	58
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
6.1. Concentración de fenoles totales en los extractos de hierbas	59
6.2. Concentración de compuestos con actividad antioxidante	62
6.3. Efecto de la madurez fisiológica de las hierbas en la concentración de compuestos con actividad antioxidante	67
6.4. Efecto del tiempo de maceración en la concentración de compuestos con actividad antioxidante	68
6.4.1. Extracto de orégano seco	68
6.4.2. Extracto de romero fresco	69
6.4.3. Extracto de salvia fresca	71
6.5. Solubilidad	74
6.6. Estabilidad de compuestos con actividad antioxidante	75
6.7. Obtención de la quinona del ácido carnósico	78
6.8. Propiedades fisicoquímicas de la pasta cárnica	80
6.8.1. Color	80
6.8.1.1. Pastas con extractos de hierbas	80
6.8.1.2. Pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, y sus compuestos antioxidantes (aislados del extracto y reactivos analíticos puros)	83
6.8.1.3. Pastas con ácido carnósico y la solución de la quinona del ácido carnósico	88
6.8.2. pH	90
6.8.2.1. Pastas con extractos de hierbas	91

	Pág.
6.8.2.2. Pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, y sus compuestos antioxidantes (aislados del extracto y reactivos analíticos puros)	91
6.8.2.3. Pastas con ácido carnósico y la solución de la quinona del ácido carnósico	94
6.8.3. Oxidación de lípidos	95
6.8.3.1. Pastas con extractos de hierbas	95
6.8.3.2. Pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, y sus compuestos antioxidantes (aislados del extracto y reactivos analíticos puros)	100
6.8.3.3. Pastas con ácido carnósico y la solución de la quinona del ácido carnósico	108
6.9. Propiedades funcionales de la pasta cárnica	110
6.9.1. Viscosidad aparente	110
6.9.2. Degradación proteolítica	111
6.9.3. Tamaño de partícula	116
6.9.3.1. Pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, y sus compuestos antioxidantes (aislados del extracto y reactivos analíticos puros)	116
6.9.3.2. Pastas con ácido carnósico y la solución de la quinona del ácido carnósico	122
7. CONCLUSIONES	124
8. BIBLIOGRAFÍA	127
ANEXOS	143
RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN EN EL TEMA	181
PRODUCTIVIDAD DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS	186
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN	190

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	6
Figura 2. Mecanismo antioxidante del ácido carnósico	8
Figura 3. Salvia real o salvia de bolita (<i>Buddleia perfoliata</i> Kunth)	9
Figura 4. Orégano europeo (<i>Origanum vulgare</i> L.) fresco y seco	10
Figura 5. Clasificación de los productos cárnicos por piezas y pastas	14
Figura 6. Mecanismo de autooxidación de lípidos	23
Figura 7. Mecanismo de antioxidantes primarios	27
Figura 8. Estructura química del BHA, BHT y TBHQ	30
Figura 9. Estructura química del ácido gálico, ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico	33
Figura 10. Estrategia experimental	58
Figura 11. Cromatograma del extracto de orégano seco con 10 días de maceración en etanol a 20°C. Obtenido por HPLC utilizando una columna C ₁₈ a 284 nm	63
Figura 12. Cromatograma del extracto de romero fresco con 10 días de maceración en etanol a 20°C. Obtenido por HPLC utilizando una columna C ₁₈ a 284 nm	64
Figura 13. Cromatograma del extracto de salvia fresca con 10 días de maceración en etanol a 20°C. Obtenido por HPLC utilizando una columna C ₁₈ a 284 nm	64
Figura 14. Cambios en la concentración de ácido rosmarínico en el extracto de salvia de bolita fresca (<i>Buddleia perfoliata</i> Kunth) obtenido de plantas maduras y no maduras, por maceración en etanol a 20°C	73
Figura 15. Cromatograma del compuesto X. Obtenido del ácido rosmarínico puro disuelto en etanol, por HPLC utilizando una columna C ₁₈ a 284 nm	76
Figura 16. pH en pastas cárnicas añadidas con orégano seco, romero fresco y salvia seca, almacenadas a 20 y a 4°C	92
Figura 17. Grado de oxidación en pastas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca almacenadas a 20 y 4°C	101

	Pág.
Figura 18. Grado de oxidación en pastas añadidas con extracto etanólico de orégano seco y sus compuestos con actividad antioxidante	102
Figura 19. Grado de oxidación en pastas añadidas con extracto etanólico de romero fresco y sus compuestos con actividad antioxidante	105
Figura 20. Grado de oxidación en pastas añadidas con extracto etanólico de salvia fresca y sus compuestos con actividad antioxidante	107
Figura 21. Grado de oxidación en pastas añadidas con ácido carnósico y la solución de la quinona del ácido carnósico, almacenadas a 20 y a 4°C	110
Figura 22. SDS-PAGE de proteínas miofibrilares de pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de salvia fresca, orégano seco y romero fresco, almacenadas a 20°C	114
Figura 23. SDS-PAGE de proteínas miofibrilares de pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de salvia fresca, orégano seco y romero fresco, almacenadas a 4°C	115
Figura 24. Diámetro de partícula en pastas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca almacenadas a 20 y a 4°C	117
Figura 25. Diámetro de partícula en pastas añadidas con extracto etanólico de orégano seco y sus compuestos con actividad antioxidante	118
Figura 26. Diámetro de partícula en pastas añadidas con extracto etanólico de romero fresco y sus compuestos con actividad antioxidante	120
Figura 27. Diámetro de partícula en pastas añadidas con extracto etanólico de salvia fresca y sus compuestos con actividad antioxidante	122
Figura 28. Diámetro de partícula en pastas añadidas con ácido carnósico y la solución de la quinona del ácido carnósico, almacenadas a 20 y a 4°C	123

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición media de carnes magras por 28 g de porción comestible	15
Tabla 2. Contenido de ácidos grasos de carne magra y lardo de cerdo	17
Tabla 3. Fuentes de variación y variables de respuesta analizadas en los experimentos realizados	57
Tabla 4. Concentración de fenoles totales por método de extracción	59
Tabla 5. Concentración de fenoles totales en extractos de hierbas	60
Tabla 6. Concentración de fenoles totales	61
Tabla 7. Concentración de compuestos con actividad antioxidante de acuerdo con la hierba utilizada para su extracción	61
Tabla 8. Concentración de compuestos con actividad antioxidante de acuerdo con el método de extracción	65
Tabla 9. Concentración de compuestos con actividad antioxidante	66
Tabla 10. Concentración de compuestos con actividad antioxidante a dos etapas de maduración de la planta	67
Tabla 11. Concentración de compuestos con actividad antioxidante en el extracto de orégano seco, durante 10 días de maceración en etanol	69
Tabla 12. Concentración de compuestos con actividad antioxidante en el extracto de romero fresco, durante 10 días de maceración en etanol	71
Tabla 13. Concentración de compuestos con actividad antioxidante en el extracto de salvia fresca, durante 10 días de maceración en etanol	72
Tabla 14. Solubilidad de los extractos en diferentes disolventes GRAS a 20°C y 55°C	74
Tabla 15. Tiempo de retención y área de los compuestos obtenidos en la solución de la quinona del ácido carnósico almacenada durante 0, 1.5 y 4 horas a 20°C	79
Tabla 16. Velocidad de deformación y viscosidad aparente de la pasta	111

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración del compuesto X en el extracto etanólico de orégano seco	144
Anexo 2. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración del compuesto X en el extracto etanólico de romero fresco	145
Anexo 3. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración del compuesto X en el extracto etanólico de salvia fresca	146
Anexo 4. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de ácido rosmarínico en el extracto etanólico de orégano seco	147
Anexo 5. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de ácido rosmarínico en el extracto etanólico de romero fresco	148
Anexo 6. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de ácido rosmarínico en el extracto etanólico de salvia fresca	149
Anexo 7. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de carnosol en el extracto etanólico de orégano seco	150
Anexo 8. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de carnosol en el extracto etanólico de romero fresco	151
Anexo 9. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de carnosol en el extracto etanólico de salvia fresca	152
Anexo 10. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de ácido carnósico en el extracto etanólico de orégano seco	153
Anexo 11. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de ácido carnósico en el extracto etanólico de romero fresco	154
Anexo 12. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de ácido carnósico en el extracto etanólico de salvia fresca	155
Anexo 13. Cromatogramas de la solución de la quinona del ácido carnósico a las 0, 1.5 y 4 horas de almacenamiento a 20°C. Obtenido por HPLC utilizando una columna C ₁₈ a 284 nm	156
Anexo 14. Valores medios de TBARS, pH y color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extractos de orégano fresco y seco y romero fresco, obtenidos con cloroformo y con etanol, con alta y baja oxidación inicial de lípidos, almacenadas a	

	Pág.
20 y a 4°C durante un total de 72 h	157
Anexo 15. Valores medios de TBARS, pH y color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extractos de orégano fresco y seco, y romero fresco obtenidos con cloroformo y con etanol (confundiendo los efectos de temperatura, tiempo y oxidación inicial de las pastas)	158
Anexo 16. Valores medios de TBARS, pH, color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad), diámetro de partícula y concentración de proteínas de 200 y 45 kDa en pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, almacenadas a 20 y a 4°C	159
Anexo 17. Efecto del tiempo de almacenamiento en el color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de orégano seco, romero fresco y salvia fresca almacenadas a 20°C	160
Anexo 18. Efecto del tiempo de almacenamiento en el color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de orégano seco, romero fresco y salvia fresca almacenadas a 4°C	161
Anexo 19. Efecto del tiempo de almacenamiento en el color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de orégano seco, y sus compuestos con actividad antioxidante	162
Anexo 20. Efecto del tiempo de almacenamiento en el color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de romero fresco y sus compuestos con actividad antioxidante	163
Anexo 21. Efecto del tiempo de almacenamiento en el color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de salvia fresca y sus compuestos con actividad antioxidante	164
Anexo 22. Valores medios de TBARS, pH, color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) y diámetro de partícula en pastas cárnicas añadidas	

	Pág.
con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico, almacenadas a 20 y a 4°C durante un total de 72 h	165
Anexo 23. Luminosidad en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico almacenadas a 20 y a 4°C	166
Anexo 24. Cromaticidad en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico almacenadas a 20 y a 4°C	167
Anexo 25. Tonalidad en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico almacenadas a 20 y a 4°C	168
Anexo 26. pH en pastas cárnicas añadidas con extractos de orégano fresco y seco y romero fresco obtenidos con cloroformo y con etanol, con alta y baja oxidación inicial de lípidos, almacenadas a 20°C	169
Anexo 27. pH en pastas cárnicas añadidas con extractos de orégano fresco y seco y romero fresco obtenidos con cloroformo y con etanol, con alta y baja oxidación inicial de lípidos, almacenadas a 4°C	170
Anexo 28. pH en pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca y sus compuestos con actividad antioxidante	171
Anexo 29. pH en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico, almacenadas a 20 y a 4°C	172
Anexo 30. Grado de oxidación (TBARS) en pastas cárnicas añadidas con extractos de orégano fresco y seco y romero fresco obtenidos con cloroformo y con etanol, con alta y baja oxidación inicial de lípidos, almacenadas a 20 y a 4°C por un total de 72 h	173
Anexo 31. Grado de oxidación (TBARS) en pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca almacenadas a 20 y a 4°C	174
Anexo 32. Grado de oxidación (TBARS) en pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero seco y salvia fresca y sus compuestos con actividad antioxidante	175
Anexo 33. Grado de oxidación (TBARS) en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico almacenadas a 20 y a 4°C	176

	Pág.
Anexo 34. Distribución de tamaño de partícula de la emulsión cárnica estudiada	177
Anexo 35. Diámetro de partícula en pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca almacenadas a 20 y a 4°C	178
Anexo 36. Diámetro de partícula en pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, y sus compuestos con actividad antioxidante	179
Anexo 37. Diámetro de partícula en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico almacenadas a 20 y 4°C	180

1. INTRODUCCIÓN

En vista de los problemas en el mundo para abastecer de alimentos a una población mundial en expansión continua, existe un creciente interés por obtener la máxima producción de alimentos de origen animal y vegetal así como minimizar las pérdidas derivadas de los insectos, los roedores, los microorganismos, los cambios fisicoquímicos, etcétera. Teniendo en cuenta el papel clave de la carne y otros alimentos de origen animal en la dieta de la mayoría de las sociedades actuales, su importancia crucial al proporcionar proteínas de alta calidad, minerales y vitaminas, parece indudable que la demanda de estos alimentos continuará en ascenso (Price y Schweigert, 1994).

Por otra parte, la incorporación de la mujer en la actividad económica ha requerido cambios substanciales en los tiempos que se invierten en la elaboración de alimentos para la familia; ya que estos son mucho menores que los empleados en décadas anteriores, se necesitan alimentos de fácil preparación. En este sentido, las carnes frías o embutidos representan nuevas alternativas que han encajado perfectamente con estas necesidades actuales. De acuerdo con datos reportados por el Consejo Nacional de Empacadores de Carnes Frías y Embutidos, A. C., la producción de salchichas tuvo una participación de 42.8% de la producción nacional de embutidos durante 1996 (Guías Empresariales, 2008).

De acuerdo con la clasificación reportada por Carballo-García y López de Torre (1991), los productos cárnicos se dividen en dos grandes grupos: aquellos constituidos por piezas (paquetes musculares con y sin hueso) y los constituidos por pastas (elaborados con carnes con diferentes grados de troceado); como ejemplo de las últimas están los embutidos.

Una pasta cárnica es un sistema de dispersión similar a una emulsión aceite en agua (Flores y Bermell, 1985), por ello se describe como una mezcla finamente molida de tejido muscular, partículas de grasa, agua, sal y otros ingredientes que dan como resultado un producto cárnico homogéneo con una estructura compleja (Gordon y Barbut, 1992b). Las pastas cárnicas, debido a su composición que incluye compuestos fácilmente oxidables como los pigmentos (hemoglobina y mioglobina) y lípidos insaturados, están sujetas a la acción de diversos agentes oxidantes, lo que deteriora su calidad. La oxidación de los pigmentos y de los lípidos puede retrasarse de varias formas, una de ellas es por la utilización de antioxidantes, los principalmente utilizados en los alimentos son los fenoles

mono o polihídricos con varias sustituciones en el anillo, en virtud de que son excelentes donadores de electrones o de hidrógeno (Shahidi y col., 1992; Nawar, 1993).

La utilización de antioxidantes naturales se ha incrementado, no sólo por la demanda del consumidor por alimentos naturales, sino también por un incremento en las limitaciones legales sobre la utilización de antioxidantes sintéticos, debido a sus posibles efectos carcinogénicos. Las hierbas y especias se utilizan como ingredientes tradicionales de los alimentos, además de sus características antioxidantes. Algunos ejemplos de ellas son el orégano mexicano (*Poliomintha longiflora* Gray) y europeo (*Origanum vulgare* L.), el romero (*Rosmarinus officinalis* L.), la salvia europea (*Salvia officinalis* L.), el tomillo (*Thymus vulgaris* L.), la mejorana (*Origanum majorana* L.), el jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), la pimienta (*Piper nigrum* L.), el clavo (*Sysygium aromaticum* L.). Se han hecho estudios sobre la actividad antioxidante de las plantas completas de especias y de sus extractos; los resultados indican que una gran cantidad de extractos (tomillo, romero, salvia, orégano, jengibre, clavo) son tan efectivos como los antioxidantes sintéticos BHA, BHT (Madhavi y col., 1996).

En años recientes se ha incrementado el interés por el papel que desempeña la dieta en la salud humana. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que el alto consumo de alimentos basados en plantas está asociado con una reducción en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas como la aterosclerosis y el cáncer (Dillard y German, 2000; Shahidi, 2004; Lila y Raskin, 2005; Housome y col., 2008; Nautiyal y col., 2008). Por ello, se ha expresado un gran interés por los alimentos funcionales. Estos son similares en apariencia a los alimentos convencionales, se consumen como parte de la dieta básica, pero adicionalmente mejoran el estado de salud, más allá del aspecto nutricional esperado por un alimento convencional (Dillard y German, 2000; Shahidi, 2004; Lila y Raskin, 2005). El compuesto funcional puede ser un micro o macronutriente esencial, un nutriente que no se considera como esencial o un compuesto no nutritivo (Dillard y German, 2000). Los nutraceuticos son compuestos extraídos de los alimentos, y tienen beneficios fisiológicos y/o dan protección contra enfermedades crónicas (Dillard y German, 2000; Shahidi, 2004; Lila y Raskin, 2005). A corto plazo, se espera que el consumo de alimentos funcionales y nutraceuticos provea a la población menor incidencia de enfermedades; a largo plazo se espera que incrementen la esperanza de vida saludable (Shahidi, 2004). Los beneficios a la salud y prevención de enfermedades de los alimentos funcionales comprenden diferentes

áreas, como el tratamiento contra el cáncer, la aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares, el proceso de envejecimiento y la diabetes, entre otros. Los efectos benéficos son debido a la mezcla de compuestos bioactivos que contienen, especialmente los vegetales, los cuales pueden actuar en forma cooperativa y sinérgica (Dillard y German, 2000; Shahidi, 2004; Lila y Raskin, 2005), ya sea como sustratos para reacciones bioquímicas, cofactores o inhibidores de reacciones enzimáticas, secuestrantes que unen o eliminan compuestos indeseables, eliminadores de químicos reactivos o tóxicos. Entre los fitoquímicos se incluyen terpenoides, compuestos fenólicos, alcaloides y fibra. Los compuestos fenólicos más importantes que se consumen como parte de la dieta son los ácidos fenólicos y los polifenoles (Dillard y German, 2000). En los alimentos funcionales los compuestos fenólicos actúan vía antioxidación y disminución del estrés oxidativo, en forma directa por la inactivación de radicales libres y en forma indirecta secuestrando los iones metálicos que pueden actuar como prooxidantes (Kähkönen y col., 1999; Dillard y German, 2000; Shahidi, 2004; Rodrigo-García y col., 2006; Nautiyal y col., 2008). En general, los radicales libres son naturalmente producidos, ya que se consumen aproximadamente 3.5 kg de oxígeno diariamente, parte de éste no se reduce completamente, por lo que se induce la formación de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno, tales como superóxido, y radicales hidroxilo, peroxilo y alcoxilo, así como peróxido de hidrógeno. Por ello, se forman varios gramos de peróxidos y otras especies reactivas en el organismo humano y pueden causar enfermedades, como diabetes, infecciones, inflamaciones, mal de Parkinson, artritis, aterosclerosis y cáncer, entre otras (Shahidi, 2004).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Extractos de plantas

Los extractos son formas concentradas de sustancias naturales obtenidas por tratamiento de materiales crudos con un disolvente, removiendo posteriormente el disolvente completa o parcialmente. Pueden ser fluidos (extractos líquidos), sólidos, en polvo (extractos secos) o tinturas (Leung y Foster, 1996).

Las plantas sintetizan una gran diversidad de compuestos orgánicos a los que se les conoce como metabolitos secundarios, éstos pueden desempeñar varias funciones, desde estructurales hasta de protección (Dillard y German, 2000; Robbins, 2003).

Los fenoles son compuestos que tienen uno o varios grupos hidroxilo unidos directamente a un anillo aromático (Morrison y Boyd, 1970b). Se dividen en fenoles simples y en polifenoles. La concentración en que estos compuestos se encuentran en los alimentos varía ampliamente; depende de factores tales como especie (Pizzale y col., 2002), variedad, condiciones de crecimiento, madurez de la planta al momento de cosecharse, almacenamiento y tipo y duración de procesamiento (Macrae y col., 1993c; Nautiyal y col., 2008).

Los metabolitos secundarios de plantas están formados por 4 grandes grupos: compuestos fenólicos y polifenólicos, terpenoides, alcaloides y compuestos que contienen azufre (Hounsome y col., 2008). Basándose en el número de grupos fenol (anillo aromático con la substitución de, al menos, un grupo hidroxilo) en la molécula, los compuestos fenólicos se clasifican en fenoles simples y polifenoles, los primeros poseen un grupo fenol; los últimos se dividen en flavonoides, aquellos que presentan dos subunidades, y taninos, aquellos que poseen tres o más subunidades (Robbins, 2003). Los flavonoides son los más numerosos; incluyen a los flavonoles (quercetina y kaempferol), flavonas (apigenina, luteolina), antocianidinas (cianidina, malvidina), chalconas, y dihidrochalconas e isoflavonas. Muchos de ellos son pigmentos que dan color a frutas y vegetales (Hounsome y col., 2008).

Por otra parte, los ácidos fenólicos presentan en su estructura, al menos, un grupo fenol y un grupo carboxilo; ejemplo de ellos son los ácidos gálico, cafeico, vainílico, cinámico,

salicílico, rosmarínico y carnósico. Tienen diversas funciones en la planta: absorción de nutrientes, componentes estructurales, antioxidantes (Robbins, 2003), defensa contra patógenos y herbívoros (Petersen y Simmonds, 2003), además de contribuir al sabor amargo y astringente (Hounscome y col., 2008). Por la diversidad y complejidad de las mezclas de compuestos fenólicos en los extractos de hierbas, es difícil caracterizar cada uno de ellos, ya que cada hierba contiene diferentes compuestos en función a la variedad, estado de madurez, condiciones de crecimiento, tipo de suelo y almacenamiento postcosecha (Zheng y Wang, 2001; Nautiyal y col., 2008); además, cada compuesto posee diferente actividad antioxidante (Zheng y Wang, 2001). La mayoría de los compuestos fenólicos se forman a partir de fenilalanina y, en menor cantidad, a partir de tirosina; el peso molecular difiere ampliamente, además de sus características de hidrofobicidad o hidrofiliidad. Esta propiedad incrementa la eficiencia de la mezcla de compuestos fenólicos al aplicarlos en diversos medios como grasas, emulsiones y productos susceptibles a la oxidación (Shahidi, 2004).

2.1.1. Extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

El romero pertenece a la familia *Labiatae*, la cual esta compuesta por 3500 especies, aproximadamente (Macrae y col., 1993b; Argueta, 1994), entre los que se encuentran una gran cantidad de hierbas utilizadas como especias, en la preparación de bebidas o en la medicina tradicional; algunas de ellas también se utilizan para la obtención de aceites esenciales o de extractos. Estos últimos tienen el sabor y aroma característico de cada uno de los miembros de esta familia; asimismo, el contenido y composición de los mismos, en especial la del aceite esencial, determina su valor económico que puede variar ampliamente entre especies (Macrae y col., 1993b). Ejemplos de hierbas que forman parte de esta familia son el toronjil, la albahaca, la mejorana, la menta, el orégano europeo, el romero, la salvia europea y el tomillo (Macrae y col., 1993b; Argueta, 1994). El romero es un arbusto de 1 a 1.5 m de altura, muy aromático, siempre verde, ramificado y con tallo cuadrado. Las hojas son angostas en forma de agujas, rígidas, color verde en el haz y blanquecinas en el envés. Tiene pocas flores que pueden ser de color azul claro, raramente de color rosa o blanco y que se encuentran en la unión del tallo y la hoja (Figura 1) (Macrae y col., 1993b; Argueta, 1994). Los frutos tienen cuatro semillas pequeñas en forma de nueces (Argueta, 1994). Es una planta originaria de la Región Mediterránea y crece en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados. En México se tiene conocimiento de que se utiliza como planta

medicinal en los estados de Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, México, Morelos, Oaxaca, Puebla, Sonora, Tlaxcala, Veracruz y Distrito Federal (Argueta, 1994).



Figura 1. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

Munné-Bosch y Alegre (2001) reportaron la presencia de ácido carnósico y sus compuestos de oxidación en diferentes partes de la planta de romero, encontrando que la mayor concentración está en las hojas, siguiéndole en orden descendente las flores (los sépalos presentan mayor concentración que los pétalos), las semillas y el tronco; la raíz no contiene diterpenos. Asimismo, estos autores analizaron las fracciones subcelulares de la hoja como cloroplastos, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y membrana plasmática, por ser los tejidos que contienen mayor concentración de diterpenos. En los cloroplastos encontraron ácido carnósico, carnosol, rosmanol, isorrosmanol, ácido 12-o-metilcarnósico y 11,12-di-o-metilisorrosmanol, siendo el ácido carnósico el que se encuentra en mayor concentración. Los últimos dos compuestos también estuvieron presentes en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y membrana plasmática. Los autores referidos proponen que el ácido carnósico puede tener la función de proteger a los cloroplastos del estrés oxidativo *in vivo* debido a que, en condiciones de sequía o estrés inducido por alta luminosidad, las concentraciones de diterpenos oxidados (rosmanol, isorrosmanol y 11,12-di-o-metilisorrosmanol) se incrementa debido a la actividad antioxidante del ácido. Otros autores han reportado que el ácido carnósico es el principal compuesto que le confiere actividad antioxidante a los extractos; sin embargo, contiene otros diterpenos que actúan como antioxidantes como son el carnosol (Aruoma y col., 1992; Hopia y col., 1996), rosmanol, epirosmanol, isorrosmanol, rosmaridifenol y rosmariquinona (Jadhav y col., 1996; Rajalakshmi y Narasimhan, 1996), así como ácido rosmarínico (Del Baño y col., 2003; Rababah y col., 2004; Wellwood y Cole, 2004; Seydim y col., 2006), entre otros.

Por otro lado, se ha observado que el ácido carnósico es inestable, su degradación se acelera en disolventes polares (Del Baño y col., 2003), y por incrementos en la temperatura y por su exposición a la luz (Okamura y col., 1994); asimismo, en presencia de oxígeno puede oxidarse para formar carnosol, rosmanol, epirosmanol, 7-metil-epirosmanol (Madsen y Bertelsen, 1995; Masuda y col., 2001). Se ha reportado que el ácido carnósico y el carnosol son buenos inactivadores de radicales peroxilo (Aruoma y col., 1992; Madsen y Bertelsen, 1995; Masuda y col., 2001), por tanto, son antioxidantes primarios. Aunado a esto, se ha observado que, además de inhibir la formación de hidroperóxidos, también previenen su degradación (Frankel y Huang, 1996; Brewer, 2009).

Masuda y col. (2001) propusieron que el mecanismo de antioxidación procede a través de una reacción por la cual el ácido carnósico inactiva a dos radicales libres, utilizando los dos grupos hidroxilo en el anillo aromático, para dar lugar a la formación de dos quinonas (Figura 2); la formación de una u otra depende de la selectividad del radical en la posición de acoplamiento. Los mismos autores (Masuda y col., 2002) reportaron que, debido a su inestabilidad, la *o*-quinona puede participar en reacciones de óxido-reducción e isomerización para formar otros compuestos, aunque dependiendo de las propiedades del disolvente en el que se encuentre serán los productos formados. Cuando el disolvente es metanol, se forman ácido carnósico, carnosol, lactona 8-carnósica y 7-O-metilrosmanol; en una mezcla acetonitrilo-agua los productos son ácido carnósico, carnosol, lactona 8-carnósica y rosmanol; en acetonitrilo los compuestos que se obtienen son ácido carnósico y un compuesto no identificado. A excepción de la lactona 8-carnósica el resto de los compuestos presenta efecto antioxidante, por lo tanto pueden contribuir a esta actividad aún después de que el ácido carnósico se haya consumido.

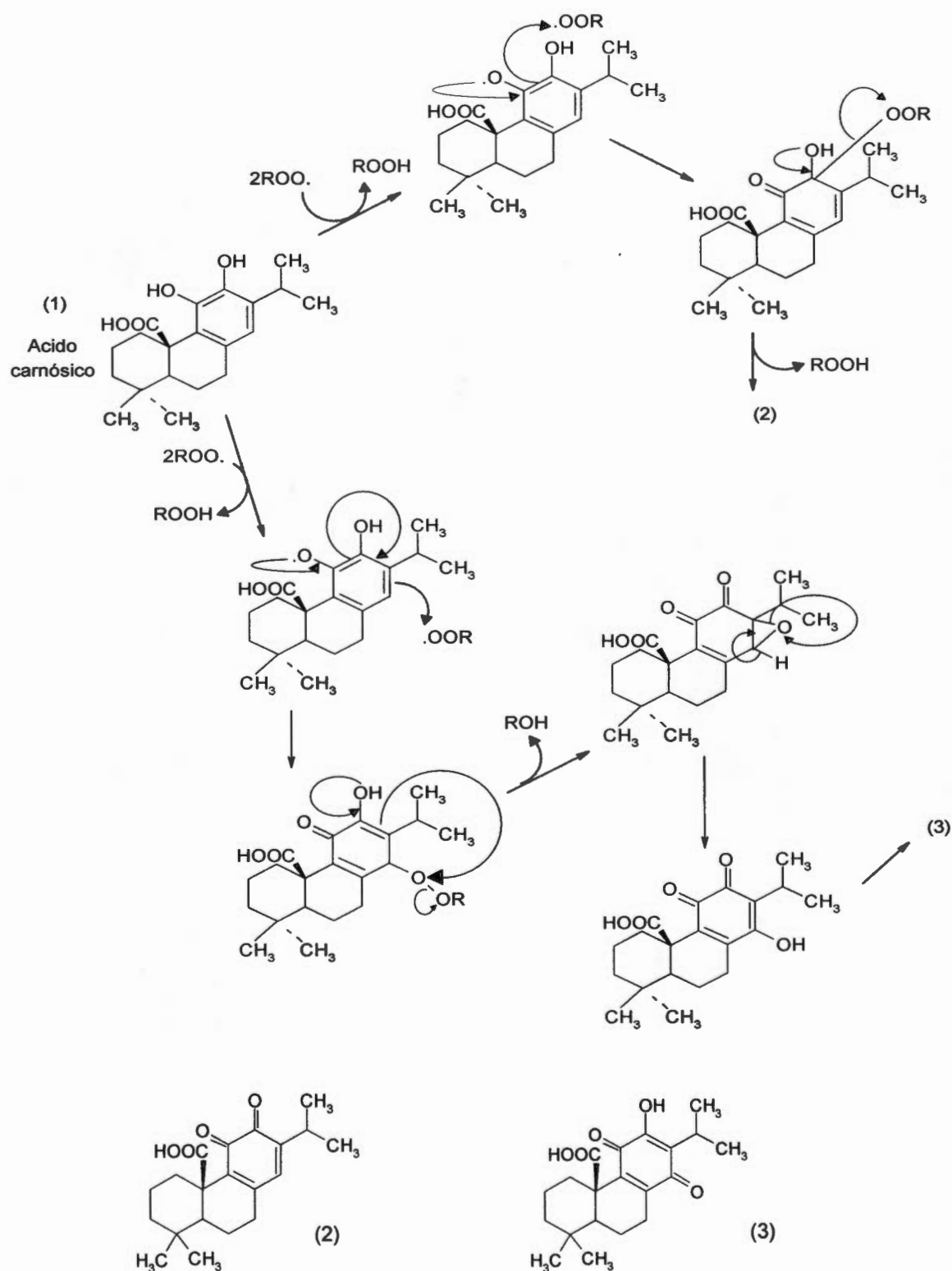


Figura 2. Mecanismo antioxidante del ácido carnósico. (1) ácido carnósico, (2) y (3) quinonas del ácido carnósico (Masuda y col., 2001)

Otra característica importante del extracto de romero es que su actividad antioxidante en emulsiones se incrementa conforme el pH disminuye, posiblemente debido a que se favorece la distribución, tanto del ácido carnósico como del carnosol, en la fase oleosa o hacia la interfase aceite-agua. Asimismo, estos compuestos son más estables y su efecto protector puede durar más tiempo durante la oxidación y/o tener mayor capacidad reductora a menor pH (Frankel y col., 1996).

2.1.2. Extracto de salvia de bolita (*Buddleia perfoliata* Kunth)

A esta hierba se le conoce como salvia real o salvia de bolita, pertenece a la familia *Buddleiaceae*. Es un arbusto de 1 m de altura, tiene varias ramas y muchos pelillos cuya terminación es en forma de estrella; es de color verde-amarillento a café. Las hojas son más largas que anchas y aterciopeladas en ambas caras; las flores son amarillas con forma de cabezuelas (Figura 3). Los frutos son ligeramente alargados y contienen varias semillas. Es una planta originaria de México. Los estados en los que se utiliza con fines medicinales son Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Puebla y Distrito Federal (Argueta, 1994), Tlaxcala (Betancourt y col., 2003), México (Cortés, 2000), San Luis Potosí, Veracruz, Querétaro (Martínez, 1979) y Morelos.



Figura 3. Salvia real o salvia de bolita (*Buddleia perfoliata* Kunth)

En información reportada por Gutiérrez y Betancourt (2003) relacionada con la comercialización de los recursos herbolarios y de sus productos derivados en México, la salvia europea (*Salvia officinalis* L.) que se consume o exporta de México es frecuentemente adulterada con *Buddleia perfoliata* Kunth. Se tiene conocimiento de que se extrae aceite esencial, resina, ácidos tánico, gálico y oxálico de toda la planta de salvia de bolita (Argueta, 1994). Hernández-Hernández (2004) reportan que el extracto obtenido con cloroformo actúa

como prooxidante de los lípidos y de la oximioglobina en una pasta cárnica, cuando las condiciones son altamente oxidantes (elevada oxidación inicial de lípidos, incorporación de aire a las pastas, almacenamiento a temperatura ambiente). Sin embargo, el extracto obtenido con etanol presenta efecto antioxidante sobre lípidos y oximioglobina.

2.1.3. Extracto de orégano (*Origanum vulgare* L.)

El orégano europeo, al igual que el romero, pertenece a la familia *Lamiaceae* y es de origen Mediterráneo. Son pequeños arbustos de 40 cm a 1.5 m de altura, de tallos erectos; sus hojas son simples, de color verde cenizo, muy olorosas, ovaladas con bordes enteros, acabadas en punta y se recubren de pelusilla por ambas caras brotando en pares enfretados de cada nudo (Figura 4). Las flores son pequeñas, de color blanco, nacen en inflorescencias terminales muy ramificadas (Macrae y col., 1993b; Ciencia y Desarrollo, 2008; SAGARPA, 2008).

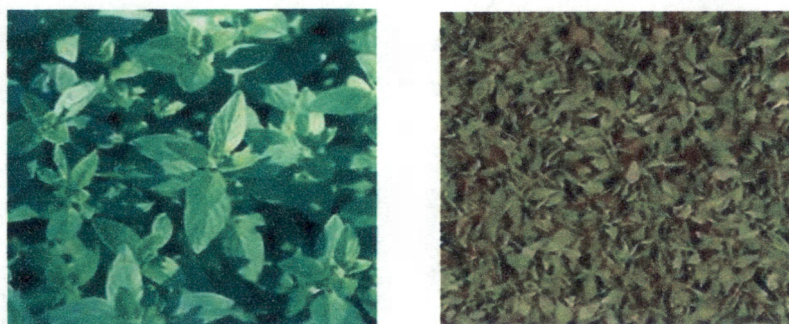


Figura 4. Orégano europeo (*Origanum vulgare* L.) fresco y seco

Se cultiva en zonas templadas de México (Huerta, 2002), algunos de los estados productores son Chihuahua, Durango, Tamaulipas, Coahuila, Jalisco, Zacatecas, Querétaro, Hidalgo, Baja California Sur, Puebla y Estado de México. En el mercado internacional Turquía, Grecia y México son los principales países proveedores de orégano seco; sin embargo, Turquía y México aportan el 65 y 31% de la producción, respectivamente (Ciencia y Desarrollo, 2008). Los productos derivados del orégano son: las hojas frescas y secas que se emplean en la medicina tradicional (Huerta, 2002), en la cocina para aromatizar platillos y en la industria alimentaria; el aceite esencial del que se manufacturan medicamentos para salud humana y animal y, extractos para la elaboración de licores, cosméticos, diferentes productos de aromaterapia y fungicidas, entre otros (Ciencia y Desarrollo, 2008; SAGARPA,

2008). La mayoría de las especias tienen características distintivas en cuanto al aroma y apariencia cuando están enteras y sólo unas cuantas de ellas presentan un gran parecido cuando están pulverizadas, este último caso es el que presentan el orégano europeo que no puede diferenciarse rápidamente del orégano mexicano (*Lippia* spp).

El orégano presenta un alto contenido de aceite esencial cuyos principales componentes son el timol y el carvacrol, siendo este último el que se encuentra en mayor concentración. Por otra parte, se ha reportado que el aceite tiene una gran variación en el contenido de compuestos fenólicos en comparación con otras especies, debido a diferencias en el año de cosecha, área de cultivo y otras variables asociadas (Rhyu, 1979). Otro aspecto que cabe resaltar es el hecho de que la concentración de timol y carvacrol en el aceite es la que determina el valor en el mercado de este último (Ciencia y Desarrollo, 2008). Por otro lado, Zheng y Wang (2001) reportaron que el extracto obtenido con una solución amortiguadora de fosfato presentó un alto contenido de fenoles totales (11.80 mg/g de peso fresco); asimismo su actividad antioxidante fue superior a la del tocoferol y similar a la del BHA contra la oxidación de ácido linoleico, además de tener un alto contenido de ácido rosmarínico y compuestos derivados del ácido hidroxicinámico.

2.2. Clasificación de los productos cárnicos

Existe una gran variedad de factores a considerar para clasificar a los productos cárnicos; en general se consideran la integridad del músculo, el tamaño del grano de carne y de la grasa picada, la incorporación de subproductos de la matanza (sangre, cueros de cerdo), si es un embutido dentro de un funda o tripa, las técnicas de fabricación o el tratamiento aplicado (calor, ahumado, deshidratación, refrigeración), el tipo y cantidad de especias y aditivos utilizados, las características fisicoquímicas y origen étnico, generándose de esta forma una amplia gama de clasificaciones (Rosmini y Schneider, 2000).

Según la clasificación de Carballo-García y López de Torre (1991), los productos cárnicos se dividen en dos grandes grupos: aquellos constituidos por piezas (paquetes musculares con y sin hueso) y los constituidos por pastas (elaborados con carnes más o menos troceadas) (Figura 5).

En la elaboración de pastas cárnicas se emplea carne y grasa picadas, además de una

gran variedad de ingredientes, entre los cuales se encuentran los siguientes:

a) Carne. Puede utilizarse carne de animales recién sacrificados, carne refrigerada o congelada; sin embargo la primera es la más adecuada en virtud de que posee una alta capacidad de retención de agua por tener pH entre 6.5 y 6.8, alejado del punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares (4.5-5.5), lo cual favorece la solubilidad de las mismas (Li-Chan y col., 1985; Fischer, 1994).

b) Agua. Es el componente predominante en los embutidos cocidos, donde alcanza 45 a 55% del peso total. Sirve como disolvente de la sal que forma la salmuera necesaria para extraer las proteínas solubles en disoluciones salinas; influye en la jugosidad y dureza del embutido; también evita el calentamiento excesivo durante el mezclado, batido y embutido con lo cual disminuye la desnaturalización de las proteínas miofibrilares y la fusión de la grasa.

c) Proteínas. Está aportada principalmente por carne magra, debido a que durante el batido o formación de la emulsión las proteínas miofibrilares encapsulan o emulsionan la grasa y unen agua. Si cualquiera de estas funciones no se lleva a cabo adecuadamente, el embutido sería inestable y susceptible a la separación de las fases durante la cocción (Rust, 1994). Sin embargo, también se pueden adicionar proteínas no cárnicas, lo cual genera beneficios desde el punto de vista tecnológico y nutricional al mejorar las propiedades funcionales e incrementar el contenido de proteína total (Guerrero-Legarreta y col., 2002).

d) Grasa. Contribuye en gran medida a la palatabilidad de los embutidos; también influye en la dureza y la jugosidad de los embutidos cocidos (Rust, 1994).

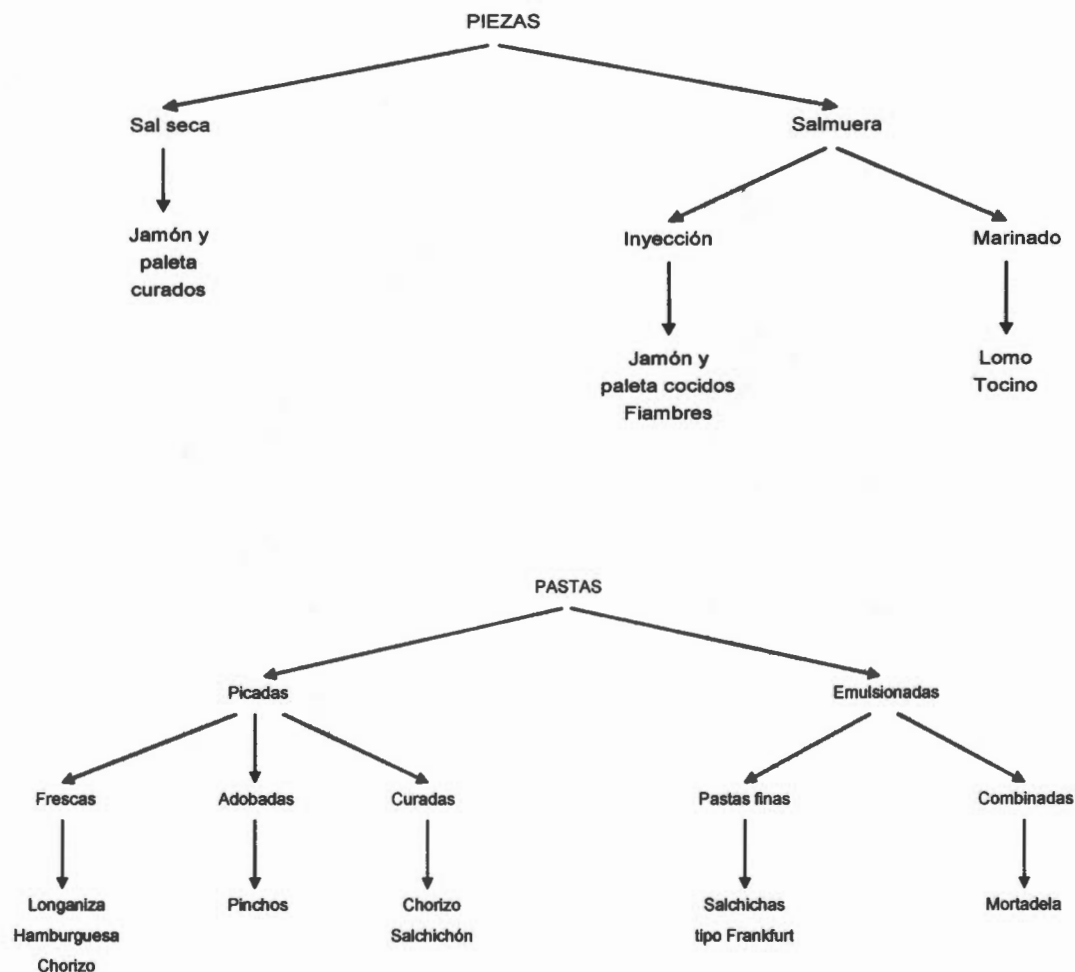
e) Sal. Desempeña diferentes funciones como son la solubilización de las proteínas miofibrilares (Carballo-García y López de Torre, 1991; Fischer, 1994; Rust, 1994), actúa como conservador y da sabor a los embutidos; sin embargo, también puede favorecer la oxidación de los lípidos, debido a los metales pesados que posee como impurezas (Rust, 1994; Guerrero-Legarreta y col., 2002).

f) Especies y saborizantes. Se emplean mezclas de varias especias y glutamato monosódico, el cual potencializa el sabor propio de la carne. Las especias, además de impartir olor y sabor al embutido, tienen propiedades antioxidantes; se pueden incorporar ya sea enteras, molidas, en forma de aceites esenciales, oleorresinas o extractos. La adición de estas últimas formas presenta varias ventajas con relación a la utilización de las especias enteras o molidas como son el estar libres de microorganismos, aportar la cantidad necesaria para producir el sabor y aroma, y disminuyen los costos por transporte y almacenamiento (Rust, 1994).

g) Polifosfatos. Aumentan el pH de la carne y disocian el complejo actomiosina con lo cual aumentan la capacidad de retención de agua (Carballo-García y López de Torre, 1991; Rust, 1994; Townsend y Olson, 1994), retrasan la oxidación de los lípidos insaturados debido a que fijan iones metálicos (Fischer, 1994).

h) Antioxidantes. Son un grupo de compuestos que retardan la oxidación de los lípidos, que a su vez produce alteraciones en el color, el sabor y el aroma. Los principales antioxidantes sintéticos solubles en grasa son 3-*t*-butil-4-hidroxianisol (BHA, por sus siglas en inglés), 3,5-di-*t*-butil-4-hidroxitolueno (BHT, por sus siglas en inglés) y butilhidroquinona terciaria (TBHQ, por sus siglas en inglés), se emplean en embutidos cocidos en concentraciones de 100 mg/kg con relación al contenido de grasa. Además de los antioxidantes primarios, se puede utilizar ácido cítrico como secuestrante de metales pesados que promueven la oxidación.

i) Antimicrobianos. En general no están permitidos salvo aplicándolos en la superficie de los embutidos curados madurados para retardar el crecimiento de hongos (Rust, 1994; NOM, 2005).



Fuente: Carballo-García y López de Torre (1991)

Figura 5. Clasificación de los productos cárnicos por piezas y pastas

2.3. Composición química de la carne

La carne es el tejido animal que puede emplearse como alimento, la mayoría proviene de animales domésticos y acuáticos; algunos de los tejidos que la componen son músculo estriado y liso, grasa y vasos sanguíneos (Alarcón-Rojo, 1992). Sin embargo, el principal componente de la carne como alimento, son los músculos estriados. La transformación del músculo en carne ocurre una vez que en el primero se llevan a cabo una serie de cambios físicos y bioquímicos después del sacrificio (Alarcón-Rojo, 1992; Hultin, 1993; Pearson, 1994).

La composición del músculo magro obtenido de diferentes especies es relativamente constante en términos de proteína y minerales (Schweigert, 1994), el contenido graso es el que presenta mayor variabilidad, siendo la carne de cerdo la que acumula mayor cantidad de grasa (Tabla 1).

Tabla 1. Composición media de carnes magras por 28 g de porción comestible

Especie	Proteína (g)	Grasa (g)	Calcio (mg)	Hierro (mg)
Res	5	3.6	3	0.8
Cordero	4	2.5	3	0.7
Aves	5	2	4	0.4
Cerdo	4	9	3	0.5

Fuente: Fisher y Bender, 1972.

2.3.1. Proteínas

Las proteínas desempeñan un papel fundamental en las funciones fisiológicas del músculo *in vivo* y en los cambios que se originan después de la muerte del animal; los cuales afectan a las propiedades de la carne.

La clasificación más generalizada de las proteínas de la carne se basa en su origen y solubilidad, al respecto se diferencian tres grupos de proteínas: miofibrilares que son solubles en soluciones salinas concentradas; sarcoplásmicas, que son solubles en agua y en soluciones salinas diluidas y del tejido conectivo o residuo insoluble (Flores y Bermell, 1984; Signorini, 2002).

2.3.2. Carbohidratos

La carne es considerada una fuente pobre de carbohidratos (Lawrie, 1985; Alarcón-Rojo, 1992). El contenido de glúcidos en los tejidos animales es de aproximadamente 1% del peso húmedo. Pese a esto, numerosas moléculas del organismo que juegan un papel vital en el metabolismo o que funcionan como componentes estructurales contienen una porción glucídica. La cantidad de glucógeno presente al sacrificio y la velocidad y extensión de la

glucólisis postmortem afectan al color del músculo, a la textura, a la firmeza, a la capacidad de retención de agua, a la capacidad emulsificante y a su vida útil. Los glucósidos en el organismo animal son monosacáridos, polisacáridos, sus intermediarios glucolíticos o porciones de moléculas tales como ácidos nucleicos, nucleótidos, nucleósidos y algunas proteínas (glucoproteínas) y lípidos (glucolípidos). Las pentosas y las hexosas son los monosacáridos predominantes, la más abundante es la D-glucosa (Merkel, 1994a).

2.3.3. Lípidos

El término grasa animal comprende usualmente todas las especies de lípidos (Dugan, 1994), los cuales se clasifican en tres grupos: a) lípidos simples que incluyen a los triglicéridos, ésteres de esteroles y ceras; b) lípidos compuestos dentro de los cuales se encuentran los fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos y lipoproteínas; c) derivados de los lípidos como son los ácidos grasos, vitaminas y provitaminas solubles en grasas, esteroides, terpenoides y éteres (Jadhav y col., 1996). Los lípidos se encuentran en el espacio intermuscular e intramuscular, en el tejido adiposo, en el tejido nervioso y en la sangre (Dugan, 1994). Los lípidos intermusculares y del tejido adiposo están constituidos, en mayor proporción de triglicéridos (Nawar, 1993). Los intramusculares forman depósitos en células adiposas comúnmente llamado marmoleo, también se encuentran asociados con las membranas y contienen grandes cantidades de fosfolípidos (Rhee, 1992). En la Tabla 2 se enlista el contenido de ácidos grasos de carne magra y de lardo de cerdo, provenientes de animales adultos.

Tabla 2. Contenido de ácidos grasos (%) de carne magra y lardo de cerdo

Ácidos grasos	Carne magra	Lardo
Capricho (10:0)	0.16	0.10
Láurico (12:0)	0.16	0.21
Mirístico (14:0)	1.31	1.36
Palmitico (16:0)	24.39	24.92
Palmitoleico (16:1)	3.44	2.83
Esteárico (18:0)	11.95	14.14
Oleico (18:1)	45.50	43.14
Linoleico (18:2)	9.66	10.68
Linolénico (18:3)	0.65	1.05
Otros AGS ^a	0.33	---
Otros AGMI ^b	1.15	1.05
Otros AGPI ^c	0.00	---
Total AGS^a	38.30	40.73
Total AGMI^b	50.08	47.23
Total AGPI^c	11.62	11.73

^aAGS, ácidos grasos saturados^bAGMI, ácidos grasos monoinsaturados^cAGPI, ácidos grasos poliinsaturados*Fuente: Rhee, 1992.*

Con base en los datos enlistados, se puede observar que la composición de ácidos grasos del tejido adiposo y de la carne magra son similares, siendo el ácido oleico el que se encuentra en mayor concentración, siguiéndole en orden descendente los ácidos palmítico, esteárico y linoleico; sin embargo, la grasa intermuscular (lardo) presenta mayor proporción de ácidos grasos saturados comparado con la carne, mientras que la grasa intramuscular de la carne (marmoleo) contiene un porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados superior al del lardo. Cabe mencionar que la concentración de ácidos grasos puede variar de acuerdo con la especie, tejido, dieta, raza, sexo, edad y medio ambiente (Eugene-Allen y Allen-Foegeding, 1981; Rhee, 1992; Min y col., 2008). Entre las especies de carne roja la de cerdo

es la que contiene una cantidad sustancialmente mayor de ácidos grasos poliinsaturados (0.26, 0.48, 0.3 y 0.71 g/100g para carne de res, cordero, ternera y cerdo, respectivamente) (Rhee, 1992).

2.4. Propiedades fisicoquímicas

2.4.1. Color

Desde un punto de vista químico, el color de la carne se produce principalmente por sustancias cromóforas, mayormente de tipo hemo (Pérez-Álvarez y col., 2000). De las hemoproteínas presentes en el músculo *postmortem*, la mioglobina es la principal responsable del color, debido a que la hemoglobina se elimina durante el desangrado. Su concentración varía según la especie, el tipo de músculo y algunos otros parámetros (Cheftel y col., 1989b). Es una proteína conjugada que, además de la parte proteica (globina) contiene un grupo prostético (hemo). El papel de este grupo en la molécula es fijar oxígeno y el de la globina es hacer que la fijación del oxígeno sea reversible (Colby, 1987).

El grupo hemo está formado por un átomo de hierro y un gran anillo planar constituido de porfirina, se fija con la globina a través de un residuo histidil (residuo número 93). El átomo de hierro del hemo está coordinado con 6 átomos, los átomos de nitrógeno de los anillos porfirínicos ocupan cuatro posiciones de coordinación y una quinta corresponde al átomo de nitrógeno del anillo imidazol del histidil 93. La sexta posición la ocupa el oxígeno en la oximioglobina y permanece libre en la desoximioglobina. El estado de oxidación del hierro (Fe^{2+} o Fe^{3+}) y la naturaleza de los ligandos con las uniones a este hierro (O_2 , NO, CO, OH) explican el origen de las variaciones de color. A causa de su débil electronegatividad, el hierro puede perder 2 ó 3 electrones de valencia para formar respectivamente cationes ferrosos (Fe^{2+}) o férricos (Fe^{3+}). Se pueden formar dos tipos de enlaces entre el ligando y el hierro del hemo: un enlace σ en el cual los electrones son suministrados por el ligando (por ejemplo: O_2) o un enlace π en el cual los electrones son suministrados al ligando por el hierro. Cuando el ligando es el oxígeno, que es un débil suministrador de electrones, el nitrógeno del histidil 93 permite al hierro, bajo la forma de Fe^{2+} , adquirir una densidad electrónica alta; el enlace π queda así reforzado, lo que explica la gran estabilidad del complejo oxígeno-mioglobina- Fe^{2+} (oximioglobina). Por el contrario, el ión Fe^{3+} no puede

suministrar electrones para crear un enlace π , por lo que la forma mioglobina Fe^{3+} (metamioglobina) no fija el oxígeno (Livingston y Brown, 1981; Cheftel y col., 1989b).

La desoximioglobina es el pigmento natural de la carne; posee un átomo de hierro bajo la forma de hierro ferroso (Fe^{2+}) en el hemo oxidado. Este derivado rojo púrpura está presente cuando la presión parcial de oxígeno es baja; también se encuentra en el interior de las carnes recién cortadas (Cheftel y col., 1989b). Cuando la carne fresca se expone al aire, los gases se disuelven en los fluidos fisiológicos y el oxígeno se une a la mioglobina para formar oximioglobina de color rojo brillante. El almacenamiento prolongado de la carne expuesta al aire o bajo condiciones de baja concentración de oxígeno produce metamioglobina de color café (Alarcón-Rojó, 1992; Guerrero-Legarreta y col., 2002). Por lo tanto, el color de la carne depende de la proporción relativa y de la distribución de los tres pigmentos musculares: mioglobina de color rojo púrpura, oximioglobina roja y metamioglobina café.

El color puede definirse y determinarse a través de la medición instrumental de las partes que lo constituyen, considerando que la superficie de la carne refleja la luz en diferentes ángulos, creando una reflexión difusa de varias longitudes de onda, que son función del color de la carne (Guerrero y col., 2002). Al medir el color se deben describir las tres propiedades de éste: el matiz, que es el tono o clase de color (rojo, azul, etc.); la saturación, intensidad del color o grado de dilución del matiz con el blanco indica la profundidad del color (cuanto más saturado este un color, más intenso y vivo aparece, cuando pierde saturación se va aproximando al gris); y el brillo o grado de dilución del matiz con el negro que indica la luminosidad del color (Alarcón-Rojó, 1992; Quijano, 2003). En el sistema Hunter *Lab* la tonalidad más cercana al rojo es el ángulo más próximo a cero; el color más intenso es un valor de cromaticidad más alto; mientras que el color más pálido corresponde a una luminosidad más alejada de cero. De este modo el color más pálido indica mayor oxidación de oximioglobina roja a metamioglobina café (Guerrero y col., 2002); de igual forma, la oxidación esta asociada con la disminución en el color rojo (incremento de la tonalidad) (Guerrero y col., 2002; Sánchez-Escalante y col., 2003).

Por otro lado, el picado de la carne generalmente disminuye el tiempo de vida media, ya que durante el mezclado asociado al picado aumenta la superficie a la que los microorganismos pueden acceder y se incorpora oxígeno. En este caso el cambio de color es el primer síntoma de deterioro (Urbain y Campbell, 1994).

2.4.2. pH

Este está determinado por la cantidad de ácido láctico producido a partir del glucógeno durante la glucólisis anaerobia (Lawrie, 1985; Alarcón-Rojo, 1992). La caída de pH en el músculo ocurre en forma gradual, desde valores aproximados a 7 en el animal vivo, hasta 5.6-5.7 después de que han transcurrido de 6-8 horas del sacrificio, hasta pH 5.3-5.7 después de 24 h (Minor-Pérez, 1998). El pH final se alcanza cuando se ha agotado todo el glucógeno o el pH ha descendido lo suficiente para inhibir completamente a las enzimas glucolíticas (Pearson, 1994).

Tanto la magnitud como la velocidad del cambio de pH son importantes. Si el pH desciende rápidamente mientras la temperatura de la canal es todavía elevada, se produce una desnaturalización de las proteínas incluyendo las miofibrilares, lo que da como consecuencia la pérdida de solubilidad y, por lo tanto, disminución de la capacidad de retención de agua y de la intensidad del color (Alarcón-Rojo, 1992; Hultin, 1993; Pearson, 1994). Por el contrario, a pH final cercano a 6.2 la carne producida es oscura, firme y seca, con poca resistencia al desarrollo microbiano (Hultin, 1993; Pearson, 1994).

En cuanto a la oxidación de lípidos se refiere, varios autores (Yasosky y col., 1984; Rhee, 1992) han reportado que esta reacción se incrementa conforme el pH se aleja de valores cercanos a 7.0. Ese hecho se relaciona con la acción de grupos imidazol de la histidina como secuestrantes de iones metálicos. Yasosky y col. (1984) observaron que a $\text{pH} < 6$ hay una ionización de los residuos de histidina ($\text{pK} < 6.0$), lo cual puede alterar la carga y/o estructura terciaria de las proteínas, lo que redundaría en su capacidad para secuestrar iones catalizadores de la oxidación, como hierro, manganeso, cobalto y cobre.

2.4.3. Oxidación de lípidos

La oxidación de lípidos es un término utilizado para describir una secuencia compleja de cambios químicos que resulta de la interacción de las dobles ligaduras de los lípidos con especies reactivas de oxígeno. Puede ser de dos tipos: por rancidez oxidativa o autooxidación, donde únicamente participan los lípidos como especie reactiva (Ockerman, 1980; Macrae y col., 1993a; Nawar, 1993; Hamilton, 1994; McClements y Decker, 2000), o debido al ataque de enzimas exógenas provenientes de microorganismos. En este último, las

reacciones que ocurren son hidrólisis por una lipasa y oxidación de los ácidos grasos por oxidasas. Los microorganismos lipolíticos más importantes como alterantes de la carne, son *Pseudomonas* y otras bacterias Gram negativas; de igual forma también participan, en menor grado, hongos y levaduras (Niven, 1994). Por ello es recomendable el almacenamiento a bajas temperaturas para disminuir las reacciones de oxidación de origen microbiano o rancidez cetónica, aunque pueden continuar las reacciones de las lipasas, esterases y fosfolipasas endógenas que hidrolizan los enlaces éster de los triacilglicéridos, liberando ácidos grasos, los cuales son más susceptibles a la oxidación que aquellos que se encuentran esterificando al glicerol (Nawar, 1993; Ranken, 1994). Cabe mencionar que la mayoría de los procesos de enranciamiento que se dan en los productos cárnicos no son de origen microbiano (Niven, 1994). Por otra parte, los fosfolípidos se consideran como el sustrato primario para las reacciones de oxidación de lípidos, debido a que poseen aproximadamente 100 veces más superficie que los triacilglicéridos, además de que los ácidos grasos que los conforman tienen más insaturaciones que aquellos que se encuentran en los triacilglicéridos (Nawar, 1993; Alasnier y col., 2000; Decker y col., 2005; Min y col., 2008; Brewer, 2009).

La carne cocida es más susceptible a la oxidación lipídica que la cruda debido, en parte, a los cambios cualitativos y cuantitativos en los catalizadores que se forman durante el cocimiento, y a que existe desnaturalización de las lipoproteínas de las membranas, liberando fosfolípidos. La oxidación de los lípidos en carne cruda aumenta si se somete a una reducción del tamaño (molido, picado) debido a la incorporación de aire y, en consecuencia, de oxígeno (Brewer, 1998 y 2009). Otras causas de este incremento son los ciclos de congelamiento y descongelamiento, el abuso en la temperatura de manejo y los tiempos prolongados de distribución y almacenamiento. Es importante mencionar que si existe un inicio de oxidación de lípidos en la carne cruda, la reacción se acelerará durante el procesamiento o cocción (Rhee, 1992; Brewer 2009).

2.4.3.1. Mecanismos de autooxidación

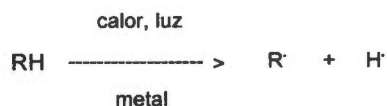
La característica fundamental de esta reacción, una secuencia compleja de cambios químicos resultado de la reacción espontánea de especies reactivas de oxígeno con los lípidos, presenta un período de inducción, durante el cual no es detectable el desarrollo de ningún mal olor o sabor (Macrae y col., 1993a; Hamilton, 1994); su duración depende de

componentes que pueden prolongarlo (prooxidantes) o acortarlo (antioxidantes). Al final de este período, la grasa se deteriora rápidamente, liberando compuestos volátiles (Macrae y col., 1993a; Jadhav y col, 1996).

La autooxidación se lleva a cabo por mecanismos de radicales libres (Macrae y col., 1993a; Hamilton 1994; Ho y Chen, 1994; McClements y Decker, 2000; Brewer, 2009), los cuales son átomos o grupos de átomos que poseen un solo electrón no apareado; son muy reactivos debido a que tienden a adquirir un electrón adicional para completar su octeto (Morrison y Boyd, 1970c). El mecanismo preciso depende de la naturaleza de las especies reactivas presentes y del medio ambiente fisicoquímico (McClements y Decker, 2000); sin embargo, la reacción involucra tres pasos: iniciación, propagación y terminación.

1) En la etapa de iniciación se forman los radicales libres mediante la abstracción homolítica de un átomo de hidrógeno del grupo α -metilénico de un lípido (RH) para formar un radical alquilo (Figura 6), este proceso es casi siempre muy lento. En virtud de que la energía de activación de la reacción ($\text{RH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{radicales libres}$) es elevada (35 kcal/mol), se requiere de un catalizador para iniciar la formación de los primeros radicales libres (Nawar, 1993; Ho y Chen, 1994), éste puede ser oxígeno singulete, luz o calor o trazas de ciertos metales (Ockerman, 1980; Hamilton 1994; Ho y Chen, 1994), incluidos los que están presentes en la clorofila y en la mioglobina (Cheftel y Cheftel, 1992).

Iniciación:



Propagación:



Terminación:



Fuente: Macrae y col., 1993a; Ho y Chen, 1994; McClements y Decker, 2000

Figura 6. Mecanismo de autooxidación de lípidos

En emulsiones aceite en agua, la principal causa de inestabilidad oxidativa es la interacción entre los hidroperóxidos de los lípidos localizados en la superficie de los góbulos de la fase dispersa, y los metales de transición que se encuentran en la fase acuosa. Por lo tanto, el mecanismo más probable para la oxidación de lípidos en emulsiones es la descomposición de los hidroperóxidos (ROOH) en radicales peroxilo (ROO $\cdot$) y alcoxilo (RO $\cdot$) que son altamente reactivos, mediante un catalizador metálico (M $^{n+}$ o M $^{(n+1)+}$; por ejemplo Fe $^{2+}$, Fe $^{3+}$) (McClements y Decker, 2000).

2) Durante la fase de propagación también se forman radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) con una subsecuente reacción de éstos con los lípidos que se encuentran en su vecindad, ya sea dentro de los glóbulos de la fase dispersa o en la interfase aceite-agua, formando hidroperóxidos (ROOH); los nuevos radicales ($\text{R}\cdot$) que se forman están disponibles para otras reacciones con oxígeno molecular (O_2). De esta manera, la reacción en cadena se propaga cuando los radicales peroxilo y alcoxilo reaccionan con otros lípidos que se encuentran en su vecindad inmediata (Macrae y col., 1993a; Ho y Chen, 1994; Jadhav y col. 1996; McClements y Decker, 2000). Debido a la estabilización por resonancia de las especies $\text{R}\cdot$, la reacción conlleva un cambio en la posición del doble enlace, dando lugar a la formación de hidroperóxidos que contienen grupos dieno conjugados, atípicos en los ácidos grasos naturales no oxidados (Nawar, 1993). Cabe mencionar que, debido a la alta velocidad de reacción entre los radicales alquilo y el oxígeno, la mayoría de los radicales libres se encuentran en forma de radicales peroxilo (Cheftel y Cheftel, 1992; Ho y Chen, 1994). Sin embargo, en el caso de formarse radicales alcoxilo, se pueden llevar a cabo reacciones de β -escisión, dando como resultado la generación de una gran variedad de moléculas, incluyendo aldehídos, cetonas, alcoholes e hidrocarburos (McClements y Decker, 2000), los cuales, junto con los productos de ruptura de los hidroperóxidos, son responsables de las características sensoriales de las grasas oxidadas (Nawar, 1993).

3) Finalmente, cuando la totalidad del oxígeno o de los lípidos han reaccionado, se inicia la fase de terminación (Larson, 1988; Macrae y col., 1993a). En ésta, al haber un incremento en la concentración de radicales libres, la frecuencia de reacción entre ellos también aumenta, dando como resultado un acoplamiento para formar compuestos más estables e inactivos (Larson, 1988; Ho y Chen, 1994; Jadhav y col., 1996; McClements y Decker, 2000).

Como se indica en la Figura 6, la oxidación fotosensible inicia la reacción ocurriendo en presencia de luz, oxígeno en estado triplete y un fotosensibilizador. Un ejemplo de fotosensibilizadores son los colorantes sintéticos, los pigmentos naturales como la clorofila, las flavinas, las porfirinas, la hemoglobina y la mioglobina, entre otros (Larson, 1988; Bhagavan y Nair, 1992; Hamilton 1994; Yang y Min, 1994; Min y col., 2008). Un sensibilizador puede absorber luz visible o cercana al UV, y pasar al estado excitado singulete ($^1\text{Sen}^*$) el cual tiene una configuración electrónica inestable y una vida media corta; por lo tanto, puede regresar rápidamente a su estado basal por emisión de luz fluorescente o puede pasar al estado excitado triplete ($^3\text{Sen}^*$) por un reacomodo interno de electrones. Este

estado tiene una vida media superior al estado singulete y puede regresar lentamente a su estado basal por emisión de luz fosforescente (Larson, 1988; Hamilton, 1994; Yang y Min, 1994).

Una vez que el fotosensibilizador se encuentra en el estado excitado triplete puede participar en dos rutas de reacciones: tipo I y tipo II. En la ruta tipo I el sensibilizador sirve como un iniciador de radicales libres, es decir $^3\text{Sen}^*$ reacciona con el sustrato (RH) para producir radicales ($\text{R}^\cdot$) por transferencia de hidrógeno (Yang y Min, 1994). En la ruta tipo II el sensibilizador reacciona con el oxígeno triplete para generar el oxígeno singulete, éste a su vez puede reaccionar con sustratos (RH) para formar productos oxidados (ROOH) (Bhagavan y Nair, 1992; Hamilton 1994; Yang y Min, 1994). También existe la posibilidad de que un electrón pueda ser transferido desde el $^3\text{Sen}^*$ al oxígeno triplete para formar el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el ión del radical sensibilizador (Sen^+) (Yang y Min, 1994). Esta última especie, al igual que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$), pueden reaccionar directamente a través de un átomo de hidrógeno metilénico del lípido (hidrógeno unido a carbonos adyacentes a un doble enlace), con la formación de un radical alquilo ($\text{R}^\cdot$) (Deshpande y col., 1996; Brewer, 2009). El radical hidroxilo es el más reactivo, tiene una vida media muy corta, por lo que provoca daño en las zonas inmediatas al sitio de su generación (Deshpande y col., 1996).

La desviación hacia una u otra ruta depende de la naturaleza química y concentración del sensibilizador, del sustrato, de la concentración de oxígeno y de las condiciones del medio de reacción como son el pH y los disolventes. Por otra parte, si cambian las condiciones de reacción también puede desviarse la ruta del tipo I al tipo II o viceversa. Generalmente los compuestos fácilmente oxidables, como los fenoles y las aminas, o los fácilmente reducibles, como las quinonas, favorecen la ruta tipo I; mientras que los compuestos que no se oxidan o reducen rápidamente como los dienos y compuestos aromáticos favorecen la ruta tipo II.

La solubilidad del oxígeno es otro de los factores que puede determinar la ruta predominante. La alta solubilidad del oxígeno en la mayoría de los disolventes orgánicos favorece la ruta tipo II; por el contrario, la baja solubilidad en agua desvía hacia la ruta tipo I. De esta manera, también la solubilidad de los sensibilizadores en los disolventes puede decidir el tipo de reacción que se llevará a cabo (Yang y Min, 1994).

Es importante mencionar que la oxidación de los lípidos tiene un profundo efecto sobre la calidad y vida de anaquel de los productos, así como en la salud de los consumidores. Como se mencionó, los productos secundarios de la oxidación le imparten sabor y olor a rancio. Por otro lado, las proteínas en presencia de lípidos en proceso de oxidación pueden reaccionar para formar enlaces con los carbonilos producidos en la oxidación, dando lugar a la formación de pigmentos oscuros (melanoides); los hidroperóxidos pueden inducir la oxidación de proteínas ricas en azufre, dando lugar a pérdidas nutritivas significativas; el malonaldehído, un producto de la oxidación, puede reaccionar con los grupos amino libres de diferentes cadenas polipeptídicas modificando algunas propiedades funcionales de las proteínas como la solubilidad o la capacidad de retención de agua. Finalmente la reacción de los radicales libres con las proteínas puede dar como resultado la formación de un radical libre lípido-proteína o uno proteico, en ambos casos puede darse una polimerización de las proteínas, este efecto disminuye la disponibilidad de varios aminoácidos y los valores de digestibilidad (Cheftel y col., 1993). Aunado a esto, pueden ocurrir cambios en el color por reacciones de los productos de oxidación con los pigmentos, además de propiciar la pérdida de vitaminas como α -tocoferol, ácido ascórbico y vitamina A, entre otras, que son agotadas durante la oxidación, al comportarse como antioxidantes (Jadhav y col., 1996).

2.4.3.2. Antioxidantes

Existe una gran variedad de compuestos tanto naturales como sintéticos con propiedades antioxidantes, su empleo en productos alimenticios debe cumplir ciertos requerimientos, siendo uno de los más importantes que sean seguros para la salud. Los principales antioxidantes utilizados son los fenoles mono o polioxihiídricos con varias sustituciones en el anillo, en virtud de que son excelentes donadores de electrones o de hidrógeno. Además, sus radicales intermedios son relativamente estables debido a la deslocalización por resonancia y a la falta de posiciones apropiadas para ser atacados por el oxígeno molecular (Nawar, 1993; Wang y col., 1998). Sin embargo, se debe tomar en consideración que algunas sustancias pueden retrasar la oxidación de lípidos bajo ciertas condiciones, pero también pueden promoverla cuando éstas cambian (McClements y Decker, 2000). El ascorbato, por ejemplo, puede actuar como antioxidante o prooxidante, dependiendo de la concentración de hidroperóxidos y de metales de bajo peso molecular en el medio (Decker y col., 2005).

Clasificación de los antioxidantes por su mecanismo de acción

De acuerdo a su mecanismo de acción, los antioxidantes se clasifican en primarios, aquellos que interrumpen la propagación de la reacción en cadena, y secundarios o preventivos. Cabe mencionar que la determinación del mecanismo de acción antioxidante en alimentos de origen cárnico puede ser difícil, debido a la naturaleza compleja y dinámica de estos productos, ya que se puede presentar la disminución en la concentración del antioxidante sin observar su efecto, o formarse prooxidantes durante el almacenamiento (Decker y col., 2005).

Antioxidantes primarios

Son sustancias capaces de donar hidrógeno o actuar como aceptores de radicales libres de alta energía para convertirlos a especies termodinámicamente más estables y de esta manera retrasar el paso de iniciación o interrumpir el paso de propagación de la autooxidación (Shahidi y col., 1992; Macrae y col., 1993a; Nawar, 1993; McClements y Decker, 2000; Huang y col., 2005). Estos antioxidantes reaccionan principalmente con radicales peroxilo ($\text{ROO}^\cdot$) aunque también pueden reaccionar con los radicales alcoxilo ($\text{RO}^\cdot$) y alquilo ($\text{R}^\cdot$), esto es debido a que los primeros se encuentran en mayor concentración, ya que el paso de propagación es el más lento de la autooxidación. Por otro lado, la energía de disociación del hidrógeno unido al antioxidante es más baja que la del hidrógeno unido a los lípidos, lo que facilita su abstracción y, finalmente, la baja concentración del antioxidante en el medio tiene como consecuencia que éste no pueda competir efectivamente con los radicales altamente reactivos, que casi siempre interaccionan con la primer biomolécula con la que entran en contacto (Decker, 1998). Las reacciones de estos antioxidantes se describen en la Figura 7

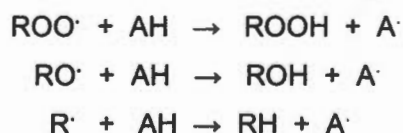


Figura 7. Mecanismo de antioxidantes primarios

Los compuestos fenólicos se incluyen dentro de esta categoría. La presencia de grupos donadores de electrones o de hidrógeno en las posiciones orto y para del fenol incrementan

su actividad antioxidante por efecto inductivo. Su eficiencia depende de varios factores, como la estabilidad o reactividad del radical del antioxidante formado después de la abstracción del hidrógeno; la facilidad para donar el hidrógeno varía con la naturaleza y número de grupos sustituyentes unidos al anillo; la presencia de grupos voluminosos en la vecindad del grupo hidroxilo puede influir por impedimento estérico; el efecto de la concentración del antioxidante sobre la velocidad de autooxidación está gobernada por la estructura, condiciones de oxidación y la naturaleza del sustrato (Jadhav y col., 1996). Los radicales intermedios de estos compuestos son relativamente estables debido a la deslocalización por resonancia y a la falta de posiciones apropiadas para ser atacados por el oxígeno molecular (Shahidi y col., 1992; Nawar, 1993). Sin embargo, se ha reportado que a concentraciones altas, los compuestos fenólicos pierden su actividad antioxidante para convertirse en prooxidantes, debido a su participación en el proceso de iniciación; asimismo, pierden su efectividad cuando se añaden a lípidos severamente oxidados (Shahidi y col., 1992; Jadhav y col., 1996).

Otros factores que influyen en su actividad son la volatilidad, la estabilidad al calor, la sensibilidad al pH y la solubilidad. Esta última es muy importante, debido a que los antioxidantes hidrofílicos son más efectivos que los hidrofóbicos al incorporarlos en grasas, mientras que los últimos son más efectivos en emulsiones aceite en agua; esto es debido a que los antioxidantes polares se concentran en la interfase aceite-aire de la grasa que es donde prevalece la oxidación y, en el caso de los antioxidantes no polares, éstos son retenidos en las gotas de grasa y/o se acumulan en la interfase aceite-agua de la emulsión que es el sitio donde los hidroperóxidos de superficie activa entran en contacto con los prooxidantes que se encuentran en la fase acuosa, como los metales de transición (Decker, 1998; McClements y Decker, 2000; Decker y col., 2005). Por esta razón la efectividad de los antioxidantes para retardar la oxidación de lípidos en una emulsión aceite-agua se incrementa conforme su polaridad disminuye (McClements y Decker, 2000).

Los antioxidantes primarios sintéticos más utilizados en alimentos son 3-*t*-butil-4-hidroxianisol (BHA, por sus siglas en inglés), 3,5-di-*t*-butil-4-hidroxitolueno (BHT, por sus siglas en inglés) y *t*-butilhidroquinona (TBHQ, por sus siglas en inglés), los cuales son altamente efectivos en el control de la oxidación de lípidos. Dentro de los antioxidantes naturales se encuentran los tocoferoles, los extractos de fruta (uva, fresas, cerezas, entre

otras) y extractos de plantas (orégano, romero, salvia, tomillo), entre otros (McClements y Decker, 2000).

Antioxidantes secundarios

Los antioxidantes secundarios o preventivos pueden retardar la oxidación de lípidos a través de una variedad de mecanismos los cuales incluyen secuestrar a los metales de transición, eliminar al oxígeno (esto es, evitan que el oxígeno se encuentre disponible para reaccionar con los radicales alquilo) (Nawar, 1993; Rajalakshmi y Narasimhan, 1996), la formación de productos de oscurecimiento con actividad antioxidante (melanoides, productos de la reacción histidina-glucosa) (Brewer, 1998), la descomposición de hidroperóxidos a productos finales más estables (Shahidi y col., 1992; Rajalakshmi y Narasimhan, 1996) y la desactivación de especies reactivas de oxígeno (McClements y Decker, 2000).

Dentro de esta categoría también se incluyen los antioxidantes sinergistas, los cuales pueden actuar como donadores de hidrógeno para los radicales fenoxilo, y de esta forma se regeneran los antioxidantes primarios (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996; McClements y Decker, 2000). Otro mecanismo es a través de la formación de un medio ácido que mejore la estabilidad de los últimos (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996).

En las emulsiones aceite en agua, los antioxidantes secundarios más importantes son aquellos que secuestran a los metales de transición, debido a que una de las principales causas de oxidación de lípidos en estos sistemas es la proximidad que existe entre los lípidos y los hidroperóxidos en la superficie de los glóbulos de la fase dispersa con los metales que se encuentran en la fase acuosa. Los secuestrantes pueden inhibir la reacción por diferentes mecanismos, entre los que se encuentran la prevención del ciclo redox del metal, la formación de complejos insolubles, la ocupación de los sitios de coordinación del metal y por impedimento estérico.

Algunos ejemplos de este tipo de antioxidantes sintéticos utilizados en alimentos son el ácido etilendiaminotetracético (EDTA, por sus siglas en inglés), fitatos y polifosfatos; dentro de los antioxidantes naturales, se utiliza el ácido cítrico (Nawar, 1993; Coppen, 1994; McClements y Decker, 2000) y el ascórbico (Nawar, 1993; Hamilton, 1994), proteínas,

hidrolizados de proteínas, polisacáridos (McClements y Decker, 2000), fosfolípidos (Macrae y col., 1993a) y compuestos fenólicos (Shahidi y col., 1992).

Clasificación de los antioxidantes por su origen

De acuerdo con esta característica, se dividen en sintéticos y naturales (Zheng y Wang, 2001).

Antioxidantes sintéticos

Son los que generalmente se adicionan a los alimentos. En México los antioxidantes que se permite incorporar a los productos cárnicos cocidos en concentración no mayor a 100 mg/kg son BHA, BHT y TBHQ (Figura 8) (NOM, 2005).

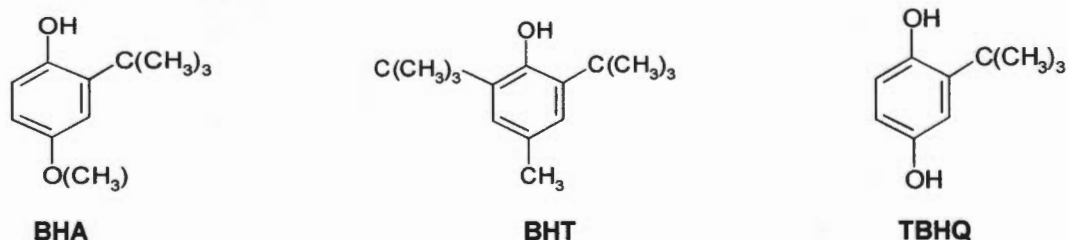


Figura 8. Estructura química del BHA, BHT y TBHQ (Shahidi y col., 1992)

BHA y el BHT son antioxidantes fenólicos monoxihídricos, muy solubles en grasa e insolubles en agua, tienen un excelente poder antioxidante en grasas animales (Shahidi y col., 1992; Macrae y col., 1993a; Nawar, 1993; Coppen, 1994). Por su alta volatilidad, se utilizan como aditivos en materiales de empaque debido a que pueden migrar a los alimentos. Asimismo, cuando se agregan en combinación presentan efecto sinérgico (Shahidi y col., 1992). TBHQ es también un antioxidante fenólico con un grupo butilo unido al anillo bencénico (Macrae y col., 1993a), es soluble en grasa y tiene una actividad potente para proteger de la oxidación a los aceites vegetales (Coppen, 1994).

Estos tres antioxidantes, al reaccionar con los radicales libres de los lípidos, forman radicales intermedios que pueden experimentar una gran variedad de reacciones, como el reacomodo de la molécula o el acoplamiento con otro radical, para dar lugar a compuestos

más estables (Shahidi y col., 1992; Nawar, 1993). Algunos de estos productos pueden inactivar radicales libres, la cual puede influir en el efecto del antioxidante original durante el curso de su degradación (Shahidi y col., 1992). Sin embargo, la toxicología de estos antioxidantes ha sido controversial, especialmente después de estudios a largo plazo (Madhavi y Salunkhe, 1996).

Antioxidantes naturales

Este tipo de antioxidantes pueden ser compuestos que se encuentran naturalmente en los alimentos o pueden originarse a partir de la reacción de ciertas sustancias durante el procesamiento (Shahidi y col., 1992). Dentro de esta categoría se incluyen a los antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y los no enzimáticos como los inhibidores de las enzimas oxidativas (ciclooxigenasa), cofactores de enzimas antioxidantes (por ejemplo, el selenio es un factor de selenoproteínas como la glutatión peroxidasa), inactivadores de especies reactivas de oxígeno, secuestrantes de metales de transición (Huang y col., 2005) e inactivadores de radicales libres (Shahidi y col., 1992).

El método más importante para controlar o eliminar la generación de radicales libres en el músculo es mediante la remoción eficiente de especies reactivas como el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este proceso se lleva a cabo por los siguientes sistemas enzimáticos:

I. La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la reducción del radical anión superóxido a peróxido de hidrógeno: $2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

La dismutación es más rápida a pH ácido y disminuye conforme éste aumenta a valores alcalinos. La biosíntesis de la enzima parece estar bajo un riguroso control biológico, en virtud de que una exposición a altas concentraciones de $O_2^{\cdot -}$ incrementa su producción. El peróxido de hidrógeno formado es reducido a agua por la glutatión peroxidasa (GSH-Px) que cataliza la oxidación de la glutatión peroxidasa reducida (GSH) a su forma oxidada (GSSG), mediante la reacción: $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$

II. La catalasa es otra enzima que ayuda a prevenir la acumulación del peróxido de hidrógeno, como consecuencia de su alta velocidad para la destrucción del H_2O_2 . Esta

enzima raramente presenta inhibición por sustrato. El mecanismo de la reacción es el siguiente: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

III. Al igual que la catalasa, la enzima glutatión peroxidasa no se satura con el sustrato (Deshpande y col., 1996). Por otro lado, las actividades de la SOD y de la glutatión peroxidasa dependen de la disponibilidad de manganeso y cobre/zinc para la primera y selenio para la segunda, a los cuales se les denomina antioxidantes minerales (Macrae y col., 1993a).

IV. Los tocoferoles son los antioxidantes distribuidos más ampliamente en la naturaleza y constituyen el principal antioxidante de los aceites vegetales. Las concentraciones de estos compuestos en el músculo y grasa animal son bajas y dependen de la dieta del animal (Nawar, 1993).

Otras fuentes importantes de antioxidantes naturales son las oleaginosas, los cereales, las frutas, los vegetales, las hierbas y especias, entre otras. El ácido fítico, uno de los principales componentes de las oleaginosas, es un potente agente secuestrante de metales. Las proantocianidinas de frutas tales como uvas, grosellas y arándanos, funcionan como inactivadores del radical anión superóxido. Las antocianinas, uno de los principales pigmentos de plantas superiores, también presentan actividad antioxidante.

Los extractos de plantas contienen una variedad de productos, pero sólo ciertos principios activos son los responsables de su actividad antioxidante. Un ejemplo de ellos son los ácidos fenólicos. Los extractos acuosos de avena, en bajas concentraciones, retardan la oxidación de lípidos, debido a la presencia del ácido dihidrocafeico y de fosfolípidos. La vainilla, uno de los saborizantes que más se utiliza, tiene propiedades antioxidantes debido a la presencia de la vainillina y al ácido vainílico.

En lo que se refiere a las especias, en la pimienta negra, la piperina y compuestos relacionados tienen una actividad antioxidante superior a la del α -tocoferol. En el caso del clavo, los principales principios activos que se han identificado son el ácido gálico (Figura 5) y el eugenol (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996).

Por otra parte las hierbas se han utilizado para un gran número de propósitos, incluyendo

medicina, nutrición, como saborizantes, en la elaboración de bebidas, de colorantes, de repelentes, de fragancias, de cosméticos, etcétera. Su incorporación como ingredientes tradicionales a los alimentos cada vez es mayor por su capacidad para incrementar y complementar los sabores (Macrae y col., 1993b; Hernández-Ángel y Prieto-González, 1999; Zheng y Wang, 2001). Se han hecho estudios sobre la actividad antioxidante de las hierbas completas y sus extractos; estos indican que una gran cantidad de extractos (tomillo, romero, salvia europea, orégano, jengibre, clavo) son tan efectivos como los antioxidantes sintéticos BHA y BHT o el antioxidante natural α -tocoferol (Madhavi y col., 1996).

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y la salvia europea (*Salvia officinalis* L.) se reportaron como dos de las especies con mayor actividad antioxidante en salchichas (Madsen y Bertelsen, 1995). El ácido carnósico junto con el carnosol y el ácido rosmarínico son los principales compuestos que les confieren esta actividad (Figura 9) (Leung y Foster, 1996; Rajalakshmi y Narasimhan, 1996; Zheng y Wang, 2001).

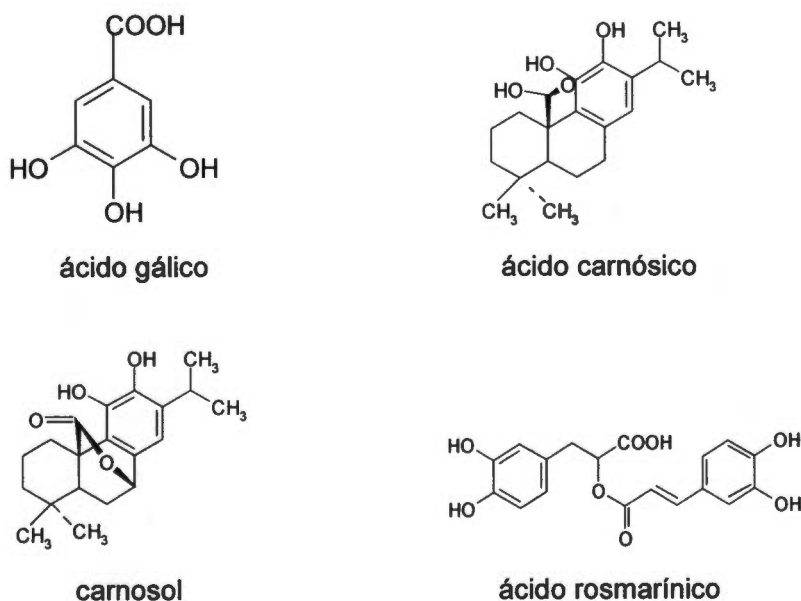


Figura 9. Estructura química del ácido gálico, ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico (Wellwood y Cole, 2004)

Zheng y Wang (2001) reportaron que los extractos de orégano mexicano (*Poliomintha longiflora* Gray) y griego (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*), poseen un elevado contenido de ácido rosmarínico y de compuestos derivados del ácido hidroxicinámico, lo que les confiere una actividad antioxidante similar al BHA y superior a la del α -tocoferol.

2.4.3.3. Análisis de la estabilidad oxidativa de lípidos

Debido a que el proceso de oxidación de lípidos es muy complejo e implica numerosas reacciones que dan lugar a una variedad de cambios químicos y físicos, una medida química de la oxidación es solo un estimado de las reacciones totales que se están llevando a cabo. Como se mencionó, la oxidación es causada por la reacción del oxígeno atmosférico con las dobles ligaduras de las grasas insaturadas, como resultado se producen peróxidos, intermediarios o productos primarios de la oxidación; posteriormente éstos se rompen dando lugar a una variedad de productos secundarios. La formación de hidroperóxidos o sus productos de descomposición puede ser medida por métodos químicos, instrumentales o sensoriales. Dentro de los métodos químicos están el valor de peróxido, el índice de anisidina, la reacción con ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés), y la prueba de Kreis, entre otros. En los métodos instrumentales están los espectrofotométricos, que incluyen espectrofotometría ultravioleta y la prueba del blanqueamiento de caroteno, entre otros; los análisis cromatográficos, donde se utiliza cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía de gases, el análisis de los gases del espacio de cabeza y cromatografía de gases-espectrometría de masas; y la medición de absorción de oxígeno, entre los cuales está el uso del medidor de oxígeno disuelto. Los métodos sensoriales se aplican para evaluar los cambios del sabor y olor de los alimentos (Nawar 1993; Rajalakshmi y Narasimhan, 1996).

El método más común para medir la oxidación de lípidos en carne y productos cárnicos, es el análisis de las sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés) (Ockerman, 1980; Nawar, 1993), con el que se cuantifican productos secundarios de oxidación. El análisis se basa en la reacción de alcanales, alquenes, precursores no volátiles de estos compuestos y 2,4-dienales con el ácido 2-tiobarbitúrico (Decker y col., 2005); de estos compuestos, sólo los dienales como el malonaldehído, generan un complejo colorido (rojo) cuya longitud de onda de máxima absorción es 530 nm. Sin embargo, el ácido 2-tiobarbitúrico puede reaccionar también con sacarosa y algunos componentes del humo de leña dando también un color rojo, por lo que en caso de carnes curadas y ahumadas se deben establecer correcciones (Nawar, 1993).

Existen dos métodos básicos para realizar esta prueba, uno de ellos es llevar a cabo la reacción de TBA con el malonaldehído directamente en el alimento, seguido de la extracción

del complejo colorido (Rossell, 1994); sin embargo, debido a que el dialdehído casi siempre está unido a proteínas de la carne, para liberarlo se requiere el uso de ácidos fuertes y temperaturas altas, lo cual puede afectar la estabilidad del complejo malonaldehído-TBA, así como promover la autooxidación de la muestra (Li y col., 1999), por lo que es recomendable realizar la prueba por el segundo método que consiste en destilar el malonaldehído del alimento y posteriormente llevar a cabo la reacción del destilado con TBA (Rossell, 1994). Debido a que el malonaldehído y las sustancias capaces de reaccionar con TBA se producen en cantidades sustanciales a partir de la oxidación de ácidos grasos que contengan tres o más dobles enlaces (Nawar, 1993) y considerando que la carne de cerdo contiene ácido linolénico (18:3) (0.04 mg/100g) y araquidónico (20:4) (0.08 mg/100 g) (Rhee, 1992), cuya velocidad de oxidación es mayor a la de los ácidos mono y diinsaturados, este método se considera útil en la determinación de los estados iniciales de rancidez en lardo y alimentos que contengan carne de cerdo (Rossell, 1994). Hay que considerar que la concentración de TBARS tiende a incrementarse durante el almacenamiento hasta alcanzar un máximo, y después disminuir. Esta disminución puede ser debida a reacciones posteriores del malonaldehído con algunos componentes de la carne, como los aminoácidos y las moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Shahidi y Pegg, 1994).

2.5. Propiedades funcionales

El término "propiedades funcionales" que se aplica a los ingredientes alimenticios se define como toda propiedad no nutritiva que tiene influencia en la utilidad de un ingrediente en un alimento. Las propiedades funcionales afectan a las características sensoriales de los alimentos aunque también influyen en el comportamiento físico de los mismos o de los ingredientes alimenticios durante su preparación, transformación o almacenamiento (Smith, 1988; Cheftel y col., 1993). Las propiedades fisicoquímicas que determinan la funcionalidad de sistemas complejos se derivan de su composición (aminoácidos, ácidos grasos o azúcares), así como de las estructuras espaciales de éstas (Smith, 1988). Las propiedades funcionales de las proteínas son propiedades fisicoquímicas que le permiten contribuir a que los alimentos exhiban características deseables. Se pueden clasificar en tres grupos principales:

a) Propiedades de hidratación (dependiente de las interacciones proteína-agua). Incluye la absorción y la retención de agua, hinchamiento, adhesión, dispersabilidad, solubilidad y viscosidad.

b) Propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína. Intervienen en procesos como la precipitación, gelificación, y formación de otras estructuras diferentes (fibras y pastas proteicas).

c) Propiedades superficiales. Se relaciona con la tensión superficial, la emulsificación y las características espumantes.

Estas propiedades no son totalmente independientes; por ejemplo la viscosidad y solubilidad dependen de las interacciones proteína-agua y proteína-proteína (Cheftel y col., 1993). Las proteínas miofibrilares son las que principalmente contribuyen en la funcionalidad de los productos cárnicos procesados. Propiedades fisicoquímicas tales como la carga de superficie, contenido de grupos sulfhidrilo, hidrofobicidad, estabilidad conformacional, comportamiento de asociación/disociación pueden alterarse por factores extrínsecos como fuerza iónica, la presencia de diferentes iones, pH, temperatura, contenido de humedad e interacciones con otros ingredientes (Smith, 1988). En emulsiones cárnicas crudas, las propiedades funcionales más importantes son: solubilidad, emulsificación y viscosidad (Smith, 1988; Xiong y Blanchard, 1994).

2.5.1. Solubilidad de las proteínas

La solubilización corresponde a una disociación simultánea de las moléculas del disolvente y de las moléculas de proteína, previa a una dispersión de esta última en el disolvente, con una superficie interfacial de máximo contacto entre la proteína y el disolvente. Para que una proteína pueda solubilizarse es necesario que reaccione, en todo lo posible, con el disolvente (a través de enlaces hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e iónicas); por lo tanto, la solubilidad depende fundamentalmente del pH, tipo de disolvente, temperatura y fuerza iónica (Cheftel y col., 1989c). Cuando el pH del medio en el que se encuentran las proteínas es cercano a su punto isoeléctrico (pI), las moléculas exhiben interacciones mínimas con el agua y sus cargas netas son lo suficientemente bajas como para permitir que las cadenas polipeptídicas se aproximen y se formen agregados. A valores de pH superiores o inferiores al pI, las proteínas presentan carga eléctrica positiva o negativa y las moléculas de agua pueden interaccionar con estas cargas, contribuyendo a la solubilización. Asimismo, las cadenas proteicas que tienen cargas eléctricas del mismo signo tienden a repelerse y a disociarse o desplegarse. El tipo de disolvente también tiene influencia en la solubilidad;

ciertos disolventes como el etanol pueden competir por las moléculas de agua, por lo que reducen la solubilidad de las proteínas.

La temperatura es otro de los factores que modifica la solubilidad de las proteínas, cuando esta se incrementa entre 0 y 40-50°C la solubilidad también aumenta. Por encima de esta temperatura los movimientos moleculares son suficientes para romper los enlaces implicados en la estabilización de las estructuras secundaria y terciaria, trayendo como consecuencia la desnaturalización de la proteína.

Con relación a la fuerza iónica, los iones de las sales neutras en molaridades del orden de 0.5 a 1 M pueden incrementar la solubilidad, debido a que estos reaccionan con las cargas de las proteínas y disminuyen la atracción electrostática entre cargas opuestas de moléculas adyacentes. Si la concentración de sales neutras es superior a 1 M hay una competencia entre la proteína y los iones salinos por las moléculas de agua, necesarias para sus respectivas solvataciones, por lo tanto no hay suficientes moléculas de agua disponibles para la solvatación de la proteína, puesto que la mayor parte del agua está fuertemente ligada a las sales, como consecuencia las interacciones proteína-proteína dominan sobre las interacciones proteína-agua, lo que puede conducir a la formación de agregados seguida por la precipitación de las moléculas proteicas (Cheftel y col., 1993).

Con base en la información anterior, se puede inferir que al homogenizar la fibra muscular en un medio cuya concentración salina sea relativamente elevada (fuerza iónica superior a 0.6) se producirá la hidratación de esta, la disociación de la actomiosina, la solubilización de la miosina y la extracción de las miofibrillas (Smith, 1988; Schmidt, 1994). La miosina solubilizada tiene mayor capacidad de retención de agua debido a que la proteína expone sus grupos hidrofílicos al disolvente. Asimismo, la sal incrementa la capacidad de retención de agua de la miosina al aumentar la carga negativa neta de la molécula (Smith, 1988). Por otro lado, la elevada solubilidad inicial de la miosina facilita su difusión a la interfase agua/aceite, lo que mejora su actividad de superficie (Cheftel y col., 1993).

2.5.2. Emulsificación

Una emulsión típica consiste de dos fases líquidas inmiscibles, una de las cuales se encuentra dispersa en la otra en forma de una suspensión coloidal. En las pastas cárnicas,

los glóbulos de grasa constituyen la fase dispersa mientras que la fase continua es una matriz acuosa que contiene sales, proteínas solubles e insolubles y partículas de fibras musculares y de tejido conectivo (Lee, 1985; Gordon y Barbut, 1992b; Hultin, 1993); en estas pastas los glóbulos de grasa son más grandes del tamaño requerido para formar una emulsión verdadera ($< 20 \mu\text{m}$) (Gordon y Barbut, 1992b). Sin embargo, este sistema de dispersión es lo más cercano a una emulsión aceite en agua (Rizvi, 1981; Flores y Bermell, 1985).

Existe una correlación positiva entre solubilidad de las proteínas y su capacidad emulsionante, ya que las proteínas deben solubilizarse para que emigren a la interfase y muestren sus propiedades superficiales (Cheftel y col., 1989d). Durante la preparación de la pasta cárnica las proteínas miofibrilares solubilizadas forman una membrana cohesiva y viscosa alrededor de los glóbulos de grasa rodeándolos e inmovilizándolos. La actomiosina y la miosina son las principales proteínas que forman esta membrana, siendo la miosina la que se encuentra en mayor cantidad (Flores y Bermell, 1985; Gordon y Barbut, 1992a). La miosina funciona como emulsificante debido a que posee una región con grupos eléctricamente neutros, que se orientan hacia los glóbulos de grasa, además de poseer grupos cargados negativamente que se orientan hacia la fase continua (acuosa), además de tener la flexibilidad molecular para desdoblarse en la interfase y de esta manera disminuir la tensión superficial. La estabilidad de la emulsión se mantiene por repulsión electrostática entre las moléculas de miosina cargadas negativamente (Schmidt y col., 1981; Flores y Bermell, 1985; Smith, 1988; Dickinson, 1993).

2.5.3. Viscosidad

La viscosidad de un fluido se define como la fricción interna de un material o su resistencia al flujo cuando se le aplica una fuerza. En un fluido viscoso ideal, el coeficiente de viscosidad es una constante y corresponde a la pendiente de una gráfica de esfuerzo de corte versus el gradiente de deformación. Para un fluido viscoso no ideal, la misma gráfica presenta una relación no lineal y por lo tanto no es posible obtener el coeficiente de viscosidad como una constante; por lo que se obtiene un coeficiente dado por la pendiente de una línea recta tangente en un punto de la curva, la cual es llamada viscosidad aparente (McClements, 1999c).

Los factores relacionados con la estabilidad de una emulsión intervienen en la ecuación de Stokes:

$$V = D^2 (d_i - d_o) g / 18 \eta \quad \text{Ecuación 1}$$

donde:

V = velocidad de separación

D = diámetro de las partículas dispersas

d_i y d_o = densidades de las fases dispersa y continua, respectivamente

g = aceleración de la gravedad

η = viscosidad

Según esta ecuación, la velocidad de separación depende, esencialmente, del diámetro de las partículas dispersas y de la viscosidad, de manera que, reduciendo el diámetro de los microglóbulos dispersos y aumentando la viscosidad del sistema, se consigue una mayor estabilidad de la emulsión (Flores y Bermell, 1985). Cabe mencionar que la consecuencia de que las fibras musculares se hidraten y que la miosina se solubilice, es el incremento en la viscosidad de la fase continua, la cual estabiliza a la grasa dispersa en una pasta cruda (Smith, 1988).

2.5.4. Degradación proteica

Los cambios químicos y estructurales *postmortem* en el músculo están directamente relacionados con la degradación de las proteínas miofibrilares. Estos cambios involucran la disminución de pH de 7.1 a 5.2, seguido por la fragmentación de las proteínas miofibrilares y un incremento en la disociación de la actomiosina (Robbins y col., 1979). La mayoría de estos cambios se debe al incremento en la liberación y actividad de enzimas proteolíticas endógenas, calpains y catepsinas (Robbins y col., 1979; Cheftel y col., 1989b; Alarcón-Rojo, 1992; Pérez-Chabela y col., 2000; Signorini, 2002). Las enzimas lisosomales o catepsinas tienen actividad a pH ácido (3 a 6), las más importantes halladas en el músculo son la B, H, L y D. El sitio de hidrólisis de la cadena pesada de la miosina depende del tipo de catepsina que la realiza. La catepsina B rompe en el sitio de unión de la meromiosina pesada y ligera, obteniéndose fragmentos de 10 a 50 kDa y de 150 kDa; la catepsina L fragmenta a la molécula inicialmente a la altura de las cabezas globulares para posteriormente degradar a fragmentos con un peso molecular entre 67 y 90 kDa; la catepsina D hidroliza a la proteína entre las cabezas globulares y la cola de la miosina,

formándose fragmentos de aproximadamente 120 y 90 kDa. La actividad enzimática es directamente proporcional a la temperatura, obteniéndose mayor degradación cuando la carne se almacena a temperatura ambiente que cuando se conserva bajo refrigeración (Signorini, 2000). Por otro lado, Spainer y col. (1991), reportaron que los radicales libres y los productos de la oxidación de los lípidos de la membrana del músculo causan cambios en la conformación de algunas proteínas, como las catepsinas B, H y/o L, lo cual puede modificar su actividad proteolítica. Las calpains son proteasas que requieren calcio para su activación, tienen un pH óptimo de 7.5. El sistema calpaina está formado por la μ y m calpaina así como su inhibidor natural, calpastatina. Este sistema está involucrado en los primeros signos de degradación de las proteínas miofibrilares por rompimiento de los discos Z; también pueden degradar la troponina T, la nebulina, la titina y la diesmina, pero la miosina y la actina no son degradadas. Sin embargo, una vez alcanzado el pH final de la carne, la actividad de estas enzimas probablemente no sea significativa, en virtud de que a pH entre 5.5 a 5.8 retienen entre 24-28% de su actividad (Pérez-Chabela y col., 2000). La proteólisis también puede ser consecuencia de la presencia de enzimas exógenas, que son resultado del metabolismo extracelular de microorganismos de la flora nativa. Algunos grupos microbianos que pueden estar presentes en productos cárnicos que presentan actividad proteolítica son *Pseudomonas* spp (Bala y col., 1979; Signorini, 2002; García-Barrientos y col., 2006) y *Lactobacillus* (Fadda y col., 1999). *Pseudomonas* son las bacterias con mayor actividad proteolítica en carne, su pH óptimo de actividad está entre 6.5 y 8.3; sin embargo, García-Barrientos y col. (2006) reportó actividad de la proteasa obtenida de *Pseudomonas fluorescens* a pH 4. Estas enzimas actúan principalmente sobre actina (Alanis y col., 1999, mencionado en García-Barrientos y col., 2006)

2.5.5. Tamaño de partícula

Una emulsión se puede desestabilizar debido a fenómenos: el desplazamiento de los glóbulos de la fase dispersa; la floculación por aglomeración de partículas; la coalescencia por unión o fusión de partículas; y la inversión de fase de aceite en agua a agua en aceite, o viceversa. Algunas propiedades de las emulsiones, como la vida de anaquel, la apariencia, la textura, el sabor y la estabilidad están determinadas por el tamaño de los glóbulos de la fase dispersa. Si todos estos son del tamaño promedio similar (distribución normal de una población) se dice que es una emulsión monodispersa; si la distribución del tamaño de partícula está dado por más de una población, es referida como una emulsión polidispersa;

en la primera la distribución del tamaño de partícula puede ser caracterizado por su diámetro o radio; cuando se trata de emulsiones polidispersas el diámetro medio puede conocerse mediante la presión osmótica, mientras que las determinaciones utilizando sedimentación y dispersión de luz dan información acerca del diámetro medio de su superficie, por ejemplo el diámetro medio volumen-superficie [3,2] está relacionado con el área de la superficie de las gotas expuesta a la fase continua por unidad de volumen de la emulsión (McClements, 1999a). Por otro lado, al reducirse el diámetro de los glóbulos dispersos se tiene mayor estabilidad de la emulsión; sin embargo, el tamaño de estas gotas no es un factor primordial en la velocidad de oxidación de los lípidos que las conforman (Decker y col., 2005). El diámetro de partícula puede reducirse incrementando la velocidad de rotación del homogenizador o prolongando el tiempo de homogenización (Rizvi, 1981; McClements, 1999b). Sin embargo, para lograr tamaños de partícula pequeños se eleva considerablemente la temperatura del medio; en emulsiones proteicas, esto ocasiona la pérdida de estabilidad de la emulsión por desnaturalización parcial de las proteínas, lo que disminuye su capacidad para cubrir a los glóbulos de grasa. Como consecuencia, la matriz proteica se desestabiliza y la grasa se separa de la emulsión (Rizvi, 1981; Lee, 1985; Smith, 1988).

3. JUSTIFICACIÓN

Dado que la tendencia en la producción de alimentos es hacia el uso de aditivos de origen natural, y en virtud de que la oxidación de las grasas insaturadas y pigmentos en la carne cruda se inicia inmediatamente después de la matanza, desarrollando olores y sabores desagradables, así como una modificación del color, es importante retardar y disminuir la oxidación de estos compuestos mediante la utilización de antioxidantes naturales de origen vegetal.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Determinar el efecto antioxidante de los extractos de romero, salvia de bolita y orégano en pastas de carne cruda de cerdo, así como posibles alteraciones en las características fisicoquímicas y funcionales de estas pastas.

4.2. Específicos

- Separar, identificar y cuantificar los compuestos antioxidantes que se encuentran en mayor concentración en los extractos de orégano fresco, orégano seco y romero fresco obtenidos con cloroformo y de orégano seco, romero fresco y salvia fresca obtenidos con etanol
- Estudiar la estabilidad de los compuestos antioxidantes de los extractos de orégano seco, romero fresco, salvia de bolita fresca obtenidos con etanol, almacenados a dos temperaturas (refrigeración y 20°C)
- Determinar el mecanismo de acción de los compuestos antioxidantes de los extractos de orégano seco, romero fresco, salvia de bolita fresca
- Comparar el efecto antioxidante de los extractos de romero fresco, y de orégano fresco y seco obtenidos con cloroformo que es un disolvente no reconocido como seguro (no GRAS) y etanol que es un disolvente seguro (GRAS).
- Estudiar el efecto de los extractos de orégano fresco, orégano seco y romero fresco obtenidos con cloroformo y etanol sobre los parámetros fisicoquímicos (TBARS, color, pH) de las pastas cárnicas con alta y baja oxidación inicial de lípidos durante el almacenamiento

a temperatura ambiente y en refrigeración

- Estudiar el efecto de los extractos de orégano seco, romero fresco y salvia de bolita fresca obtenidos con etanol y sus compuestos antioxidantes (aislados del extracto y reactivos analíticos puros) sobre parámetros fisicoquímicos (TBARS, color, pH, degradación proteica) y físicos (tamaño de partícula) de las pastas cárnicas

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de los extractos de hierbas

5.1.1. Extractos de romero fresco en cloroformo y en etanol

El romero fresco se adquirió en el mercado de Iztapalapa, D. F., México, proveniente del Estado de Morelos, después de aproximadamente 24 h de haber sido cortado. El extracto se obtuvo de hojas de romero frescas, basándose en los resultados de Wellwood y Cole (2004) referente a la posible degradación del ácido carnósico ocasionada por el proceso de secado. Por otro lado, siendo el romero un esclerófilo (presenta endurecimiento de la esclerótica, membrana dura y opaca de color blanquecino que rodea las hojas), las hojas tienen menor concentración de agua que otras hierbas.

El extracto en cloroformo se obtuvo de acuerdo con el método utilizado por Chang y col. (1977) reportado por Hernández-Hernández (2004). Las hojas de romero fresco se picaron hasta obtener trozos de aproximadamente 3 mm de longitud; se colocaron 10 g en un matraz bola, agregando 40 mL de cloroformo. La extracción se llevó a cabo en reflujo durante 2 h a presión atmosférica. Al término de este tiempo la mezcla se dejó enfriar, se filtró a través de manta de cielo y se lavó el residuo sólido con 40 mL de disolvente fresco. A continuación se filtró utilizando papel Whatman 4, posteriormente se eliminó el disolvente del filtrado utilizando rotavapor Buchi 011 (Buchi, Flawil, Suiza) a 55°C. Se pesó el residuo libre de disolvente para finalmente agregar un volumen conocido de cloroformo y almacenarlo a 4°C en un frasco ámbar, hasta su utilización.

El extracto de romero fresco en etanol se obtuvo según la metodología utilizada por Wang y col. (1998), reportada por Hernández-Hernández (2004). Las hojas frescas de romero se picaron hasta obtener trozos de aproximadamente 3 mm de longitud, se colocaron 5 g en un frasco ámbar y se agregaron 50 mL de etanol, la mezcla se maceró a 20°C. Debido a la inestabilidad del ácido carnósico presente en el extracto, se trabajó con dos tiempos de maceración distintos: 3 horas y 10 días, en ambos casos con agitación diaria durante aproximadamente 10 h en una agitadora-incubadora orbital Lab-line modelo 3525CC (Lab-line Instruments, Melrose Park, Illinois) a 75 rpm; se filtró en una manta de cielo, utilizando 25 mL de disolvente fresco para lavar el residuo sólido, posteriormente se filtró a través de

papel filtro Whatman 4; se eliminó el disolvente en un rotavapor Buchi 011, a 55°C. Finalmente se pesó el extracto y se agregó un volumen conocido de etanol, almacenándose a 4°C en un frasco ámbar tapado, hasta su utilización aproximadamente 24 h después.

5.1.2. Extracto de romero fresco en cloroformo/etanol

El objetivo de emplear este extracto fue, por una parte, incorporar el extracto a la pasta después de eliminar completamente al cloroformo (disolvente no GRAS) y sustituirlo por etanol (GRAS). Además, existía el interés por conocer posibles cambios en la actividad antioxidante del extracto, una vez disuelto en etanol. Para la preparación de este extracto se disolvieron 30 mg de extracto de romero fresco obtenido con cloroformo en 30 mL de etanol; con base en su solubilidad, previamente determinada (88.16%) se definió la concentración de extracto que debía agregarse a las pastas, calculado con base en el peso de la grasa incorporada a la pasta.

5.1.3. Extractos de orégano fresco y seco en cloroformo y en etanol

El orégano fresco fue adquirido en el mercado de Sonora, D. F., México, proveniente del poblado de Santiago Mamalhuazuca, Estado de México, después de aproximadamente 24 h de haber sido cortado. Su identificación taxonómica fue realizada por los profesores Ana Rosa López Ferrari y Jorge Santana, del Herbario Metropolitano "Dr. Ramón Riba y Nava Esparza" de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, concluyendo que se trataba de *Origanum vulgare* L. Las hojas frescas se separaron de la planta, se secaron en un horno de secado (Ríos Rocha, Modelo HS-41, México) a 30°C durante 18 h y se almacenaron en un frasco ámbar tapado a 20°C y ausencia de luz hasta su utilización.

Para obtener el extracto de orégano fresco en cloroformo, se picaron las hojas finamente, se colocaron 10 g en un matraz y se agregaron 40 mL de cloroformo. Para la obtención del extracto de orégano seco, se colocaron 2.32 g (equivale a 10 g de orégano fresco) de hojas molidas en el matraz con un volumen de disolvente similar al de las hojas frescas, siguiendo el procedimiento descrito en el punto 5.1.1.

Para obtener los extractos de orégano fresco y seco con etanol, se maceraron 5 g de hojas de orégano fresco picadas ó 1.16 g de orégano seco (equivalente a 5 g de orégano

fresco) en 50 mL de etanol, durante 10 días. Las condiciones y procedimiento para la obtención del extracto son las mismas que se describen en el punto 5.1.1.

5.1.4. Extracto de salvia fresca en etanol

La salvia fresca se adquirió en el mercado de Iztapalapa, D. F., México, proveniente del Estado de Morelos, después de aproximadamente 24 h de haber sido cosechada. Las hojas frescas de salvia se picaron finamente, se introdujeron 5 g en frasco ámbar y se agregaron 100 mL de etanol, macerándolas por 10 días a 20°C. El procedimiento para la obtención del extracto fue similar al descrito en el punto 5.1.1.

5.2. Análisis y fraccionamiento de los extractos

5.2.1. Determinación de la concentración de fenoles totales

Esta se llevó a cabo de acuerdo con la metodología reportada por Zheng y Wang (2001). A 200 μ L de extracto se le añadieron 1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (Hycel, México, D. F., México) y 0.8 mL de una solución de carbonato de sodio (Baker, Xalostoc, México) al 7.5% (p/v). El testigo consistió en una solución con 200 μ L de etanol, en lugar del extracto de hierbas. La mezcla se dejó reposar durante 1.5 h a 20°C; se midió la absorbencia de las muestras a 765 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Beckman, Fullerton, California). Para determinar la concentración de fenoles totales se elaboró una curva patrón con ácido gálico (Sigma, San Louis Missouri).

5.2.2. Cuantificación de los compuestos con actividad antioxidante

La cuantificación de ácido rosmarínico, carnosol y de ácido carnósico en los extractos de las hierbas estudiadas se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado por Wellwood y Cole (2004). Los extractos obtenidos en cloroformo y en etanol se filtraron a través de un filtro con diámetro de poro de 0.2 μ m (Millex, Irlanda), diluyéndose con etanol grado HPLC hasta una concentración conocida. Se inyectaron 500 μ L de cada extracto en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Waters (Milford, Massachussets), adaptado con una bomba cuaternaria Waters TM 626, inyector tipo Rheodyne 9125-080 y detector de arreglo de fotodiodos Waters acoplado al programa Milenium 2010. La

separación de los compuestos se realizó en una columna Symmetry de fase reversa (C₁₈) (Waters) de 15 cm de longitud, 0.39 cm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de poro. Las condiciones de análisis fueron: 20°C, flujo de 0.6 mL/min, longitud de onda de detección de 284 nm. La fase móvil se programó con un gradiente lineal desde 90% A (840 mL de agua desionizada con 8.5 mL de ácido acético y 150 mL de acetonitrilo), 10% B (metanol) a 100% B en 40 min. El sistema se estabilizó 3 min entre cada inyección. Los compuestos fueron identificados mediante estándares de referencia del ácido rosmarínico y carnosol (AG Scientific, San Diego, California) y de ácido carnósico (Sigma). La longitud de onda de máxima absorción para el ácido rosmarínico fue de 335 nm, mientras que para el ácido carnósico y el carnosol fue de 284 nm; sin embargo, el ácido rosmarínico también mostró absorbencia a 284 nm, por lo que esta longitud de onda fue utilizada para detectar a los tres compuestos. Mediante el método de calibración absoluta (Verde-Calvo y Orozco-Villafuerte, 2005) se calculó la concentración de cada uno de los compuestos con actividad antioxidante en el extracto. Debido a que el extracto de romero fresco obtenido en cloroformo se disolvió posteriormente en etanol, la inyección y el cálculo de la concentración se realizó de la misma manera que en el extracto obtenido con etanol (de acuerdo con el tiempo de retención, t_R , se relacionó el área de los picos de cada compuesto con el área del estándar correspondiente).

5.2.3. Efecto de la madurez fisiológica de las hierbas en la concentración de compuestos con actividad antioxidante

Una de las principales causas en la variabilidad del contenido de ácido carnósico en el romero fresco es su origen genético; también se asocia con el estado de madurez de las hojas, ya que en estas se encuentra predominantemente este compuesto. Las hojas jóvenes presentan mayor contenido de ácido carnósico que las maduras, debido a: a) los antioxidantes son esenciales en los primeros estados de crecimiento, donde las hojas jóvenes son más vulnerables; b) las hojas jóvenes tienen un metabolismo más activo, por lo tanto requieren altas concentraciones de compuestos necesarios para su crecimiento (Hidalgo y col., 1998). Por ello, se evaluó el efecto de la madurez fisiológica en la concentración de compuestos de actividad antioxidante, la cual se analizó de acuerdo a la metodología que se describe en el punto 5.2.2., la concentración de ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico se determinó en extractos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca obtenidos por maceración en etanol a 20°C, el tiempo de maceración fue de 10 días y durante este período se realizaron las determinaciones cada 24 h.

5.2.4. Efecto del tiempo de maceración en la concentración de compuestos con actividad antioxidante

Se analizó la concentración de los tres compuestos estudiados (ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico) cada 24 h durante los 10 días en que se llevó a cabo la maceración en etanol a 20°C de orégano seco, romero fresco y salvia fresca. Debido a que el extracto de orégano seco en etanol presentó mayor cantidad de ácido rosmarínico, y las concentraciones de carnosol y ácido carnósico no mostraron diferencia significativa con el extracto de orégano fresco, se decidió emplear las hojas de orégano seco, en lugar de orégano fresco en este experimento. Dichas concentraciones se analizaron de acuerdo a la metodología reportada en el punto 5.2.2.

5.2.5. Solubilidad de los extractos

La determinación se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Shriner y col. (2004) con algunas modificaciones. A 30 mg de cada uno de los extractos se le añadieron en forma separada 10 mL de disolvente: agua destilada, etanol, propilenglicol (Baker) y aceite comestible de maíz. La mezcla se agitó constantemente a 20°C durante aproximadamente 2 min, y se filtro a través de papel Whatman 2. El papel filtro con el residuo se introdujo en un horno de secado (Ríos Rocha, Modelo HS-41, México) a 55° C durante 24 h, para eliminar el disolvente.

Para observar el efecto del incremento de la temperatura sobre la disolución de los extractos se procedió a determinar la solubilidad de los mismos a 55°C, es decir la mezcla extracto-disolvente se calentó hasta alcanzar 55°C, posteriormente se dejó en reposo a 20°C para continuar con la filtración y eliminación del disolvente de acuerdo con el procedimiento enunciado en el párrafo anterior.

La solubilidad se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ de solubilidad} = 100 - \frac{\text{extracto seco (g)} \cdot 100}{\text{extracto fresco (g)}}$$

Ecuación 2

5.2.6. Aislamiento de los compuestos con actividad antioxidante de extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca

La separación de las fracciones conteniendo los ácidos rosmarínico y carnósico y del carnosol se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado por Areias y col. (2000), con algunas modificaciones. En el equipo de HPLC, descrito en el punto 5.2.2, se inyectaron por separado 500 μ L de cada uno de los extractos y de los estándares, todos ellos diluidos con etanol. Las condiciones de análisis fueron las siguientes: la fase móvil se programó con un gradiente lineal desde 90% A (agua/ácido fosfórico, 999:1) (Baker), 10% B (acetonitrilo) (Baker) a 100% B en 45 min. El sistema se estabilizó 5 min entre cada inyección. La separación de los compuestos se llevó a cabo en un separador marca Retriever 500, (ISCO, Nebraska) que se programó para recolectar fracciones cada 60 seg para el romero fresco, 50 seg para el orégano seco y 40 seg para la salvia fresca. Se procedió a corroborar la presencia de los ácidos rosmarínico, carnósico y del carnosol en las distintas fracciones, mediante la comparación de los espectros de absorción con el de los estándares, en un intervalo de longitud de onda de 200 a 400 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-650. Como se mencionó en el punto 5.2.2, el ácido rosmarínico presentó una longitud de onda de máxima absorción de 335 nm, y el ácido carnósico y el carnosol de 284 nm. Los tubos de ensayo conteniendo las fracciones de cada uno de los compuestos antioxidantes se taparon y almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su utilización (aproximadamente 18 horas).

5.2.7. Estabilidad de los compuestos con actividad antioxidante

La estabilidad de los compuestos antioxidantes se midió de acuerdo con el método reportado por Frankel y col. (1996), con algunas modificaciones. Se preparó una solución amortiguadora de fosfatos pH 5.5, 0.025 M (Sigma), la cual se mezcló en una proporción 2:1 (v/v) con etanol (pH 5.97), posteriormente esta mezcla se agregó en una proporción 1:2 (v/v) a cada una de las fracciones que contenían los compuestos con actividad antioxidante provenientes de cada uno de los extractos y de los estándares, así como a muestras de los extractos completos. La estabilidad se determinó midiendo cambios en la absorbencia de cada uno de los compuestos utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-650 a 335 nm para el "compuesto X" y el ácido rosmarínico y, 284 nm para el carnosol y el ácido carnósico. A partir de los estándares de los ácidos rosmarínico y carnósico y del carnosol se elaboró una curva patrón para cuantificar la concentración de estos compuestos.

Los compuestos separados se almacenaron por un total de 72 horas a 4 y a 20°C en tubos de ensayo transparentes tapados, los cambios en la concentración de estos compuestos se analizaron en la forma descrita cada 24 h, con dos repeticiones, y tomando 3 lecturas de cada muestra. Se analizó la estabilidad de los siguientes compuestos:

- a. Extractos de romero fresco, orégano seco y salvia fresca
- b. Ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico aislado del extracto de romero fresco, del extracto de orégano seco o del extracto de salvia fresca
- c. Ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico (compuestos puros como reactivos analíticos)

5.3. Obtención de la quinona del ácido carnósico

El objetivo para obtener esta quinona fue corroborar la longitud de onda de máxima absorción de estos compuestos reportada por Masuda y col. (2002) que es de 284 nm y, medir la actividad antioxidante en un sistema modelo. Se obtuvo de acuerdo con la metodología reportada por Masuda y col. (2002), con algunas modificaciones. Un miligramo de ácido carnósico (Sigma) se disolvió en 0.1 mL de acetonitrilo (Baker), se agregaron 0.02 mL de solución de cloruro férrico (0.135 g de cloruro férrico hexahidratado en 1 mL de agua) (Sigma); la mezcla se dejó reposar durante 3 min a 20°C, posteriormente se agregó 0.1 mL de agua. La quinona se extrajo repitiendo el proceso dos veces con 0.1 mL de cloruro de metileno (Baker); las capas de cloruro de metileno obtenidas en ambas repeticiones se juntaron y se les agregó 0.1 g de sulfato de sodio anhidro (Baker); la mezcla se filtró y evaporó en un rotavapor Buchi 011 a 25°C; el residuo se cristalizó con 0.4 mL de mezcla hexano:éter de petróleo (Baker) y se procedió a evaporar nuevamente a 25°C. El polvo anaranjado obtenido se disolvió con 1 mL de etanol (Baker); inmediatamente se procedió a su análisis o a su aplicación a la pasta cárnica. La solución se almacenó por un total de 4 h, tomando muestras para su análisis por HPLC a las 0, 1.5 y 4 h.

5.4. Preparación de la pasta cárnica

La composición de la pasta cárnica fue: 59% de carne fresca de cerdo (músculo *Longissimus dorsi*, no se registró el manejo *antemortem* de los animales), 14% de lardo, 23.4% de agua fría, 3% de cloruro de sodio, 0.499% de fosfato de potasio y 0.1% de emulsificante comercial (Accoline). Se picaron por separado la carne y el lardo congelado en

cubos de aproximadamente 1 cm, posteriormente se pesaron y homogenizaron por separado, en una licuadora doméstica (Osterizer Modelo 450-10, Bartlesville) durante 30 s aproximadamente a velocidad máxima; al homogenizar la carne, se agregó el agua en volúmenes pequeños, así como una parte del cloruro de sodio y de fosfato. A continuación se mezclaron ambas partes en la misma licuadora, agregando el resto de los ingredientes y se continuó con la homogenización hasta obtener una pasta homogénea. De acuerdo con estudios realizados (Hernández-Hernández, 2004) la pasta contenía 12% de proteína, 66% de humedad, 97 mg/100 g pasta de ácido palmitoleico, 533 mg/100 g pasta de ácido palmítico, 1595 mg/100 g pasta de ácido oleico y 299 mg/100 g pasta de ácido esteárico.

5.4.1. Incorporación de compuestos antioxidantes a la pasta cárnica

5.4.1.1. Extractos de hierbas

Se pesaron lotes de 150 g de pasta cárnica; a cada uno se agregaron empleando una espátula, en forma separada, los extractos de hierbas en una concentración de 0.02% p/p al peso de la grasa; se incluyó un control sin extractos.

Los extractos incorporados fueron: romero fresco en cloroformo, romero fresco cloroformo/etanol, orégano fresco en cloroformo, orégano seco en cloroformo, romero fresco en etanol, orégano fresco en etanol y orégano seco en etanol. Los extractos obtenidos en etanol se maceraron durante 10 días.

5.4.1.2. Extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca y sus compuestos con actividad antioxidante.

Con base en los resultados obtenidos en: a) estudios de la actividad antioxidante de los extractos de romero fresco, orégano fresco y seco con cloroformo, y romero fresco, orégano fresco y seco, obtenidos por maceración con etanol durante 10 días; b) efecto del tiempo de maceración en la concentración de compuestos con actividad antioxidante; c) tesis de maestría con relación al efecto antioxidante del extracto de salvia fresca obtenida en etanol; y considerando que uno de los objetivos es trabajar con disolventes GRAS, se determinó trabajar con los extractos siguientes: romero fresco con 3 h de maceración, orégano seco con 10 días de maceración y salvia fresca con 10 días de maceración, todos ellos obtenidos en etanol y, a partir de éstos se aislaron los compuestos con actividad antioxidante. Por lo tanto, se incorporaron a las pastas los extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y

salvia fresca, obtenidos como se indica en el punto 5.1., así como los compuestos con actividad antioxidante aislados de estos (ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico) y estándares de estos compuestos (reactivos analíticos). Se incluyó también un compuesto, que se supone antioxidante, y no pudo ser identificado, llamado "compuesto X".

Con el fin de calcular la concentración de los compuestos con actividad antioxidante que se debían incorporar a las pastas, previamente se determinó la cantidad de cada uno de ellos presente en los extractos de romero fresco, de orégano seco y de salvia fresca, mediante cromatografía por HPLC; posteriormente, se calculó el peso de extracto que se incorporaría a la pasta de acuerdo al punto 5.2.2.; finalmente, se obtuvo la relación de peso de extracto por agregar y la concentración de cada uno de los compuestos con actividad antioxidante. Para los lotes de 150 g de pasta, las concentraciones que se adicionaron fueron las siguientes:

a) Extracto de romero fresco: 4.29 mg de extracto, 0.041 mg de ácido rosmarínico, 0.072 mg de carnosol, 0.308 mg de ácido carnósico y 2 ml de compuesto X cuya absorbancia fue 0.08.

b) Extracto de orégano seco: 4.29 mg de extracto, 0.065 mg de ácido rosmarínico, 0.00015 mg de carnosol, 0.0005 mg de ácido carnósico y 2 ml de compuesto X cuya absorbancia fue 0.08.

c) Extracto de salvia fresca: 4.29 mg de extracto, 0.001 mg de ácido rosmarínico, 0.0001 mg de carnosol, 0.0002 mg de ácido carnósico y 2 ml de compuesto X cuya absorbancia fue 0.08.

El control consistió en pastas cárnicas sin compuestos antioxidantes.

Las pastas añadidas con los extractos etanólicos se almacenaron a 4 y 20°C por un total de 72 h; las pastas con los compuestos antioxidantes (orégano seco, romero fresco y salvia fresca) aislados de los extractos y como reactivos analíticos, se almacenaron a 4°C por 72 h.

5.4.1.3. Quinona del ácido carnósico

De igual forma que el punto anterior, en lotes de 150 g de pasta cárnica, se incorporaron, en forma separada, ácido carnósico y la quinona del ácido carnósico en una concentración de 0.02% p/p del peso de la grasa agregada a la pasta; el control consistió en una pasta sin compuestos antioxidantes.

5.4.2. Condiciones de almacenamiento y muestreo de las pastas cárnicas incorporadas con compuestos antioxidantes

Las pastas se almacenaron a 4 y a 20°C, por un tiempo total de 72 h, en dos tipos de envases:

- Para los estudios de la actividad antioxidante de los extractos de romero fresco, orégano fresco y seco con cloroformo, y romero fresco, orégano fresco y seco, obtenidos por maceración con etanol durante 10 días, las muestras almacenadas a 20°C se envasaron en frascos transparentes y las muestras almacenadas en refrigeración se envasaron en frascos ámbar
- Para los estudios de la actividad antioxidante de los extractos de romero fresco, obtenidos por maceración de 3 h en etanol, y de los extractos de orégano seco y salvia fresca obtenidos por maceración de 10 días en etanol, así como en los estudios de la capacidad antioxidante de las quinonas del ácido carnósico, las muestras se envasaron en frascos transparentes.

En virtud de que los estudios de la actividad antioxidante de los extractos de romero fresco, orégano fresco y seco con cloroformo, y romero fresco, orégano fresco y seco, obtenidos por maceración con etanol durante 10 días, fue de carácter preliminar se utilizaron frascos transparentes para acelerar la oxidación de los compuestos, y los frascos ámbar para disminuir la oxidación de los mismos. Mientras que en los estudios restantes únicamente se utilizaron frascos transparentes con el objetivo ya mencionado y además para eliminar la interferencia de este factor en las variables de respuesta estudiadas a las dos temperaturas de almacenamiento. En ambos casos, los envases permanecieron tapados durante todo el tiempo de almacenamiento, salvo cuando se realizó el muestreo (cada 24 h); los análisis se llevaron a cabo con dos repeticiones.

Para llevar a cabo el estudio del efecto de los extractos sobre las propiedades fisicoquímicas en pastas con alta y baja oxidación inicial de lípidos se procedió a almacenar la mitad de la pasta por 5 días a 4°C (alta oxidación inicial, TBARS= 0.0882 y 0.0458 para llevar a cabo los estudios a 4 y 20°C, respectivamente), mientras que la otra mitad fue inmediatamente tratada con los extractos (baja oxidación inicial, TBARS= 0.0123 y 0.0231 para llevar a cabo los estudios a 4 y 20°C, respectivamente). Para acelerar la oxidación de los lípidos y del pigmento de las pastas que se almacenarían a 20°C, previo al envasado se incorporó aire a las muestras utilizando un homogenizador (ESGE, Biospec Products,

Bartlesville, Suiza) a velocidad máxima durante un minuto.

5.5. Propiedades fisicoquímicas de la pasta cárnica

5.5.1. Color

Este se analizó por duplicado utilizando un colorímetro Hunter Lab modelo D25-PC2 (Chroma Meter CR-200, Tokio, Japón). El equipo se calibró utilizando como estándares los valores de $L=94.5$, $a=1.0$, $b=1.9$. Se tomó la lectura de la muestra, colocándola en el porta muestras, procurando no dejar espacios con aire en el recipiente, rotándola 90° entre cada lectura. Se midieron los valores L , a y b ; estos últimos se transformaron en las coordenadas polares de cromaticidad y tonalidad, mediante las ecuaciones:

$$\text{Tonalidad} = \tan^{-1} b/a$$

Ecuación 3

$$\text{Cromaticidad} = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

Ecuación 4

5.5.2. pH

Se determinó por duplicado, utilizando un potenciómetro digital (Conductronic, México, D. F.) previa homogenización de 10 g de pasta cárnica con 90 mL de agua destilada en una licuadora doméstica (Osterizer) a velocidad máxima durante 1 min.

5.5.3. Oxidación de lípidos (TBARS)

La cuantificación de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo por duplicado mediante la metodología reportada por Ockerman (1980) y por Rossell (1994). Se homogenizaron 10 g de pasta con 50 mL de agua destilada a 50°C , se transfirieron a un matraz de destilación, se añadieron 47.5 mL de agua destilada a 50°C , 2.5 mL de ácido clorhídrico (Baker) (1:2 v/v), dos gotas de antiespumante (1:10 p/v) y algunas perlas de ebullición. Se destilaron aproximadamente 50 mL de la solución. Se pasaron 5 mL del destilado a un tubo de vidrio con tapón, se le agregaron 5 mL de solución de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (Sigma) (0.2883 g/100 mL de ácido acético glacial al 90%), se taparon y agitaron. Un testigo fue preparado de manera similar, con 5 mL de agua destilada en lugar de la muestra. Los tubos con la muestra y el testigo se colocaron en

agua a ebullición durante 35 min, posteriormente se dejaron enfriar en baño de hielo durante 10 min. Finalmente, se midió la absorbencia (D) a 530 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650. La concentración de TBARS se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{TBARS (mg de malonaldehído / kg de pasta)} = 7 D$$

Ecuación 5

5.6. Propiedades funcionales de la pasta cárnica

5.6.1. Viscosidad aparente

Se llevó a cabo empleado un viscosímetro digital Brookfield DV-II+Pro (Brookfield, Middleboro, Massachusetts), utilizando el husillo número 4 a velocidades de deformación de 0.3, 0.5, 0.6, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 y 6 rpm. El análisis se llevó a cabo por triplicado.

5.6.2. Actividad proteolítica presente en las pastas cárnicas

5.6.2.1. Extracción de proteínas miofibrilares

Se llevó a cabo según la metodología utilizada por Ngapo y col. (1992) reportada por Signorini (2002), con algunas modificaciones. Se mezclaron 15 g de pasta cárnica con hielo y agua fría en proporciones 1:1:1 (p/p) en una licuadora doméstica (Osterizer) hasta homogenización completa; la mezcla se agitó constantemente durante 10 min en baño de hielo, posteriormente se filtró a través de un cedazo para eliminar el tejido conectivo. Se incorporó agua fría en una proporción 2:3 mezcla homogenizada:agua fría, agitándose la mezcla por 15 min más; la mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min a 4°C; el precipitado se resuspendió en una solución compuesta por NaCl 0.6 M + 25 mM búfer de fosfatos (Baker), pH 7. La concentración proteica en el extracto se determinó por el método de Biuret (García-Barrientos, 2007), los datos obtenidos se interpolaron en una curva patrón de albúmina de huevo.

5.6.2.2. Caracterización de las fracciones proteicas

La degradación de las proteínas miofibrilares en la pasta cárnica fue analizada mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acuerdo con el

método descrito por Laemmli (1970), reportado por Signorini (2002). Los extractos proteicos (15 mg/mL) se mezclaron en proporción 1:4 con una solución de búfer muestra que contenía 50% agua desionizada, 12.5% de búfer tris-HCl (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) pH 6.8, 10% glicerol (Baker), 20% de dodecilsulfato de sodio (SDS) (Bio-Rad), 2.5% de azul de bromofenol y 5% de 2,β-mercaptoetanol (Bio-Rad). Previo al análisis, las muestras se sometieron a ebullición durante 4 min. Se utilizaron geles de separación al 12% de acrilamida (Bio-Rad) y geles de concentración al 4% de acrilamida. Se empleó un sistema Mini-Protean II (Bio-Rad), aplicando 11 µL de muestra y marcadores de peso molecular (Bio-Rad) que contenía las proteínas: miosina, 200; β-galactosidasa, 116.25; fosforilasa b, 97.4; albúmina sérica bovina, 66.2; ovoalbúmina, 45; anhidrasa carbónica, 31; inhibidor de tripsina, 21.5; lisozima, 14.4; aprotinina, 6.5 kDa. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 190 V durante 55 min; los geles se fijaron y tiñeron con una solución de azul de Coomassie (LKB, Bromma, Suecia) al 1% en metanol:ácido acético:agua (40:10:50 v/v) (Baker) durante 20 min. El revelado de los geles se realizó utilizando una solución de metanol:ácido acético:agua durante 12 h. Los geles fueron digitalizados en un equipo Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) acoplado a un software Quantity One versión 4 (Bio-Rad), que permite analizar la densidad óptica relativa de cada banda respecto del total de bandas encontradas por muestra.

5.6.3. Tamaño de partícula

Se llevó a cabo utilizando un analizador de tamaño de partícula Mastersizer modelo MAF 5000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra), previa homogenización de 10 g de pasta cárnica con 20 mL de agua destilada con un homogenizador (ESGE) a velocidad máxima durante 15 seg. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

5.7. Diseño experimental y análisis estadístico

La Tabla 3 muestra las fuentes de variación y variables de respuesta analizados en cada etapa de la presente tesis:

Tabla 3. Fuentes de variación y variables de respuesta analizadas en los experimentos realizados

Objetivo	Fuentes de variación	Variables de Respuesta
Conocer la concentración y estabilidad de los compuestos con actividad antioxidante	extractos de hierbas	romero fresco orégano fresco salvia fresca
	compuestos aislados de romero fresco	ácido rosmarínico carnosol ácido carnósico
	compuestos aislados de orégano fresco	ácido rosmarínico carnosol ácido carnósico
	compuestos aislados de salvia fresca	ácido rosmarínico carnosol ácido carnósico
	reactivos analíticos	ácido rosmarínico carnosol ácido carnósico
	quinonas del ácido carnósico	
	Efecto del tiempo de maceración en etanol de romero y salvia frescos, y orégano seco	
	Efecto de la madurez fisiológica de las hierbas	
	romero fresco en cloroformo	
	romero fresco en etanol	color (L, tonalidad, cromaticidad)
Conocer el efecto de los extractos y compuestos aislados en pastas cármicas	romero fresco en cloroformo/etanol	
	orégano fresco en cloroformo	pH
	orégano fresco en etanol	TBARS
	orégano seco en cloroformo	tamaño de partícula
	orégano seco en etanol	
	salvia fresca en etanol	degradación proteica
	compuestos antioxidantes aislados de extractos y quinonas de ácido carnósico	

En todos los casos, se utilizaron diseños totalmente al azar. Los datos se sujetaron a análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Duncan $\alpha = 0.01$ (Montgomery, 1991), empleando un paquete estadístico SPSS versión 8.0 (Chicago, Illinois).

5.8. Estrategia experimental

En la Figura 10 se muestra la estrategia experimental llevada a cabo durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

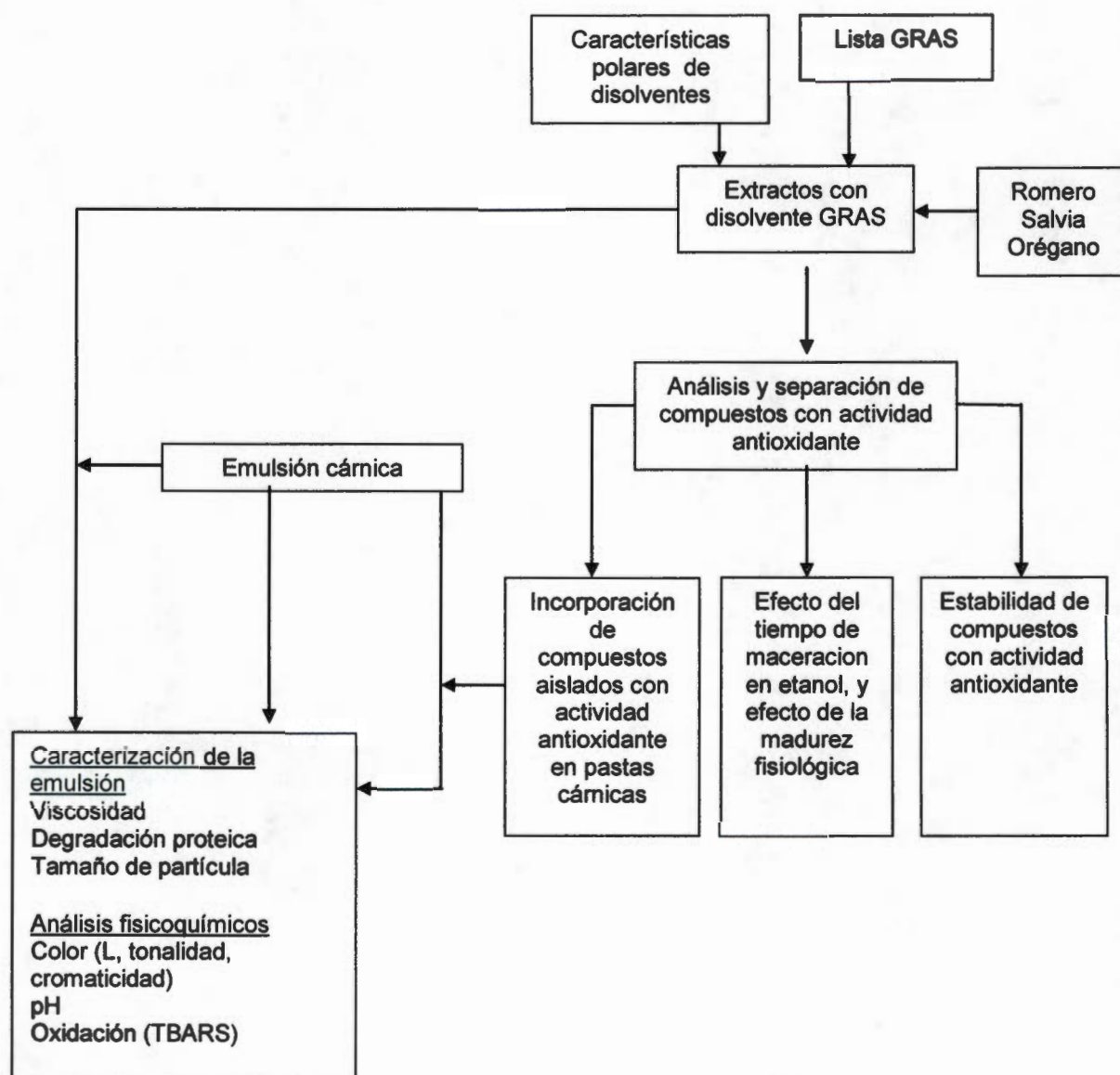


Figura 10. Estrategia experimental

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Concentración de fenoles totales en los extractos de hierbas

Los extractos obtenidos por maceración utilizando etanol como disolvente presentaron mayor concentración de fenoles totales que aquellos obtenidos a reflujo utilizando como disolvente cloroformo ($P < 0.001$) (Tabla 4); debido a la formación de enlaces entre el etanol y los grupos hidroxilo, así como con otros grupos polares presentes en la molécula; por lo que se solvataron y, en consecuencia, se pudieron extraer los compuestos por un disolvente polar. En el caso de la extracción con cloroformo, este disolvente únicamente pudo formar enlaces con las partes no polares de los fenoles (Morrison y Boyd, 1970a; Ander y Sonnessa, 1979b; Shriner y col., 2004).

Tabla 4. Concentración de fenoles totales (mg/mL extracto) por método de extracción

Método de extracción	Fenoles totales
Maceración con etanol	$0.1286^{a(1)(3)} \pm 0.054^{(2)}$
Reflujo con cloroformo	$0.0669^b \pm 0.057$

⁽¹⁾ Media de 27 mediciones; ⁽²⁾ Desviación estándar;

⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes

Considerando los dos métodos de extracción, maceración con etanol y reflujo con cloroformo, se obtuvo la mayor concentración de fenoles totales a partir de orégano seco que con romero fresco, salvia fresca y el orégano fresco (Tabla 5), aún cuando no se observó diferencia significativa ($P > 0.01$) entre las concentraciones obtenidas a partir de orégano seco, romero fresco y salvia fresca.

En cuanto a la discrepancia entre la concentración de fenoles totales entre el orégano en estado fresco y seco ($P < 0.001$), posiblemente se debió a que algunos compuestos fenólicos hidrofílicos presentes se unieron al agua de las hojas frescas y permanecieron en ellas cuando el disolvente se removió del residuo (Wellwood y Cole, 2004).

Tabla 5. Concentración de fenoles totales (mg/mL extracto) en extractos de hierbas

Hierba	Fenoles totales
Orégano fresco	$0.0630^{b(1)(3)} \pm 0.041^{(2)}$
Orégano seco	$0.1307^a \pm 0.095$
Romero fresco	$0.1257^a \pm 0.035$
Salvia fresca	$0.0791^{ab} \pm 0.016$

⁽¹⁾ Media de 18 mediciones; ⁽²⁾ Desviación estándar;

⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes

Se obtuvo mayor concentración de fenoles totales a partir de extractos de orégano en etanol que en cloroformo (Tabla 6); debido a que el ácido rosmarínico, el compuesto que se encuentra en mayor concentración en las hojas frescas y secas de esta hierba (comparado con carnosol y ácido carnósico, Tabla 7) es polar, por lo tanto sus grupos hidrofílicos pudieron formar enlaces con el agua de hidratación de las hojas y posteriormente fue extraído con el etanol (Morrison y Boyd, 1970a; Ander y Sonnessa, 1979a; Shriner y col., 2004; Wellwood y Cole, 2004).

Table 6. Concentración de fenoles totales (mg/mL extracto)

Disolvente	Hierba	Fenoles totales
Etanol	Orégano fresco	0.1032 ^{cd(1)(3)} ± 0.008 ⁽²⁾
	Orégano seco	0.2223 ^a ± 0.017
	Romero fresco	0.1095 ^{bc} ± 0.015
	Salvia fresca	0.0791 ^d ± 0.016
Cloroformo	Orégano fresco	0.0228 ^e ± 0.001
	Orégano seco	0.0393 ^e ± 0.003
	Romero fresco	0.1385 ^b ± 0.042
Cloroformo-etanol	Romero fresco	0.1351 ^{bc} ± 0.040

⁽¹⁾ Media de 9 mediciones; ⁽²⁾ Desviación estándar;⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes**Tabla 7.** Concentración de compuestos con actividad antioxidante (mg/mg extracto) de acuerdo con la hierba utilizada para su extracción

Hierba	Ácido rosmarínico	Carnosol	Ácido carnósico
Orégano fresco	0.0097 ^{c(1)(3)} ± 0.010 ⁽²⁾	0.0002 ^b ± 0.00008	0.0002 ^b ± 0.0001
Orégano seco	0.0231 ^a ± 0.023	0.0002 ^b ± 0.00004	0.0004 ^b ± 0.0002
Romero fresco	0.0141 ^b ± 0.018	0.0882 ^a ± 0.030	0.2634 ^a ± 0.196
Salvia fresca	0.0019 ^d ± 0.001	0.0002 ^b ± 0.0001	0.0003 ^b ± 0.0002

⁽¹⁾ Media de 8 mediciones; ⁽²⁾ Desviación estándar;⁽³⁾ Superíndices iguales en la columna no son significativamente diferentes

La concentración de fenoles totales no fue estadísticamente diferente entre los extractos de romero fresco obtenidos con cloroformo y con etanol ($P>0.01$) (Tabla 6); sin embargo, la concentración fue mayor en extractos en cloroformo que en etanol debido a que, al ser el ácido carnósico el compuesto mayoritario en esta hierba (Tabla 7) y, debido a su baja polaridad, se extrajo con más eficiencia con cloroformo, que es un disolvente no polar (Morrison y Boyd, 1970a; Ander y Sonnessa, 1979a; Shriner y col., 2004).

De los extractos obtenidos con etanol, la menor concentración de fenoles se observó en el obtenido a partir de salvia (Tabla 6) en comparación con la concentración de fenoles totales obtenidos a partir de orégano seco, romero fresco y orégano fresco. Asimismo se pudo observar que el extracto de orégano seco obtenido con etanol presentó significativamente ($P<0.001$) mayor concentración de fenoles totales que en los demás extractos. La alta concentración de fenoles estuvo de acuerdo con resultados reportados por Zheng y Wang (2001) en un extracto obtenido de orégano europeo, con una solución amortiguadora a pH 7. Por lo tanto, la cantidad de fenoles totales obtenida dependió de la hierba de la cual se hizo la extracción, de la hidratación de la hierba (seca o húmeda) y del disolvente utilizado para su extracción.

6.2. Concentración de compuestos con actividad antioxidante

Los compuestos fenólicos típicos que poseen actividad antioxidante son principalmente los ácidos fenólicos y los flavonoides. Los resultados reportados en la literatura han confirmado que los extractos de diversas especies del género *Origanum* tienen un elevado contenido de ácido rosmarínico y otros compuestos derivados del ácido hidroxicinámico, los cuales poseen una fuerte actividad antioxidante. Por otra parte los extractos de romero fresco obtenidos con acetona y etanol contienen varios compuestos fenólicos entre los que destacan el ácido rosmarínico, el rosmanol, el ácido carnósico (Zheng y Wang, 2001) y el carnosol (Inatani y col., 1983; Wellwood y Cole, 2004) los cuales confieren a los extractos una actividad antioxidante muy potente.

Debido a que el orden de elución de los solutos en HPLC depende de la polaridad, el soluto que primero eluye es el de mayor polaridad. Bajo las condiciones de análisis descritas en el punto 5.2.2 (pág. 46), se obtuvieron los siguientes tiempos de retención: ácido rosmarínico: 16.2 min; carnosol: 26.6 min; ácido carnósico: 29.7 min. Los cromatogramas de

estos compuestos se muestran en las Figuras 11, 12 y 13. El carnosol es una lactona derivada de la oxidación del ácido carnósico por lo que su polaridad es inferior a éste. De acuerdo con esta información, el tiempo de retención (t_r) del carnosol debería ser mayor al del ácido carnósico; sin embargo, el grupo carboxilo del ácido pudo interactuar con el hidroxilo del grupo fenol que se encuentra en su proximidad vía puente de hidrógeno (unión intramolecular) (Huang y col., 1996), lo que impidió que ambos grupos quedaran libres para formar enlaces con moléculas polares (Morrison y Boyd, 1970b), aumentando la hidrofobicidad de la molécula y, de esta manera, quedó adsorbida a la fase estacionaria (C_{18}) durante más tiempo que el carnosol.

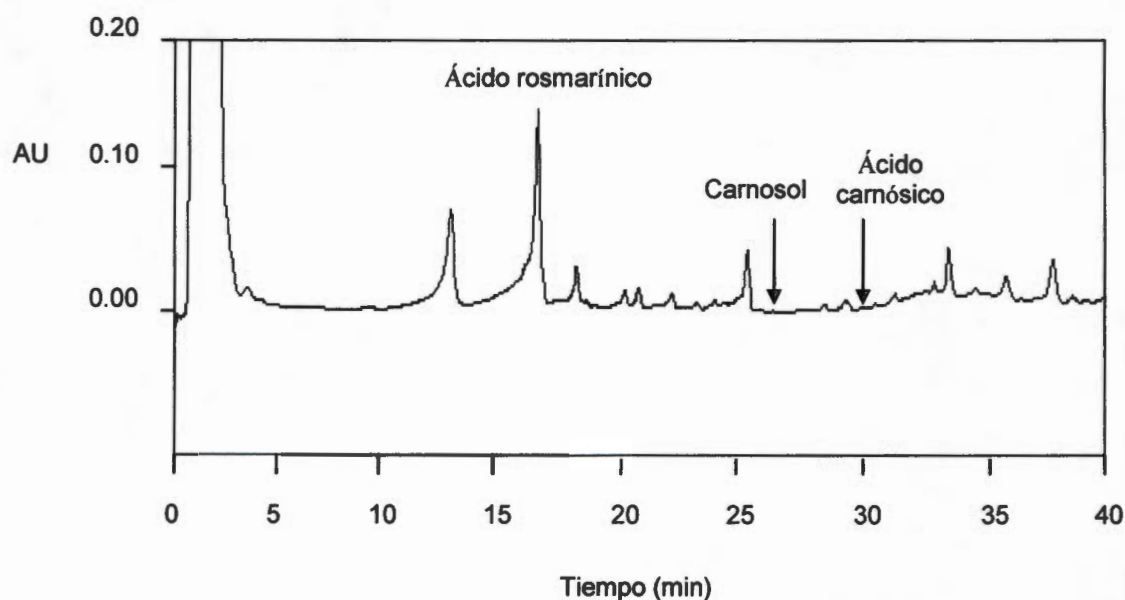


Figura 11. Cromatograma del extracto de orégano seco con 10 días de maceración en etanol a 20°C. Obtenido por HPLC utilizando una columna C_{18} a 284 nm

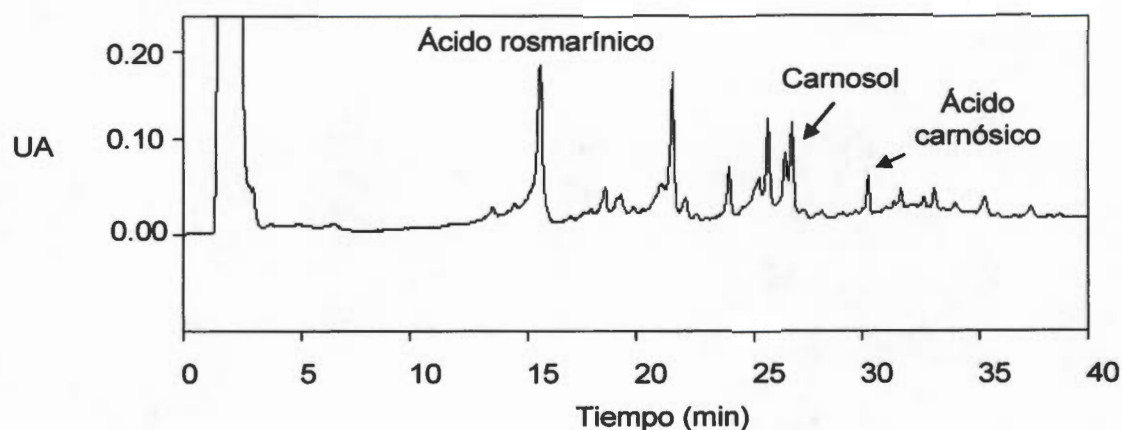


Figura 12. Cromatograma del extracto de romero fresco con 10 días de maceración en etanol a 20°C. Obtenido por HPLC utilizando una columna C₁₈ a 284 nm

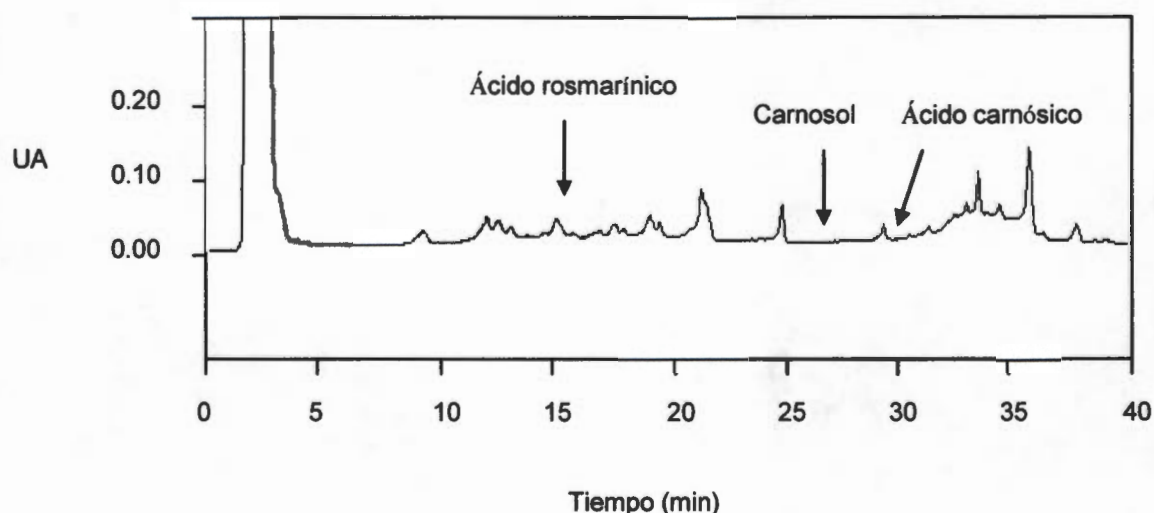


Figura 13. Cromatograma del extracto de salvia fresca con 10 días de maceración en etanol a 20°C. Obtenido por HPLC utilizando una columna C₁₈ a 284 nm

La extracción de ácido rosmarínico fue significativamente más eficiente ($P < 0.001$) cuando se utilizó como disolvente etanol que con cloroformo (Tabla 8), debido a la alta solubilidad del ácido rosmarínico en disolventes polares (Wellwood y Cole, 2004); mientras no se observó diferencia significativa ($P > 0.01$) entre la extracción del carnosol y del ácido carnósico por maceración o por reflujo. Los grupos metilo e isopropilo en el ácido carnósico y el carnosol disminuyeron la polaridad, sin embargo los grupos hidroxilo pudieron interactuar

con el disolvente polar, dando como resultado neto una solubilidad similar entre el disolvente polar (etanol) y el no polar (cloroformo); sin embargo, la concentración de carnosol mostró menos variación entre ambos métodos de extracción.

Tabla 8. Concentración de compuestos con actividad antioxidante (mg/mg extracto) de acuerdo con el método de extracción

Método de extracción	Ácido rosmarínico	Carnosol	Ácido carnósico
Maceración con etanol	0.0263 ^{a(1)(3)} ± 0.018 ⁽²⁾	0.0448 ^a ± 0.052	0.0881 ^a ± 0.154
Reflujo con cloroformo	0.0008 ^b ± 0.0006	0.0288 ^a ± 0.042	0.1465 ^a ± 0.216

⁽¹⁾ Media de 12 mediciones; ⁽²⁾ Desviación estándar;

⁽³⁾ Superíndices iguales en la columna no son significativamente diferentes

Se observó significativamente mayor cantidad de ácido rosmarínico ($P < 0.001$) a partir de las hojas de orégano seco, confundiendo el efecto de método de extracción, mientras que la salvia fresca fue la hierba con menor cantidad extraída (Tabla 7, pág. 61); el romero fresco presentó también el máximo contenido de carnosol y de ácido carnósico ($P < 0.001$); en tanto el orégano, tanto fresco como seco, así como la salvia fresca presentaron concentraciones sin diferencia significativa ($P > 0.01$) de ambos compuestos. La Tabla 9 muestra que la concentración de ácido rosmarínico extraído tanto con etanol como con cloroformo fue menor cuando los extractos se obtuvieron a partir de hojas frescas de orégano, comparada con la concentración alcanzada a partir de hojas secas ($P < 0.001$); esto se debió a que el ácido rosmarínico posee en su molécula dos estructuras catecol conjugadas con un grupo carboxilo lo que incrementa su carácter polar, por lo que puede formar enlaces con el agua de las hojas frescas y permaneció unido a ella cuando el disolvente se removió del residuo (Del Baño y col., 2003; Wellwood y Cole, 2004).

Tabla 9. Concentración de compuestos con actividad antioxidante (mg/mg extracto)

Disolvente	Hierba	Ácido rosmarínico	Carnosol	Ácido carnósico
Etanol	Orégano fresco	0.0195 ^{Aa(1)(3)} ± 0.002 ⁽²⁾	0.0001 ^{Bd} ± 0.00005	0.0003 ^{Bc} ± 0.00005
	Orégano seco	0.0451 ^{Aa} ± 0.001	0.0002 ^{Bd} ± 0.00005	0.0002 ^{Bc} ± 0.00005
	Romero fresco	0.0395 ^{Bb} ± 0.003	0.0548 ^{Ac} ± 0.004	0.0048 ^{Cc} ± 0.001
	Salvia fresca	0.0024 ^{Ad} ± 0.0005	0.0001 ^{Bd} ± 0.00009	0.0004 ^{Bc} ± 0.0002
Cloroformo	Orégano fresco	0.00005 ^{Bd} ± 0.00002	0.0002 ^{Ad} ± 0.00009	0.0001 ^{Bc} ± 0.00005
	Orégano seco	0.0011 ^{Ad} ± 0.00005	0.0002 ^{Cd} ± 4.52E-21	0.0007 ^{Bc} ± 0.00005
	Romero fresco	0.0013 ^{Cd} ± 0.0001	0.0860 ^{Bb} ± 0.012	0.4388 ^{Aa} ± 0.038
Cloroformo-etanol	Romero fresco	0.0013 ^{Cd} ± 0.0001	0.1239 ^{Ba} ± 0.005	0.3468 ^{Ab} ± 0.026

(¹) Media de 4 mediciones; (²) Desviación estándar; (³) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican la diferencia entre compuestos con actividad antioxidante; las minúsculas indican diferencias dentro de cada compuesto entre disolvente empleado)

Al disolver el extracto de romero fresco obtenido con cloroformo/etanol, todo el ácido rosmarínico presente se solubilizó; sin embargo, se presentó un incremento en la concentración de carnosol y una disminución en la cantidad de ácido carnósico. Este comportamiento se debió al hecho de que el ácido carnósico es un compuesto inestable cuando se encuentra en disolventes como el metanol y etanol, oxidándose a carnosol (Cuvelier y col., 1994; Okamura y col., 1994; Masuda y col., 2001 y 2002; Del Baño y col., 2003).

Como se indicó anteriormente, el compuesto mayoritario en las hojas de orégano, tanto fresco como seco, fue ácido rosmarínico; estos datos concuerdan con los resultados reportados por Zheng y Wang (2001) y Dorman y col. (2004) para extractos acuosos provenientes del género *Origanum*, así como con lo reportado por Kulišić y col. (2006) para *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*. Por otra parte, la mayor concentración en el extracto en etanol de romero fresco fue de carnosol, y de ácido carnósico en el caso del extracto obtenido con cloroformo. El ácido rosmarínico fue el compuesto mayoritario en salvia fresca. De todas las combinaciones hierba-disolvente que se estudiaron, el extracto de romero fresco en cloroformo y en cloroformo/etanol presentaron las mayores concentraciones de los tres compuestos cuantificados ($P < 0.001$) (ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico), siguiendo en orden descendente los extractos de romero fresco con etanol, orégano seco

con etanol, orégano fresco con etanol, salvia fresca con etanol, orégano seco con cloroformo y orégano fresco con cloroformo (Tabla 9).

Considerando la información anterior, se puede ver que la concentración de ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico presente en los extractos dependió de la hierba de la cual se extrajeron, del disolvente empleado para su extracción y por lo tanto, de la combinación hierba-disolvente utilizado.

6.3. Efecto de la madurez fisiológica de las hierbas en la concentración de compuestos con actividad antioxidante

No se observó diferencia significativa ($P > 0.01$) en el contenido de ácido rosmarínico entre las plantas no maduras y maduras en los extractos provenientes de las hojas de orégano seco, romero fresco y salvia fresca (Tabla 10). Sin embargo, la concentración de este compuesto en plantas jóvenes fue mayor. Este resultado concuerda con información reportada por Petersen y Simmonds (2003) quienes encontraron que el ácido rosmarínico puede actuar en las plantas como un compuesto de defensa contra patógenos y herbívoros, presentándose una mayor concentración en plantas infestadas, siendo las plantas jóvenes más susceptibles a este ataque que las adultas.

Tabla 10. Concentración de compuestos con actividad antioxidante (mg/mg) a dos etapas de maduración de la planta

Fuente de variación	Nivel	Valor medio		
		Ácido rosmarínico	Carnosol	Ácido carnósico
Extracto de orégano seco	Planta no madura	$0.0419^{a(2)} \pm 0.009^{(1)}$	$0.0001^b \pm 0.00008$	$0.0002^b \pm 0.0001$
	Planta madura	$0.0385^a \pm 0.015$	$0.0003^a \pm 0.00008$	$0.0003^a \pm 0.00005$
Extracto de romero fresco	Planta no madura	$0.0296^a \pm 0.004$	$0.1011^a \pm 0.080$	$0.0179^a \pm 0.028$
	Planta madura	$0.0256^a \pm 0.004$	$0.0721^a \pm 0.041$	$0.0109^a \pm 0.023$
Extracto de salvia fresca	Planta no madura	$0.0027^a \pm 0.0007$	$0.0003^a \pm 0.0001$	$0.0001^a \pm 0.0003$
	Planta madura	$0.0019^a \pm 0.0009$	$0.0001^a \pm 0.0001$	$0.0007^a \pm 0.0006$

⁽¹⁾ Desviación estándar, ⁽²⁾ Superíndices iguales en la columna no son significativamente diferentes

Solamente en los extractos de orégano seco se presentó una diferencia significativa en la concentración de carnosol entre plantas con distinta madurez fisiológica ($P < 0.001$), siendo las plantas no maduras las que tuvieron menor concentración. No se observó diferencia significativa en la concentración de carnosol entre los extractos de romero fresco y de salvia fresca ($P > 0.01$). Cabe mencionar que las concentraciones de compuestos que pueden originarse como productos de oxidación, como en el caso de carnosol formado a partir del ácido carnósico, pueden incrementar si la planta se encuentra bajo condiciones de estrés inducido por sequía o por alta luminosidad (Munné-Bosch y Alegre, 2001). Los extractos de hojas de orégano seco y de salvia fresca provenientes de plantas no maduras tuvieron menor concentración de ácido carnósico, mientras que el extracto de romero fresco obtenido de plantas no maduras presentó una mayor concentración de ácido carnósico (Tabla 10); en el caso del romero fresco y salvia fresca esta diferencia no fue significativa ($P > 0.01$), en forma opuesta, si se observó una diferencia significativa en orégano seco ($P < 0.001$). Esta variación en los extractos de romero fresco coincide con los resultados reportados por Hidalgo y col. (1998), en virtud de que las hojas jóvenes, al ser más vulnerables, requieren mayor concentración de antioxidantes; en los extractos de orégano seco y de salvia fresca, posiblemente las plantas no maduras estuvieron bajo estrés antes de ser cosechadas (Munné-Bosch y Alegre, 2001). Las plantas no maduras carecían de flores y presentaban un número considerable de hojas tiernas; contrariamente, las plantas maduras tenían abundancia de flores y muy pocas hojas tiernas.

6.4. Efecto del tiempo de maceración en la concentración de compuestos con actividad antioxidante

6.4.1. Extracto de orégano seco

La concentración de ácido rosmarínico, de carnosol y de ácido carnósico en el extracto de orégano seco no fue significativamente diferente durante los 10 días de maceración (Tabla 11) ($P > 0.01$). A partir del segundo día y hasta el final del experimento, la extracción de ácido rosmarínico fue mayor a la de carnosol y ácido carnósico ($P < 0.001$). En este mismo período, la concentración de carnosol fue inferior a la de ácido carnósico, debido a que el pH promedio del extracto (5.66 ± 0.08) fue un factor estabilizante del ácido (Friedman y Jürgens, 2000) evitando su oxidación a carnosol y otros compuestos (Cuvelier y col., 1994; Okamura y col., 1994; Munné-Bosch y Alegre, 2001; Masuda y col., 2002). A partir del día 7, la

concentración de los tres compuestos cuantificados permaneció estable. El día cero corresponde a un tiempo de maceración de 3 horas.

Tabla 11. Concentración de compuestos con actividad antioxidante (mg/mg) en el extracto de orégano seco, durante 10 días de maceración en etanol

Tiempo (días)	Ácido rosmarínico	Carnosol	Ácido camósico
0	0.0148 ^{Aa(1)(3)} ± 0.009 ⁽²⁾	0.0003 ^{Aa} ± 0.0001	0.0004 ^{Aa} ± 0
1	0.0419 ^{Aa} ± 0.018	0.0003 ^{Ba} ± 0.00005	0.0003 ^{Ba} ± 0.00005
2	0.0407 ^{Aa} ± 0.016	0.0002 ^{Ba} ± 0.00005	0.0003 ^{Ba} ± 0.00005
3	0.0409 ^{Aa} ± 0.003	0.0001 ^{Ba} ± 0.0001	0.0002 ^{Ba} ± 0.00005
4	0.0485 ^{Aa} ± 0.008	0.0002 ^{Ba} ± 0.0001	0.0003 ^{Ba} ± 0.0001
5	0.0390 ^{Aa} ± 0.002	0.0001 ^{Ba} ± 0.00005	0.0002 ^{Ba} ± 0.0002
6	0.0401 ^{Aa} ± 0.001	0.0001 ^{Ba} ± 0.0001	0.0002 ^{Ba} ± 0.0001
7	0.0428 ^{Aa} ± 0.007	0.0002 ^{Ba} ± 0.0001	0.0004 ^{Ba} ± 0
8	0.0429 ^{Aa} ± 0.008	0.0002 ^{Ba} ± 0.0001	0.0003 ^{Ba} ± 0.00005
9	0.0455 ^{Aa} ± 0.005	0.0001 ^{Ba} ± 0.0001	0.0004 ^{Ba} ± 0.0001
10	0.0438 ^{Aa} ± 0.004	0.0002 ^{Ba} ± 0.0001	0.0004 ^{Ba} ± 0.0001

⁽¹⁾ Media de 3 mediciones; ⁽²⁾ Desviación estándar; ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican la diferencia entre compuestos con actividad antioxidante; las minúsculas indican diferencias entre cada día de maceración)

6.4.2. Extracto de romero fresco

La alta actividad antioxidante del extracto de romero fresco se relaciona con la concentración de ácido camósico (Wellwood y Cole, 2004); sin embargo la cantidad de este ácido en el extracto de romero fresco en etanol obtenido durante 10 días de maceración (0.0048 mg/mg) (Tabla 9, pág. 66) fue estadísticamente menor a la obtenida con cloroformo (0.4388 mg/mg) ($P < 0.001$). Durante el período de 10 días de maceración, el contenido de ácido rosmarínico no varió significativamente (Tabla 12) ($P > 0.01$). El pH medio del extracto

(6.28 ± 0.04) fue superior al del orégano seco; posiblemente no le brindó estabilidad, por lo que a partir de las 3 h de maceración (en la tabla se indica como el día cero de maceración), el tiempo en el que se obtuvo la máxima concentración de ácido carnósico, se inició su rápida oxidación a carnosol y, posiblemente, otros compuestos, como rosmanol, epirosmanol (Okamura y col., 1994), rosmadial, carnosato metílico (Cuvelier y col., 1994) e isorrosmanol, 11,12-di-o-metilisorrosmanol (Munné-Bosch y Alegre, 2001), lo cual quedó manifestado en la disminución en el contenido de ácido carnósico ($P < 0.001$) con el consecuente incremento en la concentración de carnosol. Salvo las 3 primeras horas, cuando no hubo diferencia significativa entre la concentración de carnosol y de ácido carnósico ($P > 0.01$), en el resto del período de maceración el contenido del carnosol fue mayor al de los ácidos carnósico y rosmarínico. Otros factores que posiblemente influyeron en la oxidación del ácido carnósico fueron el disolvente utilizado (etanol) debido a que la degradación se acelera en disolventes polares (Del Baño y col., 2003); la temperatura de eliminación del disolvente (55°C) ya que conforme ésta aumenta se incrementa la velocidad de oxidación (Okamura y col., 1994); la presencia de oxígeno en el envase durante la maceración y eliminación del disolvente (Madsen y Bertelsen, 1995; Masuda y col., 2001).

Tabla 12. Concentración de compuestos con actividad antioxidante (mg/mg) en el extracto de romero fresco, durante 10 días de maceración en etanol

Tiempo (días)	Ácido rosmarínico	Carnosol	Ácido carnósico
0	0.0271 ^{Ba(1)(3)} ± 0.0006 ⁽²⁾	0.0866 ^{Abcd} ± 0.027	0.0911 ^{Aa} ± 0.009
1	0.0268 ^{Ba} ± 0.0008	0.1293 ^{Aab} ± 0.009	0.0339 ^{Bb} ± 0.012
2	0.0290 ^{Ba} ± 0.002	0.1949 ^{Aa} ± 0.051	0.0184 ^{Bc} ± 0.009
3	0.0250 ^{Ba} ± 0.002	0.1263 ^{Aab} ± 0.015	0.0067 ^{Bcd} ± 0.004
4	0.0296 ^{Ba} ± 0.007	0.1191 ^{Aabc} ± 0.043	0.0042 ^{Bd} ± 0.002
5	0.0338 ^{Ba} ± 0.008	0.1116 ^{Abc} ± 0.067	0.0024 ^{Bd} ± 0.001
6	0.0336 ^{Ba} ± 0.006	0.0834 ^{Abcd} ± 0.020	0.0037 ^{Bd} ± 0.0025
7	0.0292 ^{Ba} ± 0.0006	0.0562 ^{Abcd} ± 0.0003	0.0029 ^{Cd} ± 0.001
8	0.0269 ^{Aa} ± 0.007	0.0403 ^{Ac} ± 0.007	0.0032 ^{Bd} ± 0.0007
9	0.0236 ^{Aa} ± 0.004	0.0296 ^{Ad} ± 0.002	0.0021 ^{Bd} ± 0.0001
10	0.0263 ^{Aa} ± 0.002	0.0286 ^{Ad} ± 0.003	0.0023 ^{Bd} ± 0.001

⁽¹⁾ Media de 3 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican la diferencia entre compuestos con actividad antioxidante; las minúsculas indican diferencias entre cada día de maceración)

6.4.3. Extracto de salvia fresca

De forma similar a los extractos de orégano seco y de romero fresco, la concentración de ácido rosmarínico no presentó cambios durante los 10 días de maceración en el extracto de salvia fresca (Tabla 13) ($P > 0.01$).

Tabla 13. Concentración de compuestos con actividad antioxidante (mg/mg) en el extracto de salvia fresca, durante 10 días de maceración en etanol

Tiempo (días)	Ácido rosmarínico	Carnosol	Ácido carnósico
0	$0.0013^{Aa(1)(3)} \pm 0.001^{(2)}$	$0.0002^{Aa} \pm 0.0001$	0^{Ac}
1	$0.0027^{Aa} \pm 0.0008$	$0.0001^{Ba} \pm 0.0001$	$0.00003^{Bc} \pm 0.00005$
2	$0.0027^{Aa} \pm 0.0003$	$0.0001^{Ba} \pm 0.00005$	$0.0001^{Bbc} \pm 0.0001$
3	$0.0028^{Aa} \pm 0.0003$	$0.0003^{Ba} \pm 0.00005$	$0.0007^{Babc} \pm 0.0006$
4	$0.0023^{Aa} \pm 0.0008$	$0.0002^{Ba} \pm 0.0001$	$0.0001^{Bbc} \pm 0.0001$
5	$0.0027^{Aa} \pm 0.0002$	$0.0004^{Ba} \pm 0.0001$	$0.0005^{Babc} \pm 0.0004$
6	$0.0026^{Aa} \pm 0.0005$	$0.0001^{Ba} \pm 0.0001$	$0.0004^{Bbc} \pm 0.0003$
7	$0.0027^{Aa} \pm 0.0009$	$0.0002^{Ba} \pm 0.0001$	$0.0003^{Bbc} \pm 0.0002$
8	$0.0016^{Aa} \pm 0.001$	$0.0001^{Aa} \pm 0.00005$	$0.0005^{Aabc} \pm 0.0002$
9	$0.0011^{Aa} \pm 0.0002$	$0.0002^{Aa} \pm 0$	$0.0013^{Aab} \pm 0.001$
10	$0.0013^{Aa} \pm 0.0007$	$0.0002^{Aa} \pm 0.001$	$0.0016^{Aa} \pm 0.0005$

⁽¹⁾ Media de 3 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican la diferencia entre compuestos con actividad antioxidante; las minúsculas indican diferencias entre cada día de maceración)

Comparando la maceración de plantas maduras y no maduras, se observó en el día 8 en la planta madura, y 9 en la planta no madura, un descenso pronunciado en la cantidad de ácido rosmarínico (Figura 14), posiblemente debido a la presencia de diversas enzimas que pudieron hidrolizar a este compuesto, hidroxilarlo o remover hidrógenos para formar quinonas, las cuales, debido a su reactividad, pudieron formar enlaces con especies nucleofílicas y polimerizarse (Guadarrama y Rivas, 1995; Casado-Vela, 2008).

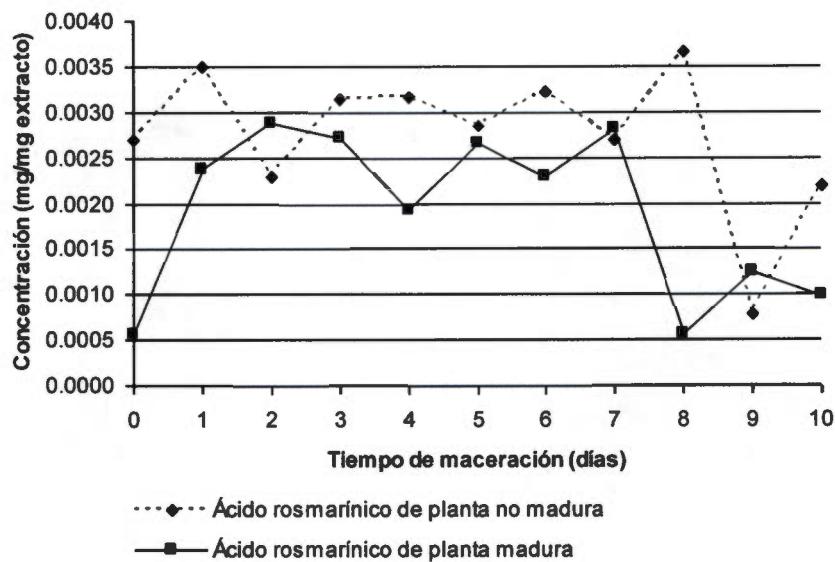


Figura 14. Cambios en la concentración de ácido rosmarínico en el extracto de salvia de bolita fresca (*Buddleia perfoliata* Kunth) obtenido de plantas maduras y no maduras, por maceración en etanol a 20°C

Al inicio del tiempo de estudio, no se detectó ácido carnósico; sin embargo, conforme transcurrió el tiempo de análisis, el contenido se incrementó hasta el día 10, en donde se presentó la máxima concentración (0.0016 mg/mg extracto). Al igual que con el extracto de orégano seco, a partir del día 1 de maceración la cantidad de ácido carnósico fue superior a la de carnosol, este hecho posiblemente este relacionado con el pH ácido del extracto (5.37 ± 0.09). Al final del experimento, de los tres compuestos cuantificados el ácido rosmarínico fue el que se encontró en mayor concentración (0.0021, 0.0002 y 0.0005 mg/mg extracto para el ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico, respectivamente) ($P < 0.001$). En concordancia con información reportada por Wellwood y Cole (2004) en este estudio el ácido rosmarínico fue más estable que el ácido carnósico.

Bajo las condiciones en que se llevó a cabo este experimento, y de acuerdo con los resultados obtenidos, el tiempo de maceración al cual se debían de obtener los extractos para aplicarlos a la pasta cárnica y tener alta actividad antioxidante fue del día 7 hasta el día 10 para el orégano seco; el día 10 para la salvia fresca y 3 h para el romero fresco.

6.5. Solubilidad

Los compuestos polares son más solubles en los disolventes polares que en los no polares, debido al efecto predominante de la atracción electrostática entre los dipolos de un compuesto polar y el disolvente polar. Cuando las sales iónicas se disuelven en agua se lleva a cabo la ruptura de la estructura iónica y la estabilización de los iones en el medio acuoso mediante una esfera de moléculas de agua que los rodea (Ander y Sonnessa, 1979a).

La solubilidad de los extractos etanólicos de romero fresco, salvia fresca y orégano seco se midió en disolventes GRAS (agua, propilenglicol y aceite de maíz) a 20°C y a 55°C (temperatura a la que se llevó a cabo la eliminación del disolvente en el rotavapor).

A 20°C, el extracto de orégano seco tuvo una solubilidad significativamente más alta en agua, comparada con los extractos de romero fresco y de salvia fresca ($P < 0.001$) (Tabla 14).

Tabla 14. Solubilidad (%) de los extractos en diferentes disolventes GRAS a 20 y 55°C

Fuente de variación	Nivel	Valor medio		
		Agua	Propilenglicol	Aceite de maíz
20°C	Orégano seco	18.39 ^{a(2)} ± 0.47 ⁽¹⁾	68.31 ^b ± 2.19	40.70 ^b ± 1.24
	Romero fresco	6.62 ^c ± 1.17	76.38 ^a ± 0.89	54.25 ^a ± 3.41
	Salvia fresca	14.84 ^b ± 0.71	78.34 ^a ± 5.57	33.23 ^c ± 2.28
55°C	Orégano seco	62.21 ^a ± 2.14	86.21 ^b ± 1.96	85.33 ^a ± 1.27
	Romero fresco	17.87 ^c ± 3.99	93.78 ^a ± 1.84	90.88 ^a ± 1.83
	Salvia fresca	25.06 ^b ± 2.38	94.91 ^a ± 3.70	81.46 ^b ± 3.54

⁽¹⁾ Desviación estándar; ⁽²⁾ Superíndices iguales en la columna no son significativamente diferentes para cada fuente de variación

Estos resultados se deben a que el ácido rosmarínico, mayoritario en el extracto de orégano seco (Tabla 9, pág. 66), es un compuesto altamente polar. Empleando aceite de maíz como disolvente, la mayor solubilidad se obtuvo en el extracto de romero fresco ($P < 0.001$); en este caso, el compuesto mayoritario fue el ácido carnósico (Tabla 12, pág. 71),

de baja polaridad. En el caso del propilenglicol, el extracto de salvia fresca presentó la mayor solubilidad, aunque no mostró una diferencia significativa al de extracto de romero fresco ($P>0.01$), indicando una concentración más alta de compuestos de mediana polaridad, en comparación con el extracto de orégano seco.

Por otro lado, considerando a los tres extractos, la mayor solubilidad se observó en propilenglicol ($P<0.001$). Este comportamiento se debió a que el etanol, disolvente empleado en la obtención de los extractos es de polaridad media; además, la estructura del propilenglicol ($\text{CH}_3\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$) presenta una parte polar (2 grupos OH) y un esqueleto no polar ($\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$), estas partes de la molécula pueden presentar propiedades individuales de solubilidad, por lo que pueden solvatar tanto a compuestos polares como no polares (Morrison y Boyd, 1970a; Ander y Sonnessa, 1979b; Shriner y col., 2004). Es posible que predominen los compuestos de baja polaridad en los tres extractos, esta conclusión se obtuvo debido a que la solubilidad en el aceite de maíz fue superior a la que presentaron los extractos en el agua.

Con el objetivo de suministrar energía a la reacción para vencer las fuerzas interiónicas o intermoleculares (Ander y Sonnessa, 1979b), los extractos se sometieron a calentamiento a 55°C durante la disolución. Se observó el mismo comportamiento en la disolución de los tres extractos a 20°C y a 55°C , es decir para los tres extractos (orégano seco, romero fresco y salvia fresca) se tuvo una solubilidad significativamente mayor ($P<0.001$) en propilenglicol que en agua y en aceite de maíz. Los extractos de romero fresco y de salvia fresca tuvieron una solubilidad superior a 93%; la solubilidad de los tres extractos fue superior a 55°C que a 20°C ($P<0.001$). La solubilidad de los compuestos presentó una correlación positiva significativa con los disolventes utilizados y con la temperatura ($r= 0.542$ y 0.453 para la correlación con los disolventes y con la temperatura, respectivamente).

6.6. Estabilidad de compuestos con actividad antioxidante

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se encuentran en todas las frutas y vegetales; están presentes en los alimentos como medio de prevención del crecimiento de bacterias y/o inhibición de las bacterias que ya están presentes (Friedman y Jürgens, 2000), así como por su actividad antioxidante (Wellwood y Cole, 2004). Se ha observado que la estabilidad y, como consecuencia, la susceptibilidad a la degradación

oxidativa de los compuestos fenólicos depende fuertemente de la estructura del compuesto, del pH en el que se encuentre y del tiempo de almacenamiento (Friedman y Jürgens, 2000). El pH del medio en que se encuentran los compuestos con actividad antioxidante estudiados en esta tesis pH 5.97, se seleccionó con base en que es un valor promedio en pastas cárnicas. Tanto el pH como la temperatura de almacenamiento imitaron las encontradas en pastas cárnicas comerciales, con el fin de conocer la estabilidad de los compuestos antioxidantes en condiciones reales.

La separación de las distintas fracciones obtenidas por HPLC se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado en el punto 5.2.6 (pág. 49). Para corroborar la presencia en las fracciones obtenidas de los ácidos rosmarínico y carnósico, y de carnosol, se llevó a cabo la comparación de los espectros de absorción correspondientes con los compuestos puros (reactivos analíticos), en un intervalo de longitud de onda de 200 a 400 nm.

En el estándar empleado de ácido rosmarínico, así como el presente en los extractos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, se encontró una fracción con $t_r=3$ min, y una longitud de onda de máxima absorción de 335 nm; sabiendo que para el ácido rosmarínico $t_r=15.5$ min, no se identificó a esta fracción como ácido rosmarínico. Empleando como estándar ácido gálico, se encontró que $t_r=4.5$ min, por lo que se concluyó que el compuesto observado sea resultado de la hidrólisis del ácido rosmarínico (Figura 15).

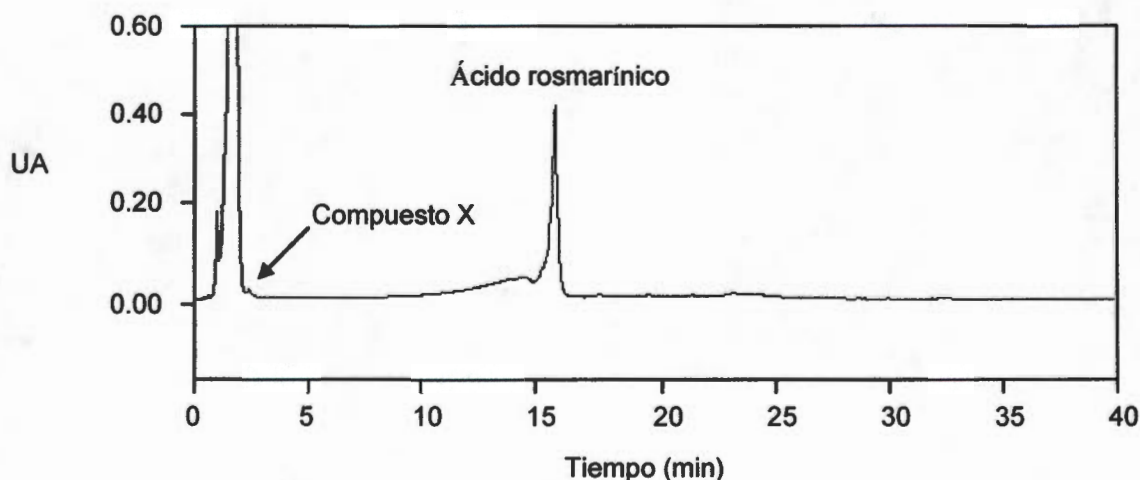


Figura 15. Cromatograma del compuesto X. Obtenido del ácido rosmarínico puro disuelto en etanol, por HPLC utilizando una columna C_{18} a 284 nm

Debido a la coincidencia en la longitud de onda de máxima absorción que presentó este compuesto con respecto al ácido rosmarínico, se decidió observar el cambio en la concentración de este compuesto ("compuesto X") con respecto al tiempo.

En almacenamiento, tanto a 4 como a 20°C, se encontró que el compuesto X fue estable al no presentar cambios en la concentración ($P>0.01$) durante las 72 h de estudio, tanto para la fracción aislada del reactivo analítico como para las fracciones separadas de los extractos de orégano seco, romero fresco y de salvia fresca y en los extractos (Anexos 1, 2 y 3, págs. 144, 145 y 146).

A 20°C no hubo diferencia en la concentración de ácido rosmarínico ($P>0.01$) (Anexos 4, 5 y 6, págs. 147, 148 y 149) durante el almacenamiento; es decir, este compuesto fue estable, tanto en su forma pura como en los extractos. Estos resultados coinciden con los reportados por Wellwood y Cole (2004). En almacenamiento refrigerado, se observaron diferencias significativas en la concentración de ácido rosmarínico ($P<0.001$) tanto en los extractos como en el compuesto puro almacenado.

La concentración de carnosol como estándar y del aislado de los extractos de orégano seco y de romero fresco no presentó variación significativa ($P>0.01$) durante las 72 h de almacenamiento a 4°C ni a 20°C (Anexos 7, 8 y 9, págs. 150, 151 y 152), por tanto se concluyó que fue un compuesto estable a las condiciones de almacenamiento estudiadas. La concentración de carnosol aislado del extracto de salvia fresca presentó un incremento significativo conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento ($P<0.001$) (0.0038, 0.0039, 0.0039 y 0.004 mg/mL a las 0, 24, 48 y 72 h, respectivamente). Se observó un aumento significativo ($P<0.001$) al final del tiempo del almacenamiento en la concentración de carnosol en los extractos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, debido al aparente incremento en la concentración de ácido carnósico en el extracto, lo cual fue resultado de que, la longitud de onda de máxima absorción tanto el carnosol como el ácido carnósico es de 284 nm, lo que indujo posibles variaciones en los resultados.

La concentración de ácido carnósico aislado de los extractos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, mostró un incremento durante el almacenamiento tanto a 4°C como a 20°C (Anexos 10, 11 y 12, págs. 153, 154 y 155); sin embargo, no hubo diferencias significativas en la de ácido carnósico puro ($P>0.01$). La concentración de este compuesto,

aislado de los extractos, presentó mayor incremento que cuando se encontraba sin aislar de los extractos; este comportamiento se observó en ambas temperaturas de almacenamiento.

Este incremento posiblemente se debió a reacciones de óxido-reducción e isomerización que involucraron al ácido carnósico, compuesto muy inestable, y a la quinona del ácido carnósico que se forma como resultado de la oxidación del primero, dando lugar a la formación de carnosol, rosmanol y ácido carnósico (Masuda y col., 2002). Estas reacciones pudieron no llevarse a cabo en el ácido carnósico puro, posiblemente debido a que no estaban presentes compuestos que reaccionaran con este (como la quinona), o no se establecieron las condiciones necesarias para que se llevaran a cabo estas reacciones.

La diferencia entre la concentración del ácido carnósico aislado de los extractos y la integrada a los extractos, posiblemente fue debida a que las fracciones recolectadas de los extractos de orégano seco, de romero fresco y de salvia fresca no correspondían al ácido puro, por lo tanto pudieron llevarse a cabo reacciones de óxido-reducción. En los extractos están presentes una gran variedad de compuestos y enzimas que pudieron inhibir la formación del ácido carnósico, hidrolizar al compuesto y/o hidroxilar o remover hidrógenos del ácido para formar quinonas que, a su vez, reaccionaron con otras especies para dar lugar a polímeros cuya longitud de onda de máxima absorción fue distinta a 284 nm (Guadarrama y Rivas, 1995; Casado-Vela, 2008).

6.7. Obtención de la quinona del ácido carnósico

El ácido carnósico es el principal compuesto fenólico de la salvia europea (*Salvia officinalis* L.) y del romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y tiene una potente actividad antioxidante; sin embargo, también contienen otros diterpenos abiatanos, los cuales pueden ser producto de la oxidación en cascada del ácido carnósico en las plantas, ejemplo de ellos son el carnosol y el rosmanol. Esto es debido a que el ácido carnósico es inestable cuando se encuentra en solución, su degradación puede ser inducida por oxidación en presencia de oxígeno; la oxidación de este ácido produce dos quinonas; una de ellas, la ortoquinona, sufre reacciones de óxido-reducción formando carnosol y rosmanol (Masuda y col., 2002).

La solución de la quinona fue obtenida de acuerdo con la metodología descrita en el punto 5.3 (pág. 50). De acuerdo con los resultados reportados por Masuda y col. (2002), el tiempo

de retención de la quinona es mayor al carnosol ($t_r=27.5$ min aproximadamente) y menor al del ácido carnósico ($t_r=30.2$ min aproximadamente). La longitud de onda de máxima absorción para la solución fue de 284 nm, la cual coincidió con la que presentaron el carnosol y el ácido carnósico. Los picos obtenidos en el cromatograma de la solución de la quinona se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Tiempo de retención (t_r) y área de los compuestos obtenidos en la solución de la quinona del ácido carnósico almacenada durante 0, 1.5 y 4 horas a 20°C

0 horas		1.5 horas		4 horas	
Tiempo de retención (min)	Área (Unidades de área)	Tiempo de retención (min)	Área (Unidades de área)	Tiempo de retención (min)	Área (Unidades de área)
		27.612	3'125,349	27.517	4'622,825
28.193	10'343,954	28.178	8'338,989	28.117	6'640,512
29.177	28,926			29.117	464,819
29.927	1'546,664	29.862	1'994,234	29.783	1'809,797
30.593	486,176	30.612	615,634	30.55	942,640
32.393	461,697	32.045	830,172	31.9	1'325,572
35.177	110,516	35.078	154,131	34.933	243,727
35.843	61,483	35.728	94,455	35.617	99,433

El Anexo 13 (pág. 156) muestra los cromatogramas de la quinona del ácido carnósico a las 0, 1.5 y 4 h de almacenamiento.

El compuesto con $t_r=28.193$ min, tuvo una área de 10,343,954 UA correspondió a la quinona del ácido carnósico, aunque se observaron otros compuestos presentes. Se pudo comprobar que el compuesto con $t_r=30.593$ min (486,176 UA) correspondió al ácido carnósico, lo que indicaría que la oxidación del mismo no fue completa; esto pudo deberse a que las condiciones de experimentación no fueron las adecuadas para oxidar completamente al ácido y obtener únicamente un producto.

Masuda y col. (2002) reportaron que, debido a que la quinona es un compuesto muy inestable, mediante reacciones de óxido-reducción y de isomerización se forman varios compuestos, dependiendo del disolvente en que se encuentre la quinona; si este es metanol,

se forma carnosol, 7-O-metilrosmanol, 8-lactona carnósica y ácido carnósico; cuando el disolvente es agua, se forman los mismos compuestos a excepción de 7-O-metilrosmanol, en su lugar se obtiene rosmanol.

Debido a la inestabilidad del compuesto, a las 1.5 y 4 h de haber obtenido la quinona, se observó que conforme transcurrió el tiempo de reposo, el área del pico que correspondió a la quinona disminuyó (10,343,954; 8,338,989 y 6,640,512 a las 0, 1.5 y 4 h, respectivamente). Por otro lado, el área y por consiguiente la concentración, del ácido carnósico se incrementó con el tiempo (486,176; 615,634 y 942,640 UA a las 0, 1.5 y 4 h, respectivamente) (Tabla 15, Anexo 13, pág. 156). De igual forma, se observó un pico a las 1.5 h, correspondiente a carnosol ($t_r=27.612$ min, área= 3,125,349), el área también aumentó a las 4 h (4,622,825). Los picos restantes, con excepción de aquel con $t_r=29.927$, 29.862 y 29.783 min, a 0, 1.5 y 4 h, respectivamente) mostraron aumento en el área. Estos resultados coinciden con los reportados por Masuda y col. (2002) respecto a la inestabilidad de la quinona y la formación de ácido carnósico y de carnosol, entre otros compuestos.

6.8. Propiedades fisicoquímicas de la pasta cárnica

6.8.1. Color

6.8.1.1. Pastas con extractos de hierbas

No se observaron diferencias significativas ($P>0.01$) entre las muestras añadidas con extractos de orégano fresco, orégano seco y romero fresco y el control, ni entre extractos obtenidos con etanol o cloroformo (Anexo 14, pág. 157). Sin embargo, acorde con la baja oxidación de lípidos obtenida con los extractos de romero fresco, en las muestras con este extracto se obtuvo la menor oxidación del pigmento; estas pastas presentaron la menor luminosidad (muestras más oscuras), la mayor cromaticidad (color más intenso) y la menor tonalidad (mayor componente rojo). El coeficiente de correlación de TBARS-cromaticidad en muestras almacenadas a 4°C y 20°C fue $r = -0.922$ y -0.678 , respectivamente. Este hecho pudo deberse a la presencia de compuestos que protegieron al pigmento de la oxidación. Yin y Cheng (2003) detectaron dos compuestos con actividad antioxidante de lípidos en el ajo que estabilizaron a la mioglobina, incidiendo en el ciclo redox del hierro o a través de la estructura de la globina, protegiéndolo de la oxidación. Lynch y Faustman (2000) informaron

que los aldehídos formados como producto de oxidación de los lípidos pueden reaccionar con la metamioglobina y disminuir su sensibilidad para ser reducida enzimáticamente. O'Grady y col. (2001) reportaron que una reducción en el contenido de oxígeno disuelto en el medio como resultado de su consumo durante la oxidación de los lípidos, provocó la aceleración en la oxidación de la oximioglobina, es decir a mayor oxidación de lípidos correspondió mayor oxidación del pigmento. Es importante mencionar que, aunque no se observó una diferencia significativa, los extractos de orégano seco oxidaron en mayor medida a la oximioglobina al producir la tonalidad más alta (menor componente rojo), posiblemente debido a que los extractos obtenidos a partir de esa hierba presentaron una considerable concentración de ácido rosmarínico (Tabla 7, pág. 61). De acuerdo con estudios realizados por Kroll y Rawel (2001), al oxidarse los ácidos fenólicos se forman quinonas, las cuales reaccionan con lisina, cisteína, metionina y triptofano de la molécula de mioglobina, provocando una polimerización de la misma, exponiendo al grupo hemo al medio ambiente; a mayor número de grupos hidroxilo, se incrementa la reactividad del compuesto fenólico; el ácido rosmarínico tiene cuatro grupos hidroxilo en su molécula, mientras que el ácido carnósico y el carnosol tienen dos, de aquí que el ácido rosmarínico sea más reactivo.

La temperatura de almacenamiento tuvo efecto significativo ($P < 0.001$) sobre el color de las muestras (Anexo 14, pág 157); las pastas almacenadas a 4°C fueron más pálidas que aquellas almacenadas a 20°C ($L=74.610$ y 67.283 , respectivamente). Las muestras más oscuras coincidieron con mayor oxidación de lípidos ($TBARS=1.831$ y 0.452 a 20°C y 4°C, respectivamente) mientras que bajos TBARS correspondieron a las muestras más pálidas. Asimismo, a 20°C se observaron las pastas con un color más intenso y con mayor componente rojo (cromaticidad= 16.426 y 14.973 , tonalidad= 79.423 y 80.431 a 20°C y a 4°C, respectivamente). De acuerdo con O'Grady y col. (2001), Fernández-López y col. (2003) y Estévez y col. (2005), a mayor oxidación de lípidos corresponden mayores cambios en el color de la carne, provocados por la elevada oxidación de oximioglobina; sin embargo, dado que al incrementarse la temperatura de almacenamiento la pérdida de humedad es mayor (Hernández-Hernández, 2004), la temperatura pudo propiciar la deshidratación de la superficie, con la consecuente concentración del pigmento, apreciando más oscuras a las muestras (Alarcón-Rojo, 1992) y/o también pudo reducir la movilidad de los catalizadores disueltos en la fase acuosa (Nawar, 1993).

El tiempo de almacenamiento no tuvo influencia significativa sobre la luminosidad ($P>0.01$) (Anexo 14, pág. 157), pero si en la cromaticidad y la tonalidad ($P<0.001$); se observó un incremento en la oxidación del pigmento durante el tiempo de estudio, al disminuir los valores de cromaticidad (16.219 y 15.177 a las 0 h y 72 h, respectivamente) e incrementar los de tonalidad (77.601 y 82.139 a las 0 h y 72 h, respectivamente), resultados que concuerdan con Signorini (2002), Fernández-López y col. (2003); Sánchez-Escalante y col. (2003) y Seydim y col. (2006), quienes reportaron que la oxidación de mioglobina y oximioglobina a metamioglobina café está asociada con la reducción en el color rojo (mayores valores de tonalidad) y disminución de la intensidad del mismo (menor cromaticidad).

La baja oxidación inicial de lípidos tuvo efecto protector significativo ($P<0.001$) sobre todos los parámetros considerados (Anexo 14, pág. 157), ya que el valor de luminosidad fue más bajo, la cromaticidad más elevada y la tonalidad menor que en aquellas pastas con alta oxidación inicial ($L=69.614$, 72.271 , cromaticidad= 16.362 y 15.034 , tonalidad= 78.419 y 81.449 para pastas con baja y alta oxidación inicial de lípidos, respectivamente). La menor oxidación del pigmento correspondió con los TBARS significativamente menores ($P<0.001$) que presentaron las pastas con baja oxidación inicial (1.459 y 0.8242 para pastas con alta y baja oxidación inicial, respectivamente). Otro factor que influyó en la coloración de las muestras, fue el almacenamiento inicial al que se sometieron para incrementar la oxidación (5 días a 4°C); de acuerdo con resultados reportados por Chaijan y col. (2008), la globina protege al grupo hemo contra la oxidación, pero si su conformación se altera mínimamente como resultado del almacenamiento y/o por la interacción con otras proteínas, la oxidación del pigmento se lleva a cabo rápidamente.

Todos los tratamientos con extractos presentaron luminosidad significativamente menor al control ($P<0.001$); esto se observó tanto a 4 como a 20°C , y a alta y baja oxidación inicial de la pasta (Anexo 15, pág. 158), las muestras a las que se les incorporó el extracto de romero fresco con etanol mostraron el valor más bajo (más oscuras) ($L=69.46$). No hubo diferencia significativa en la cromaticidad entre tratamientos ($P>0.01$), excepto en las muestras añadidas con el extracto de orégano seco con etanol que presentó el valor más bajo (15.55) (menor intensidad de color). La tonalidad de las pastas con extracto de romero fresco con cloroformo fue significativamente menor (más componente rojo) (78.549) ($P<0.001$).

Cabe mencionar que el proceso de emulsificación como tal pudo acelerar la oxidación de la mioglobina debido al incremento en la temperatura durante la trituración y homogenización de los distintos componentes, así como la incorporación de oxígeno a la pasta (Brewer, 2009).

6.8.1.2. Pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, y sus compuestos antioxidantes (aislados del extracto y reactivos analíticos puros)

Pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca

Las muestras almacenadas a 4 y a 20°C no presentaron diferencia significativa en los valores de luminosidad, esto se observó en todos los tratamientos y a todos los tiempos de estudio ($P>0.01$) (Anexo 16, pág. 159). La oxidación de oximioglobina en las pastas que se almacenaron a 4°C fue significativamente menor ($P<0.001$) al presentar cromaticidad superior y tonalidad menor a las pastas almacenadas a 20°C; es decir, la contribución de color rojo y la intensidad del color fueron superiores en las muestras en refrigeración. Esto se pudo deber a varios motivos: 1) aún cuando no se realizaron estudios microbiológicos a la pasta, posiblemente la temperatura baja inhibió el crecimiento de *Pseudomonas sp.* las cuales aceleran la formación de metamioglobina (café) en el músculo, debido a que producen enzimas con la capacidad de degradar la mioglobina; además, estas bacterias aerobias estrictas consumen oxígeno desarrollando condiciones de limitación de este gas en la superficie muscular (Dainty y col., 1983); 2) el pH de las muestras almacenadas a 20°C fue significativamente menor ($P<0.001$) al de las pastas almacenadas a 4°C (5.360 y 5.535, respectivamente). $r=-0.769$ para pH-tonalidad a 20°C. Al respecto, Yin y Faustman (1993) observaron que, conforme descende el pH de 6.5 a 4, la configuración de la estructura terciaria de la globina se afecta, especialmente en la región alrededor del grupo hemo, abriéndose y dejando al hierro expuesto al medio ambiente externo, resultando en una disminución de la estabilidad y un incremento en la oxidación; 3) la oxidación de lípidos fue significativamente mayor ($P<0.001$) a 20°C ($r=0.851$ y 0.099 a 20 y 4°C, respectivamente, para TBARS-tonalidad), lo cual pudiera provocar una reducción en el contenido de oxígeno disuelto en el medio, como resultado de su consumo durante la oxidación de lípidos, ocasionando una aceleración en la oxidación del pigmento (O'Grady y col., 2001); 4) el incremento en la temperatura pudo aumentar la tasa de disociación del oxígeno de la mioglobina, provocando una mayor tendencia a la autooxidación; además de ocasionar

mayor ionización de los aminoácidos que protegen al grupo hemo (Signorini, 2002); 5) se presentó un aumento en la velocidad de varias reacciones prooxidantes (Hultin, 1993; Yin y Faustman, 1993).

La luminosidad disminuyó significativamente durante el tiempo de estudio ($P<0.001$), (Anexo 16, pág. 159), por tanto se observó un oscurecimiento del color, posiblemente debido a la deshidratación de la superficie (Alarcón-Rojó, 1992); la cromaticidad también disminuyó y la tonalidad incrementó, por lo tanto el color fue menos intenso con mayor tonalidad anaranjada, datos que concuerdan con Signorini (2002), Fernández-López y col. (2003); Sánchez-Escalante y col. (2003) y Seydim y col. (2006). Los cambios en el color pudieron estar asociados con el incremento significativo ($P<0.001$) en la oxidación de lípidos y/o a que durante el almacenamiento el pigmento cárnico se encontró predominantemente como oximioglobina o metamioglobina (no desoximioglobina), lo cual ocasionó oscurecimiento más rápido (Fernández-López y col., 2003).

Las muestras control mostraron significativamente menos luminosidad ($P<0.001$) (Anexo 16, pág. 159), mientras que no hubo diferencia entre tratamientos con extractos, de la misma forma, las pastas control presentaron el color menos intenso (cromaticidad=15.487). La tonalidad de las muestras control y las adicionadas con romero fresco fueron las más altas (80.968 y 79.133). Durante la maceración en etanol, se extrajeron pigmentos que impartieron coloración al extracto, lo que influyó en la tonalidad de las pastas.

No hubo diferencia significativa en la luminosidad entre los diferentes tratamientos tanto a 4°C como a 20°C (Anexos 17 y 18, págs. 160 y 161) ($P>0.01$); sin embargo las muestras control fueron las más pálidas en ambas temperaturas de almacenamiento.

La cromaticidad y, por ende, la intensidad del color de las pastas control a 20°C fue menor al resto de los tratamientos a lo largo del tiempo de almacenamiento (Anexos 17 y 18, págs 160 y 161). Por otro lado, las muestras almacenadas en refrigeración no presentaron diferencia en la intensidad del color ($P>0.01$). Sin embargo, en ambas temperaturas y en todos los tratamientos se observó una disminución en los valores de cromaticidad conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento. Cabe mencionar que, en todas las muestras, se presentó un incremento en la oxidación de la oximioglobina conforme transcurrió el tiempo de estudio, siendo mayor el intervalo de variación en las pastas almacenadas a 20°C. Por

otra parte, se pudo observar que las pastas adicionadas con extracto de romero fresco presentaron la mayor intensidad de color rojo.

Pastas con extracto etanólico de orégano seco y sus compuestos antioxidantes

El efecto de la adición de extracto etanólico de orégano seco sobre las coordenadas de color de las pastas cárnicas se indica en el Anexo 19 (pág. 162). La luminosidad entre los tratamientos no fue estadísticamente diferente durante el tiempo de estudio ($P > 0.01$); los valores medios de luminosidad de las muestras añadidas con extracto de orégano seco y con ácido carnósico (estándar) (73.20 y 72.63, respectivamente) fueron estadísticamente menores a los demás tratamientos ($P < 0.001$), esto es, fueron las pastas más oscuras. Tomando en cuenta la diferencia entre los valores obtenidos de cromaticidad a las 0 y 72 h en cada uno de los tratamientos, se pudo observar que las muestras con extracto de orégano seco fueron las que presentaron la menor variación. Tampoco se encontró diferencia significativa ($P > 0.01$) entre tratamientos a las 0 y 24 h. Sin embargo, a partir de las 48 h fue evidente el efecto del extracto de orégano seco, ya que el color de las muestras fue estadísticamente más intenso que el resto de los tratamientos ($P < 0.001$). Se observaron diferencias significativas de tonalidad entre los tratamientos ($P < 0.001$), presentándose un incremento en los valores conforme transcurrió el tiempo de estudio. De acuerdo con estos resultados la mayor oxidación de la oximioglobina ocurrió en las pastas añadidas con extracto de orégano seco; sin embargo, con este extracto se observó la menor pérdida de componente rojo, lo que indica que el color del extracto influyó en la coloración inicial de la pasta, de allí el valor de la tonalidad estadísticamente más alto (82.408) ($P < 0.001$); además, este extracto fue el más eficiente en retardar la oxidación del pigmento comparado con sus compuestos por separado. El mayor efecto antioxidante del extracto posiblemente se debió a que contiene compuestos que pudieron estabilizar al pigmento, incidiendo en el ciclo redox del hierro o a través de la estructura de la globina (Yin y Cheng, 2003).

Se pudo observar que todos los compuestos con actividad antioxidante redujeron la oxidación de la oximioglobina, incluyendo al "compuesto X", al presentar la menor variación de tonalidad comparado con las muestras control. El ácido rosmarínico, tanto aislado del extracto como puro (reactivo analítico) se incorporó en mayor concentración (0.043 mg/100 g pasta) siguiendo, en orden descendente, el ácido carnósico (0.0003 mg/100 g pasta) y el carnosol (0.0001 mg/100 g pasta). La baja actividad antioxidante del ácido rosmarínico fue

debida a la reactividad de la quinona de este ácido sobre la lisina, cisteína, metionina y triptofano de la mioglobina, lo cual provocó un rearrreglo espacial de la proteína exponiendo al grupo hemo (Kroll y Rawel, 2001). El carnosol fue más eficiente en la disminución de la oxidación de la oximioglobina que el ácido carnósico. No se observó diferencia entre la tonalidad de las pastas tratadas con los compuestos aislados del extracto y aquellas añadidas como compuestos puros.

Pastas con extracto etanólico de romero fresco y sus compuestos antioxidantes

El tiempo de almacenamiento tuvo un efecto significativo en las coordenadas de color (Anexo 20, pág. 163) ($P < 0.001$); las muestras control fueron más oscuras que el resto de los tratamientos. Sin embargo, al final del tiempo de estudio la luminosidad de las pastas no fue estadísticamente diferente ($P > 0.01$). No hubo diferencia en la cromaticidad entre los tratamientos durante el tiempo de estudio ($P > 0.01$); sin embargo, las pastas que contenían al compuesto X aislado del extracto de romero fresco presentaron un incremento significativo ($P < 0.001$). Tampoco hubo diferencias en la tonalidad entre tratamientos durante el tiempo de estudio ($P > 0.01$). Sin embargo, en las primeras 24 h, en las pastas con ácido rosmarínico, tanto aislado del extracto como el reactivo analítico, se presentó un incremento en tonalidad, aunque no significativo, posiblemente debido a la formación de quinonas al oxidarse los compuestos fenólicos, las cuales reaccionaron con aminoácidos de la mioglobina provocando el rearrreglo de la proteína; a mayor número de grupos hidroxilo en la molécula, mayor la reactividad del compuesto fenólico (Kroll y Rawel, 2001). El ácido rosmarínico contiene 4 grupos hidroxilo, mientras que el ácido carnósico y el carnosol tienen 2. En las pastas con extracto de romero fresco, con ácido rosmarínico (obtenido del extracto de romero fresco y puro), con ácido carnósico proveniente del extracto de romero fresco, y el "compuesto X" (obtenido del extracto de romero fresco y puro) se presentó un descenso en la tonalidad al final del almacenamiento, como resultado de la actividad de la reductasa de la metamioglobina, que reduce la metamioglobina café a oximioglobina roja (Livingston y Brown, 1981; Stewart, 1990; Zhu y Brewer, 1998). Hagler y col. (1979) reportaron que esta enzima requiere nicotinamida adenindinucleótido reducido (NADH) como fuente de equivalentes reductores. Sin embargo, Madhavi y Carpenter (1993) y Zhu y Brewer (1998) encontraron que la concentración de la coenzima disminuye conforme transcurre el tiempo de almacenamiento del músculo. Con base en esta información, podría concluirse que los extractos contienen compuestos que actúan como donadores de equivalentes reductores. La

diferencia en los valores de tonalidad de las muestras a las 0 y 72 h indica que todos los compuestos antioxidantes disminuyeron la oxidación del pigmento al tener valores menores al control. Aún cuando en las pastas con ácido rosmarínico aumentó la tonalidad, al final del almacenamiento la coloración fue similar a la de inicio; mientras en las muestras control el color rojo disminuyó a lo largo del tiempo de estudio, al mismo tiempo que los TBARS se incrementaron (Punto 6.8.3.2, pág. 100).

El ácido carnósico aislado del extracto etanólico de romero fresco se añadió en una concentración más elevada que el carnosol (0.205 mg/100 g pasta y 0.0482 mg/100 g pasta, respectivamente) debido a que el extracto contenía mayor cantidad de ácido carnósico comparado con el carnosol (Punto 6.2, pág. 62), lo que evitó la oxidación del pigmento en mayor medida. El “compuesto X” proporcionó mayor protección contra la oxidación a la oximioglobina, comparado con el resto de los tratamientos.

Pastas con extracto etanólico de salvia fresca y sus compuestos antioxidantes

El Anexo 21 (pág. 164) muestra los valores medios de las coordenadas de color para estas pastas. A las 0 h no hubo diferencia significativa entre tratamientos en la luminosidad ($P > 0.01$). A partir de las 24 h y hasta el término del estudio, la muestra control tuvo la mayor luminosidad, mientras que las pastas adicionadas con el “compuesto X” aislado del extracto de salvia fresca fueron las más oscuras. La luminosidad depende de la capacidad de las proteínas para ligar agua, a menor retención de agua, mayor la formación de espacios entre las miofibrillas, dispersando la luz a medida que atraviesa de un medio a otro, originando un incremento en la reflectancia (Signorini, 2002; Fernández-López y col., 2003). Por otra parte, los compuestos fenólicos rodeados por moléculas del disolvente (etanol) pudieron formar una esfera de hidratación con el agua libre (Nelson y Labuza, 1991), lo que influyó en la reflectancia de la luz incidente de las pastas que los contenían.

Respecto a la cromaticidad, se observó que las muestras añadidas con extracto de salvia fresca presentaron una coloración significativamente más intensa ($P < 0.001$) durante todo el tiempo de almacenamiento (Anexo 21, pág. 164) ($P < 0.001$). Conforme se incrementó el tiempo de estudio, se presentó una disminución en la cromaticidad en todos los tratamientos, aunque esta diferencia fue significativa ($P < 0.001$) solamente en las muestras con el “compuesto X”, tanto extraído de salvia fresca como puro.

La tonalidad de las muestras con extracto de salvia fresca presentaron los valores más altos durante todo el tiempo de estudio (Anexo 21, pág. 164) ($P < 0.001$), lo que indicó que la oxidación del pigmento fue mayor; sin embargo, la coloración del extracto influyó en la tonalidad de estas muestras. Por otro lado, al considerar la diferencia en los valores de la tonalidad de las muestras de todos los tratamientos a las 0 y 72 h, se pudieron hacer varias observaciones: 1) el pigmento de las pastas con extracto de salvia fresca fue el que presentó menos oxidación durante el almacenamiento, al presentar mayor disminución en la tonalidad; 2) todas las pastas adicionadas con los compuestos antioxidantes aislados presentaron menor oxidación que el control; 3) con excepción del control y de las pastas adicionadas con ácido carnósico puro, en el resto de las muestras disminuyó la contribución del color rojo (hubo una reducción en la tonalidad); 4) el ácido carnósico, a la concentración que se encontraba en el extracto de salvia fresca, protegió de la oxidación en forma más eficiente a la oximioglobina, comparado con el carnosol aislado de salvia fresca; 5) el “compuesto X”, obtenido del extracto de salvia fresca y puro actuó como antioxidante de la oximioglobina.

De los resultados anteriores, se puede ver que el efecto del ácido carnósico y del carnosol presentes en los extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, así como los aislados de estos extractos, como antioxidantes de la oximioglobina dependió de su concentración en la pasta y de la oxidación de los lípidos en ésta.

6.8.1.3. Pastas con ácido carnósico y la solución de la quinona del ácido carnósico

La temperatura de almacenamiento tuvo un efecto significativo ($P < 0.001$) sobre la luminosidad de las muestras; las pastas almacenadas a 4°C presentaron mayor valor L con respecto a las almacenadas a 20°C (Anexo 22, pág. 165); dado que conforme se incrementa la temperatura de almacenamiento, la pérdida de humedad es mayor (Hernández-Hernández, 2004). Esto pudo propiciar la deshidratación de la superficie con la consecuente concentración del pigmento, que se apreció más oscuro (Alarcón-Rojo, 1992), la baja humedad también pudo reducir la movilidad de los catalizadores disueltos en la fase acuosa (Nawar, 1993). Por otro lado, no hubo influencia significativa ($P > 0.01$) con respecto a la luminosidad entre las muestras añadidas con ácido carnósico (59.90), solución de la quinona del ácido carnósico (62.23) y control (60.82). De igual manera, el tiempo no influyó ($P > 0.01$) en los cambios de luminosidad de las muestras almacenadas a 4 y a 20°C. Las pastas almacenadas a 4°C presentaron mayor intensidad en el color o cromaticidad ($P < 0.001$) que

aquellas almacenadas a 20°C. La baja temperatura de almacenamiento disminuyó significativamente ($P<0.001$) la oxidación de la oximioglobina al presentar menor valor de tonalidad que las pastas almacenadas a 20°C, debido a la reducción de la velocidad de diferentes reacciones prooxidantes (Hultin, 1993; Yin y Faustman, 1993). En general, la incorporación del ácido carnósico y de la solución de la quinona del ácido carnósico no disminuyó significativamente la oxidación del pigmento, ya que no hubo diferencia ($P>0.01$) entre la tonalidad de éstos y la presentada por las muestras control. Por otro lado, la intensidad del color rojo de las muestras disminuyó significativamente conforme se incrementó el tiempo de almacenamiento ($P<0.001$), posiblemente debido al aumento en la oxidación de lípidos (TBARS=0.0735 y 0.5877 a las 0 y 72 h, respectivamente) (O'Grady y col., 2001).

En el almacenamiento a 20°C y a 4°C no hubo diferencia significativa en la luminosidad de las pastas entre los diferentes tratamientos (Anexo 23, pág. 166); de igual manera L no varió estadísticamente con respecto al tiempo de estudio. La luminosidad de las pastas añadidas con la solución de la quinona del ácido carnósico fue superior al resto de los tratamientos en el inicio del período de experimentación en ambas temperaturas de almacenamiento. Al considerar los valores medios de luminosidad se observó que las pastas con la solución de la quinona del ácido carnósico almacenadas a 20°C presentaron mayores valores con respecto al resto de los tratamientos ($P<0.001$).

El tratamiento no influyó en la intensidad del color ($P>0.01$). La cromaticidad disminuyó significativamente en las muestras almacenadas a 20°C (Anexo 24, pág. 167) conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento ($P<0.001$), este cambio en la intensidad del color se observó en todos los tratamientos; esta modificación posiblemente este relacionada con la oxidación de lípidos ya que conforme se incrementaron los TBARS (Anexo 33, pág. 176) disminuyó la intensidad del color de las muestras (los coeficientes de correlación para TBARS-cromaticidad fueron $r=-0.549$ y -0.641 para ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico y control, respectivamente). Por otro lado, no hubo diferencia significativa entre los diferentes tratamientos durante el tiempo de experimentación ($P>0.01$). En las pastas almacenadas en refrigeración la intensidad del color fue menor conforme avanzó el tiempo de estudio al igual que a 20°C, en este caso el cambio no fue significativo; del mismo modo, los tratamientos no tuvieron influencia significativa sobre la cromaticidad de las muestras ($P>0.01$).

En todos los tratamientos a 20°C la oxidación de la oximioglobina se incrementó conforme aumentó el tiempo de almacenamiento (Anexo 25, pág. 168), teniéndose una tonalidad significativamente más alta ($P < 0.001$) a las 72 h, lo cual pudiera estar correlacionado con el incremento en la oxidación de lípidos (los coeficientes de correlación para oxidación de lípidos-tonalidad fueron $r = 0.774, 0.773, 0.796$ para ácido carnósico, solución de la quinona del ácido carnósico y control, respectivamente). En las muestras almacenadas a 4°C también disminuyó la intensidad de color rojo (incremento en la tonalidad) durante el desarrollo del experimento en todos los tratamientos; la oxidación del pigmento se incrementó mientras que los TBARS presentaron la misma tendencia (los coeficientes de correlación para oxidación de lípidos-tonalidad fueron $r = 0.722, 0.839, 0.597$ para ácido carnósico, solución de la quinona del ácido carnósico y control, respectivamente). Sin embargo, estos cambios no fueron significativos ($P > 0.01$), aunque dentro de las temperaturas no hubieron diferencias significativas ($P > 0.01$) en los valores medios de tonalidad entre los tratamientos y, considerando la diferencia en la tonalidad a las 0 y 72 h, se pudo observar que tanto el ácido carnósico como su quinona disminuyeron la oxidación del pigmento; además las pastas con el ácido presentaron mayor rojeza que las muestras con la solución de la quinona. La diferencia en la antioxidación posiblemente se debió a que la quinona reaccionó con lisina, cisteína, metionina y triptófano de la mioglobina provocando una polimerización de la misma (Pierpoint, 1969; Kroll y col., 2000; Kroll y Rawel, 2001) exponiendo al grupo hemo al medio ambiente incrementando la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} con la formación de metamioglobina (Yin y Faustman, 1993; Guerrero y col., 2002) y/o los compuestos derivados de las reacciones de óxido-reducción e isomerización de la quinona no brindaron la misma protección antioxidante que el ácido carnósico.

6.8.2. pH

El pH final de la carne es aproximadamente de 5.3-5.7 (Minor-Pérez, 1998) que coincide con el punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares; esto trae como consecuencia una pérdida de solubilidad y por lo tanto una disminución en la capacidad de retención de agua y en la intensidad del color (Alarcón-Rojo, 1992). Si el pH de la carne es elevado (6.2-6.8) la capacidad de retención de agua aumenta, la cual actúa como una barrera contra los radicales libres, tales como los radicales hidroxilo; por el contrario, a pH bajo (5.4 o menos) la carne es más susceptible a la oxidación de lípidos (Nam y col., 2001).

6.8.2.1. Pastas con extractos de hierbas

No hubo diferencia significativa en el pH de las muestras añadidas con los extractos de las diferentes hierbas estudiadas (Anexo 14, pág. 157) ($P>0.01$). Del mismo modo, la temperatura, el tiempo de almacenamiento, la oxidación inicial de lípidos y los tratamientos con extractos de hierbas, no tuvieron efecto significativo en el pH ($P>0.01$) (Anexos 14 y 15, págs. 157 y 158), lo cual coincide con lo reportado por Fernández-López y col. (2003), Sánchez-Escalante (2003) y Seydim y col. (2006). Sin embargo, las muestras almacenadas a 20°C y aquellas con alta oxidación inicial de lípidos tuvieron pH mayor y, a su vez, presentaron TBARS más elevado. Derivado de la oxidación de lípidos se formaron compuestos secundarios como aldehídos y cetonas, entre otros (Nawar, 1993; Huang y col., 2005), que pudieron incrementar el pH de las muestras. Los cambios en pH de pastas con alta y baja oxidación inicial, almacenadas a 20°C y a 4°C (Anexos 26 y 27, págs. 169 y 170), mostraron que se incrementó el pH al fin del tiempo de estudio en las muestras con oxidación inicial alta, mientras que en las muestras con oxidación inicial baja el pH disminuyó, independientemente del tratamiento y de la temperatura de almacenamiento. Esto evidenció la influencia de los productos de oxidación de lípidos en el pH de las muestras. La única excepción fueron las muestras control con alta oxidación inicial almacenadas a 20°C, posiblemente debido a que se favoreció el crecimiento de microorganismos productores de ácido acético (por ejemplo bacterias del género *Lactobacillus*) (Elferink y col., 2001), que provocó la disminución del pH de las pastas (Hernández-Hernández, 2004). Posiblemente esta también fue la causa de la disminución del pH en las muestras con baja oxidación inicial almacenadas a 20°C.

6.8.2.2. Pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, y sus compuestos antioxidantes (aislados del extracto y reactivos analíticos puros)

Pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca

La adición de los extractos a las pastas no influyó significativamente sobre el pH de las mismas (Anexo 16, pág. 159). Contrario a los resultados obtenidos en el apartado 6.8.2.1 (pág. 91), las muestras almacenadas a 20°C presentaron pH estadísticamente inferior al de las pastas mantenidas en refrigeración (4°C) ($P<0.001$). Si bien es cierto que las primeras presentaron mayor oxidación de lípidos, con la consecuente formación de productos de

oxidación que provocarían incremento en el pH, habría que tomar en cuenta que posiblemente también se pudo favorecer la actividad metabólica de la flora microbiana contaminante productora de ácidos orgánicos de cadena corta que pudieron incidir en la disminución del pH (Minor-Pérez, 1998; Elferink y col., 2001). Por otro lado, el tiempo de almacenamiento influyó en el pH de las muestras, ya que a las 72 h se presentó un descenso significativo ($P < 0.001$).

El pH disminuyó tanto a 4 como a 20°C; en las muestras a 4°C esta variación no fue significativa ($P > 0.01$), mientras que a 20°C, a excepción de las pastas con el extracto de romero fresco, la reducción fue significativa ($P < 0.001$). Por otro lado, el intervalo de cambio de pH fue superior en las muestras almacenadas a 20°C (Figura 16), lo que indicó que la temperatura alta pudo promover el crecimiento de microorganismos productores de ácido acético y aumentó la velocidad de diversas reacciones (Yin y Faustman, 1993) con las que se pudieron formar compuestos que incrementaron la acidez del medio con la consecuente disminución en el pH.

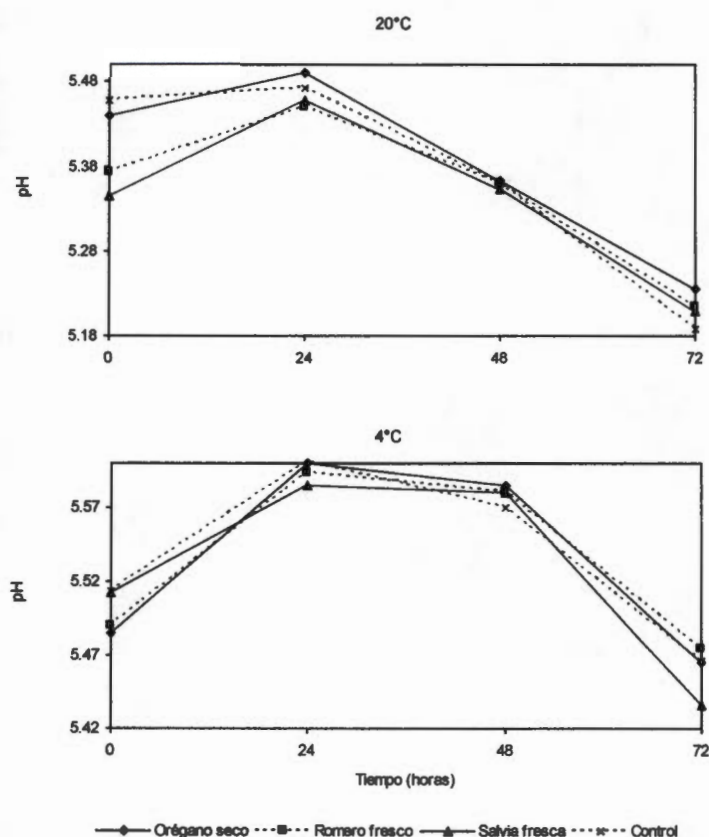


Figura 16. pH en pastas cárnicas añadidas con extractos de orégano seco, romero fresco y salvia seca, almacenadas a 4 y a 20°C

Pastas con extracto etanólico de orégano seco y sus compuestos antioxidantes

Se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.001$). Las muestras control presentaron los valores más bajos; no hubo diferencia significativa entre las muestras con el extracto de orégano y los compuestos antioxidantes ($P > 0.01$) (Anexo 28, pág. 171), lo que indicó que el pH del extracto y de los compuestos con actividad antioxidante fue superior al de la pasta cárnica, de allí que desde el inicio del estudio hubiera una modificación de la acidez de las muestras, este cambio se conservó durante todo el tiempo de almacenamiento. Cabe mencionar que entre las 0 y 72 h en las muestras de todos los tratamientos se observó un incremento en el pH.

Pastas con extracto etanólico de romero fresco y sus compuestos antioxidantes

Se presentaron diferencias significativas en el pH de los tratamientos (Anexo 28, pág. 171); de la misma forma que en el caso de orégano seco, el pH de las muestras control a las 0 h de almacenamiento fue menor al resto de los tratamientos. Sin embargo, conforme transcurrió el tiempo de estudio este valor se incrementó de tal manera que a las 48 y 72 h fue estadísticamente superior a los otros tratamientos. De acuerdo con estudios realizados por Hernández-Hernández (2004) en pastas cárnicas crudas almacenadas a 4°C, conforme se incrementó el tiempo de estudio se presentó una disminución en la concentración de ácido láctico, que es uno de los ácidos que influye en el pH de la carne (Lawrie, 1985; Alarcón-Rojó, 1992) y, en ese mismo período se incrementó la cantidad de ácido acético (que también influyó en el pH de las muestras), es decir se desarrolló flora tanto productora como consumidora de ácido láctico (Minor-Pérez, 1998; Elferink y col., 2001). Posiblemente esta fue la razón por la que en la mayoría de los tratamientos se presentó incremento en el pH (disminución de la acidez) de las 0 a las 24 h, con un descenso posterior que continuó hasta las 72 h, tiempo en el que finalizó el estudio.

Pastas con extracto etanólico de salvia fresca y sus compuestos antioxidantes

Al igual que con las muestras añadidas con extractos de orégano seco y romero fresco, el control presentó a las 0 h el pH significativamente más bajo de todos los tratamientos (Anexo 28, pág. 171) ($P < 0.001$); esta tendencia continuó durante todo el período de estudio. El pH fue en aumento conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento, siendo las pastas con

extracto de salvia fresca uno de los tratamientos con valores más altos. Aunque no se llevó a cabo un recuento de la población microbiana, la cuenta inicial de microorganismos productores y consumidores de ácido láctico posiblemente fue menor comparado con las pastas utilizadas en el estudio donde se incorporó el extracto de romero fresco y sus compuestos con actividad antioxidante, y por ello, conforme avanzó el tiempo de almacenamiento, no se observó una disminución en el pH de las muestras.

Diversos factores influyeron en la variación del pH de las pastas cárnicas durante el almacenamiento. La temperatura alta (20°C) pudo favorecer la actividad metabólica de la microflora contaminante productora de ácidos orgánicos de cadena corta con la consecuente disminución en el pH, mientras que los productos de oxidación de lípidos provocaron un aumento en éste. El cambio en la acidez del medio provocado por los extractos de las hierbas estudiadas dependió del pH de la pasta cárnica y de la acidez de los primeros; por su parte los compuestos con actividad antioxidante aislados de los extractos y como compuestos puros incorporados en forma individual incrementaron el pH de las muestras.

6.8.2.3. Pastas con ácido carnósico y la solución de la quinona del ácido carnósico

De forma similar a los resultados con extractos etanólicos y sus compuestos antioxidantes, las soluciones del ácido carnósico y de la quinona del ácido carnósico provocaron una modificación en el pH inicial de las muestras. El ácido carnósico y la solución de la quinona, así como la temperatura de almacenamiento no tuvieron efecto significativo en el pH de las muestras (Anexo 22, pág. 165) ($P>0.01$), aunque a las 72 h se apreció un incremento significativo ($P<0.001$).

Al final del almacenamiento a 20°C (Anexo 29, pág. 172) se observó que el pH se elevó significativamente en todos los tratamientos ($P<0.001$); mientras que a 4°C no hubo cambio significativo ($P>0.01$) entre el inicio y el final del período de estudio. Sin embargo, en ambas temperaturas e independiente del tratamiento, se presentó una disminución en el pH de todas las muestras a las 24 h, lo que significaría que el cambio se debió a la composición de la pasta, posiblemente a los moléculas con capacidad amortiguadora que contiene la carne, como aminoácidos, péptidos (carnosina y anserina), proteínas y compuestos de fosfato (Hultin, 1993; Pearson, 1994). Cabe añadir que esta capacidad amortiguadora fue evidente en las muestras a 20°C únicamente hasta las 24 h, ya que posteriormente se incrementaron

los valores de pH; mientras que en refrigeración la amortiguación ocurrió hasta las 48 h. Esta diferencia posiblemente se debió a la mayor oxidación de lípidos de las muestras a 20°C (Punto 6.8.3.3, pág. 108), lo que pudo provocar que los productos secundarios de la oxidación reaccionaran con las proteínas por medio de radicales libres, o formar productos de adición, del tipo bases de Schiff, con los grupos ϵ amino de la lisina; el malonaldehído pudo reaccionar con los grupos amino libres de diferentes cadenas polipeptídicas; los radicales libres pudieron reaccionar con las proteínas dando como resultado la formación de un radical libre lípido-proteína o uno proteico, en ambos casos pudo darse una polimerización de las proteínas (Cheftel y col., 1993). Estos cambios pudieron redundar en la modificación de algunas propiedades de las proteínas, entre ellas la capacidad amortiguadora. Por otro lado, un incremento en la temperatura de almacenamiento también aumenta la velocidad de las reacciones oxidativas (Hultin, 1993).

6.8.3. Oxidación de lípidos

La determinación de la actividad de un antioxidante se realiza midiendo el período de inducción de una grasa (tiempo en el cual no es detectable el desarrollo de ningún mal olor o sabor, al finalizar éste la grasa inicia su deterioro rápidamente, liberando compuestos volátiles) con y sin antioxidante, lo que se logra almacenando la muestra en un horno y analizando periódicamente el estado oxidativo (Macrae y col., 1993a). Las determinaciones cuantifican intermediarios o productos finales de la oxidación (Ockerman, 1980). Los antioxidantes solamente son efectivos si se añaden antes de que finalice el período de inducción de la grasa y éste período finaliza cuando el antioxidante se ha consumido (Macrae y col., 1993a).

6.8.3.1. Pastas con extractos de hierbas

Se observó una diferencia significativa en el grado de oxidación de las pastas añadidas con los extractos de romero fresco, orégano fresco, orégano seco y control (Anexo 14, pág. 157) ($P < 0.001$); con el primero se tuvo el menor valor de TBARS (0.8622) comparado con el resto de los tratamientos, lo que corrobora el importante efecto antioxidante del extracto de romero fresco en productos cárnicos (Yu y col., 2002; Fernández-López y col., 2003; Sánchez-Escalante y col., 2003; Lee y col., 2006; Rižnar y col., 2006; Seydim y col., 2006). Las pastas almacenadas a 20°C presentaron significativamente mayor oxidación que

aquellas mantenidas a 4°C ($P<0.001$) indicando, que aún cuando las pastas crudas contengan antioxidantes, es necesario refrigerarlas para disminuir la velocidad de las reacciones oxidativas (Hultin, 1993). Por otro lado, las pastas con mayor oxidación inicial presentaron TBARS significativamente superior ($P<0.001$) a aquellas con menor oxidación; por lo tanto, en pastas almacenadas a tiempos cortos con alta oxidación, esta reacción no puede ser disminuida por bajas temperaturas ni antioxidantes a niveles tan bajos como aquellos alcanzados con pastas cuya oxidación es inicialmente moderada. De igual forma, el tiempo de almacenamiento influyó significativamente en la oxidación ($P<0.001$), teniéndose el valor máximo a las 48 h con posterior disminución a las 72 h. Este descenso posiblemente se debió a la reacción del malonaldehído con proteínas (Cheftel y col., 1993; Li y King, 1999; Shahidi y Pegg, 1994). Al respecto Li y King (1999) observaron que conforme se incrementa la concentración de malonaldehído, éste tiende a reaccionar con los grupos ϵ -amino de la lisina y sulfhidrilos en el subfragmento 1 de la miosina, de allí que aparentemente se presente una disminución en la formación del dialdehído.

Independientemente de la temperatura de almacenamiento y de la oxidación inicial (Anexo 15, pág. 158), se observó que los extractos de romero fresco obtenidos con etanol y con cloroformo presentaron una oxidación significativamente menor al resto de los tratamientos ($P<0.001$); las muestras con extracto de romero fresco en cloroformo/etanol no fueron significativamente diferentes de aquellas añadidas con los extractos de orégano fresco y de orégano seco obtenidos con etanol ($P>0.01$) aunque tuvieron menor TBARS; la oxidación de las pastas con el extracto de orégano fresco obtenido con cloroformo, y el control tuvieron los valores más altos ($P<0.001$). La mayor antioxidación de los extractos de romero fresco fue debida a que el ácido carnósico y carnosol fueron los compuestos que se encontraron en mayor concentración (Tabla 7, pág. 61), los cuales pudieron inactivar los radicales libres presentes en la pasta (Aruoma y col., 1992; Hidalgo y col., 1998; Masuda y col., 2001; Fernández-López y col., 2003; Del Baño y col., 2003; Cheng y col., 2007); estabilizar a los hidroperóxidos evitando su posterior descomposición (Frankel y Huang, 1996; Dorman y col., 2004; Wellwood y Cole, 2004), con la consecuente disminución en la formación de malonaldehído; y secuestrar al Fe^{2+} para prevenir la formación de radicales alcóxido y peróxido (Aruoma y col., 1992; Fernández-López y col., 2003; Kilic y Richards, 2003; Dorman y col., 2004). Tanto el ácido carnósico como el carnosol son compuestos lipofílicos, de acuerdo con información publicada por Frankel y col. (1996), Frankel y Huang (1996), Huang y col. (1996) y McClements y Decker (2000), la efectividad de los

antioxidantes para retardar la oxidación de lípidos en una emulsión aceite en agua, como es considerada la pasta, se incrementa conforme su polaridad disminuye a causa de que pueden localizarse en la interfase aceite-agua, el sitio donde los hidroperóxidos hacen contacto con los prooxidantes. Por otro lado, derivado de la oxidación del ácido carnósico se forma una quinona que es muy inestable, dando lugar a la formación de ácido carnósico nuevamente y compuestos oxidados como el carnosol y el rosmanol, estos compuestos pudieron contribuir a la actividad antioxidante después de que el ácido carnósico se consumió (Masuda y col., 2002).

Tomando en cuenta el sistema modelo estudiado, las temperaturas de almacenamiento, la oxidación inicial de las pastas y el método para cuantificar la oxidación de lípidos, la antioxidación del extracto de orégano seco con etanol no fue superior a la presentada por el extracto de romero fresco con cloroformo (Anexo 15, pág. 158), a pesar de que el primero presentó mayor contenido de fenoles totales (0.222 mg/mL y 0.138 mg/mL extracto para el extracto de orégano seco con etanol y romero fresco con cloroformo, respectivamente), lo cual coincide con resultados reportados por Kähkönen y col. (1999) y Rababah y col. (2004), quienes no encontraron una correlación lineal positiva entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos provenientes de diferentes hierbas y especias. Otro punto importante es el hecho de que el extracto de orégano seco en etanol presentó mayor concentración de ácido rosmarínico y menor contenido de carnosol y ácido carnósico (0.045, 0.0002 mg/mg extracto de ácido rosmarínico, de carnosol y de ácido carnósico, respectivamente), comparado con el extracto de romero fresco con cloroformo (0.001, 0.086 y 0.438 mg/mg extracto de ácido rosmarínico, de carnosol y de ácido carnósico, respectivamente), por lo tanto la eficiencia de la actividad antioxidante de los extractos no dependió de la concentración de fenoles totales sino de la concentración, polaridad y estructura de los compuestos que forman parte de ellos, lo cual coincide con resultados reportados por Kähkönen y col. (1999); Rababah y col. (2004) y Wellwood y Cole (2004).

Considerando la media de los valores de TBARS en las muestras almacenadas a 20°C (Anexo 30, pág. 173) se observó que, independientemente de la oxidación inicial en las pastas, el mayor efecto antioxidante de todos los tratamientos se presentó cuando se añadió el extracto de romero fresco en cloroformo, aunque esta diferencia no fue significativa ($P>0.01$); el efecto antioxidante del extracto se debió, como se mencionó, a la presencia del

ácido carnósico y el carnosol como componentes principales; con relación a la diferencia entre la actividad antioxidante del extracto de romero fresco obtenido con cloroformo y el extracto cloroformo/etanol, posiblemente fue el resultado de que el extracto obtenido con cloroformo presentó una solubilidad en etanol de 88.16%, esto significó que algunos compuestos no polares no se disolvieron, influyendo en su difusión dentro de la pasta cárnica y, en consecuencia, en su actividad antioxidante.

La disminución de la velocidad de oxidación por los extractos fue evidente en las muestras con alta oxidación inicial, ya que en las muestras control se llegó al valor de TBARS máximo a las 24 h (3.9679, significativamente fue el más alto de todos los tratamientos) ($P < 0.001$) para posteriormente disminuir, mientras que las pastas con los extractos de romero fresco cloroformo/etanol, orégano fresco en cloroformo, orégano seco en cloroformo, orégano seco en etanol esto ocurrió a las 48 h; en los extractos de romero fresco en cloroformo y orégano fresco en etanol los valores aumentaron hasta las 72 h. La disminución en los TBARS fue debida a que el malonaldehído tiende a reaccionar con los grupos ϵ -amino de la lisina y sulfhidrilos en el subfragmento 1 de la miosina cuando su concentración se incrementa, y al aumentar el tiempo de almacenamiento de las muestras (Li y King, 1999). Aunque la diferencia en la oxidación entre tratamientos no fue significativa a las 48 y 72 h ($P > 0.01$), al comparar los TBARS máximos alcanzados en cada uno de los tratamientos, únicamente los extractos de romero fresco en cloroformo, orégano fresco y seco en etanol, presentaron valores menores al control, indicando que únicamente estos extractos tuvieron efecto antioxidante en todo el período de estudio. En las muestras con baja oxidación inicial, las pastas añadidas con extracto de orégano fresco en etanol presentaron la mayor oxidación a partir de las 24 h y hasta el término del período de estudio. Esto se debió a que durante la antioxidación se formaron radicales libres de los compuestos con actividad antioxidante en el extracto, disminuyendo la concentración neta de los compuestos con capacidad antioxidante en el medio; por otra parte, los radicales mencionados provocaron la formación de especies radicales adicionales a partir de los lípidos que se encuentran en la pasta, los cuales posteriormente promovieron la oxidación de esos mismos antioxidantes, teniendo como resultado el consumo de los compuestos antioxidantes en el extracto con un incremento en los productos secundarios de la oxidación de lípidos (Decker, 1998).

En las muestras almacenadas a 4°C (Anexo 30, pág. 173), al igual que en aquellas mantenidas a 20°C, independientemente de la oxidación inicial de lípidos, los extractos de romero fresco obtenidos con cloroformo presentaron mayor antioxidación que el resto de los tratamientos, aún cuando esta diferencia no haya sido significativa ($P>0.01$). A las 72 h del período de estudio en las pastas con oxidación inicial alta (TBARS=0.045), los extractos de orégano fresco y seco obtenidos con cloroformo y de orégano fresco en etanol actuaron como prooxidantes, ya que los TBARS fueron superiores al del control aunque estadísticamente no fueron diferentes ($P>0.01$). El efecto prooxidante posiblemente se debió a que los extractos pudieron contener compuestos que bajo condiciones de alta oxidación, ellos también se oxiden al inactivar a los radicales libres provenientes de los lípidos, provocando la formación de radicales libres adicionales que pudieron promover la oxidación (Decker, 1998) o influyó el hecho de que en los extractos obtenidos a partir de orégano, el ácido rosmarínico fue el compuesto que se encontró en mayor concentración (Tabla 7, pág. 61) y, de acuerdo con resultados reportados por Shahidi y col. (1992), debido a que este ácido carece de sustituyentes con grupos voluminosos en los anillos fenólicos se puede presentar un incremento en la velocidad de posibles reacciones de propagación que involucren a los radicales libres de este ácido, mientras que aquellos provenientes del carnosol y del ácido carnósico, por tener un grupo isopropilo en el anillo fenólico tienen mayor estabilidad. Por otra parte, por el mismo carácter hidrofílico del ácido rosmarínico, éste se pudo solubilizar en la fase acuosa y no interactuó con los hidroperóxidos que se encuentran en la interfase, de esta manera los últimos pudieron entrar en contacto con catalizadores de la oxidación que están ubicados en la fase continua, como por ejemplo el hierro (Nuchi y col., 2002; Kulišić y col., 2006).

En todos los tratamientos no hubo diferencia significativa ($P>0.01$) en el grado de oxidación hasta las 24 h de almacenamiento en muestras con oxidación inicial baja, almacenadas a 4°C (TBARS=0.023) (Anexo 30, pág. 173), a excepción de las muestras con extractos de orégano fresco con cloroformo y orégano seco con etanol; posiblemente se debió a que las gotas de grasa que conforman la pasta se encuentran rodeadas de una película proteica (Flores y Bermell, 1985; Gordon y Barbut, 1992b; Dickinson, 1993) la cual disminuye la interacción hidroperóxido-prooxidante (Nuchi y col., 2002). Al incrementar el tiempo de almacenamiento las proteínas se pudieron degradar (Signorini, 2002) haciendo esa matriz menos compacta y permitiendo las reacciones de autooxidación. El máximo valor de TBARS de las muestras control y de las pastas con extracto de romero fresco con

cloroformo se alcanzó a las 48 h, con descenso a las 72 h (0.6328 y 0.1435, control y extracto de romero fresco con cloroformo, respectivamente); mientras que para el resto de los tratamientos al término del tiempo de estudio se presentaron los valores más altos, lo que significaría que: a) todos los extractos actuaron como antioxidantes; b) la actividad del extracto de orégano seco en etanol no fue diferente estadísticamente del resto de los extractos; sin embargo, su efecto fue muy parecido al obtenido por los extractos de romero fresco en cloroformo, romero fresco en cloroformo/etanol y romero fresco en etanol; por lo que, bajo condiciones de baja oxidación inicial, este extracto puede ser una buena alternativa como antioxidante natural; c) la antioxidación de los extractos dependió, no sólo de su composición química, sino también de factores como la oxidación inicial de la pasta y de la temperatura de almacenamiento.

6.8.3.2. Pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, y sus compuestos antioxidantes (aislados del extracto y reactivos analíticos puros)

Pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca

Las pastas con extracto de romero fresco presentaron la menor oxidación (1.3372), siguiéndole en orden descendente el extracto de orégano seco (1.7681), el extracto de salvia fresca (2.0443) y finalmente el control (2.2484), aún cuando esta diferencia no fue significativa ($P>0.01$) (Anexo 16, pág. 159); estos valores fueron consecuencia de la concentración media de los tres compuestos con actividad antioxidante cuantificados (ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico), ya que a menor concentración de los compuestos correspondió mayor grado de oxidación; además de la presencia de compuestos antioxidantes no identificados (Cuvelier y col., 1994; Vági y col., 2005) y a reacciones de sinergismo entre los componentes de los extractos (Del Baño y col., 2003). La temperatura y tiempo de almacenamiento tuvieron un efecto significativo en la oxidación ($P<0.001$), ya que a baja temperatura hubo una disminución en la velocidad de las reacciones oxidativas (Hultin, 1993) (Figura 17), conforme avanzó el tiempo de estudio se incrementaron los TBARS.

No hubo diferencia significativa de TBARS entre tratamientos a ambas temperaturas ($P>0.01$) (Anexo 31, pág. 174); sin embargo las muestras con extracto de romero presentaron los TBARS más bajos y el control los más altos, indicando que los tres extractos

de hierbas mostraron actividad antioxidante debido a los compuestos fenólicos que contienen, los cuales estabilizaron a los hidroperóxidos evitando su rompimiento a radicales libres (Wellwood y Cole, 2004; Nautiyal y col., 2008), por inactivación de especies reactivas de oxígeno, por secuestro de metales de transición involucrados en la formación de radicales libres y/o por reducción de radicales alcoxilo y peroxilo (Masuda y col., 2001; Yu y col., 2002; Kulišić y col., 2006; Almajano y col., 2007; Fiorucci y col., 2007).

Las pastas almacenadas a 4°C presentaron mayor oxidación inicial comparada con las muestras a 20°C; sin embargo, durante el desarrollo del estudio, los TBARS alcanzados por las primeras fueron inferiores, lo que pone de manifiesto nuevamente la importancia que tiene el factor temperatura sobre la velocidad de oxidación de lípidos. También influyó la composición química y microbiológica de la pasta, ya que a medida que se incrementa la concentración de Fe^{2+} y de ácidos grasos libres, el grado de oxidación también aumenta (Decker y Hultin, 1991; Yin y col., 1993; Hernández-Hernández, 2004). Por otra parte, las bacterias del género *Pseudomona* producen lipasas que pudieron incidir en la concentración de ácidos grasos libres en el medio (Signorini, 2002).

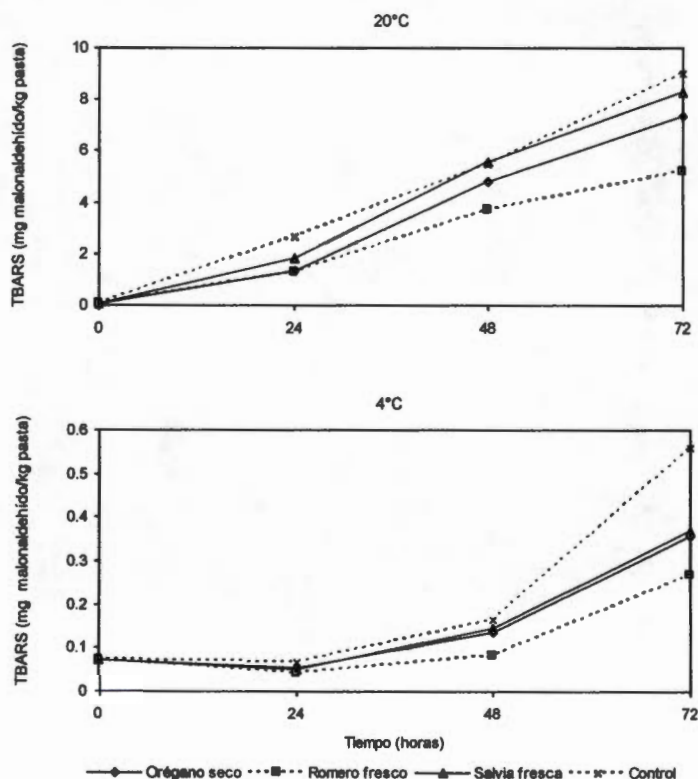


Figura 17. Grado de oxidación en pastas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca almacenadas a 20 y 4°C

Pastas con extracto etanólico de orégano seco y sus compuestos antioxidantes

A partir de las 24 h de almacenamiento, únicamente las pastas con extracto de orégano seco, con ácido rosmarínico de orégano seco y con carnosol de orégano seco, mostraron TBARS estadísticamente menores a los del control ($P < 0.001$) (Anexo 32, pág. 175); el resto de los compuestos tanto aislados del extracto de orégano seco como aquellos añadidos como reactivos analíticos actuaron como prooxidantes (Figura 18). Durante todo el período de estudio, solamente las pastas con extracto de orégano seco presentaron un grado de oxidación menor al control ($P < 0.001$), indicando que el efecto antioxidante del extracto de orégano seco fue mayor al de sus compuestos individuales. Al respecto Cuvelier y col. (1994) y Vági y col. (2005) reportaron que la antioxidación de los extractos y oleorresinas es mayor que la de los compuestos individuales, debido a que existen numerosos compuestos activos no identificados que tienen un papel importante en la actividad antioxidante; Del Baño y col. (2003) encontraron que la presencia de flavonas en extractos de romero fresco que contenían ácido carnósico incrementaron la actividad antioxidante del último debido a sinergismo entre ambos. Asimismo, Hernández-Ángel y Prieto-González (1999) observaron que los fenoles funcionan mejor en mezclas porque los muy reactivos se oxidan fácilmente, mientras que otros menos activos regeneran a los primeros.

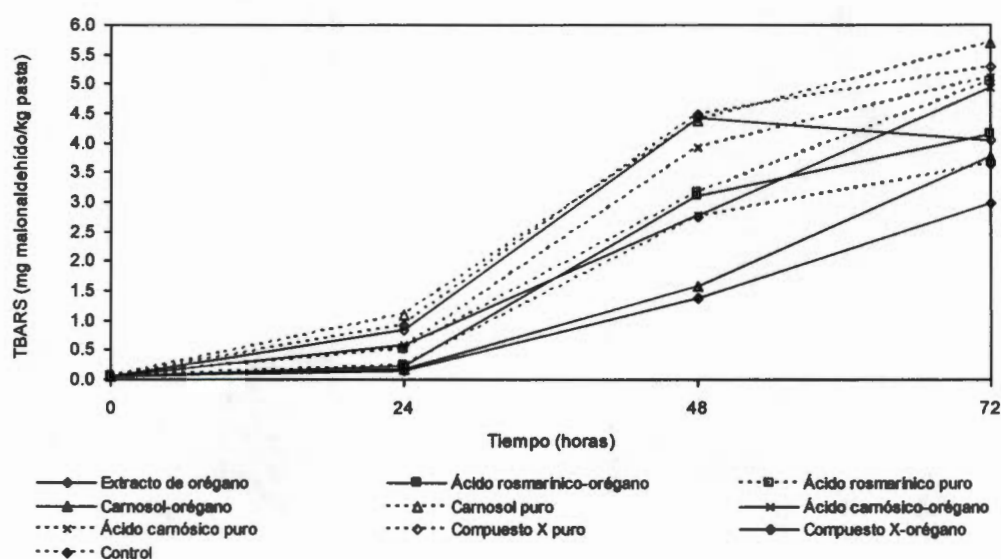


Figura 18. Grado de oxidación en pastas añadidas con extracto etanólico de orégano seco y sus compuestos con actividad antioxidante.

De acuerdo con los valores medios de TBARS las pastas con extracto de orégano seco presentaron la menor oxidación, siguiéndole en orden ascendente carnosol-orégano seco, control, ácido rosmarínico-orégano seco, ácido carnósico-orégano seco, ácido rosmarínico puro, compuesto X-orégano seco, ácido carnósico puro, compuesto X puro y carnosol puro. A pesar de que las pastas con carnosol aislado del extracto de orégano seco mostraron TBARS medio inferior al control (1.3937 y 1.6686, respectivamente), el valor máximo alcanzado durante el almacenamiento fue de 3.7612 y 3.6415 para el carnosol y control, respectivamente; por ello el carnosol actuó como prooxidante.

El efecto prooxidante de los compuestos pudo deberse a la composición química y microbiológica de la carne cruda y el lardo utilizados en la preparación de la pasta, por las siguientes razones: a) la concentración de Fe^{2+} y de ácidos grasos libres, ya que se ha observado que conforme se incrementan las cantidades de éstos en sistemas cárnicos la oxidación de lípidos también aumenta (Decker y Hultin, 1991; Yin y col., 1993; Hernández-Hernández, 2004); b) la capacidad reductora del músculo, ya que existen varios compuestos reductores en la carne como el ácido ascórbico, NADH (nicotinamida adenindinucleótido reducido), glutatión peroxidasa, los cuales reducen en Fe^{3+} a Fe^{2+} que a su vez puede catalizar la formación de radicales hidroxilo ($\text{OH}^{\cdot}$) (Decker y Hultin, 1991; Min y col., 2008); c) la flora bacteriana contaminante, debido a que las bacterias del género *Pseudomona*, bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* producen lipasas que pudieron incidir en la concentración de ácidos grasos libres en el medio (Signorini, 2002); d) la actividad lipolítica propia del músculo ya que las bajas temperaturas no inhiben la actividad de las lipasas, esterases y fosfolipasas que hidrolizan los enlaces éster de los lípidos liberando ácidos grasos (Nawar, 1993; Ranken, 1994); e) el pH de las pastas estuvo en un intervalo de 5.24 a 5.48 (Anexo 28, pág. 171). Al respecto, Yasosky y col. (1984) reportaron que a $\text{pH} < 6$ se produce una ionización de los residuos de histidina ($\text{pK} < 6.0$), lo cual puede alterar la carga y/o estructura terciaria de las proteínas, redundando en su capacidad para secuestrar iones que catalizan la oxidación. Otro factor que pudo haber influido fue la concentración del ácido carnósico y el carnosol incorporados a las pastas, ya que éstos se agregaron en baja concentración (0.0005 mg/150 g de pasta y 0.0001 mg/150 g de pasta para el ácido carnósico y el carnosol, respectivamente); se ha observado que algunos antioxidantes como el ascorbato y los polifenoles pueden actuar como prooxidantes que reducen el Fe^{3+} a Fe^{2+} , más activo en la descomposición homolítica de los hidroperóxidos. Por lo tanto, el efecto prooxidante del Fe^{2+} se opone al efecto antioxidante de los compuestos estudiados,

haciéndolos menos efectivos (Kilic y Richards, 2003; Almajano y col., 2007). Por otra parte, el ácido rosmarínico, el compuesto que se encuentra en mayor concentración en el extracto (0.065 mg/150 g de pasta) es hidrofílico, por lo que pudo permanecer en solución en la fase acuosa de la pasta, brindando poca protección contra la oxidación a los lípidos ya que en la interfase aceite-agua es donde los hidroperóxidos y los prooxidantes entran en contacto (Frankel y col., 1996; McClements y Decker, 2000) y/o los radicales del compuesto formados a partir de la donación de hidrógeno pudieron disminuir la concentración del antioxidante en el medio y a su vez provocaron la formación de especies radicales adicionales que posteriormente promovieron la oxidación de ese mismo antioxidante, de tal manera que la formación y descomposición de los radicales del antioxidante resultaron en el consumo de éste sin que hubiera una disminución en el número de radicales libres (Decker, 1998).

Aún cuando los cuatro compuestos con actividad antioxidante aislados del extracto, así como en forma pura (reactivos analíticos) se agregaron a las pastas en la misma concentración, se observó una diferencia significativa en la oxidación entre ambos tipos de compuestos. Las "impurezas" o compuestos que acompañaron a los ácidos rosmarínico y carnósico, al carnosol y al compuesto X obtenidos de los extractos pudieron influir en la extensión de su actividad antioxidante mediante reacciones de oxido-reducción y/o sinergismo, lo cual corroboraría el importante efecto antioxidante del extracto completo.

Pastas con extracto etanólico de romero fresco y sus compuestos antioxidantes

Al igual que con las pastas añadidas con el extracto de orégano seco y sus compuestos con actividad antioxidante, el extracto de romero fresco presentó menor grado de oxidación que los ácidos rosmarínico y carnósico, carnosol y compuesto X (Anexo 32, pág. 175) ($P < 0.001$), debido a compuestos antioxidantes no identificados, reacciones de óxido-reducción y/o sinergismo entre los diferentes compuestos que formaron parte del extracto (Hernández-Ángel y Prieto-González, 1999; Del Baño y col., 2003; Vági y col., 2005). Sin embargo, todos los compuestos agregados en forma individual, aislados del extracto o como reactivos analíticos, mostraron actividad antioxidante (Figura 19) al presentar TBARS menores al control, pudiendo inactivar radicales libres (Masuda y col., 2001; Yu y col., 2002; Fernández-López y col., 2003; Sánchez-Escalante y col., 2003; Chaiyasit y col., 2005; Kulišić y col., 2006; Seydim y col., 2006; Almajano y col., 2007; Fiorucci y col., 2007), secuestrar al ión ferroso (Aruoma y col., 1992) y/o prevenir la descomposición de los hidroperóxidos

(Frankel y Huang, 1996), teniendo como consecuencia la menor formación de malonaldehído.

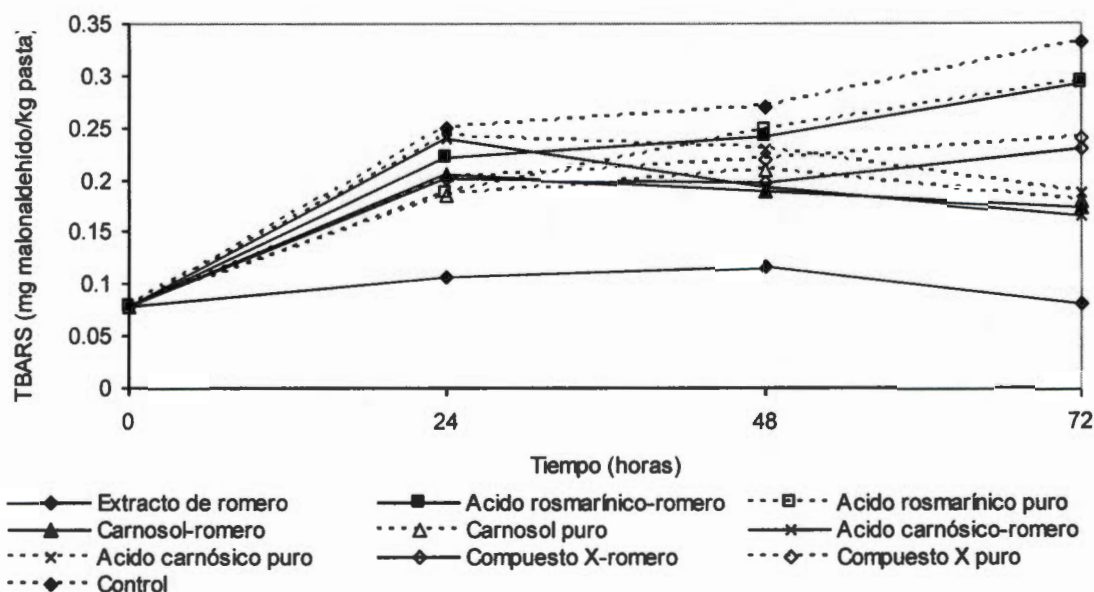


Figura 19. Grado de oxidación en pastas añadidas con extracto etanólico de romero fresco y sus compuestos con actividad antioxidante

De acuerdo con el valor de TBARS medio (Anexo 32, pág. 175), las muestras control presentaron la mayor oxidación de todos los tratamientos (0.2315) siguiéndole, en orden descendente, el ácido rosmarínico, el compuesto X, el ácido carnósico, el carnosol y el extracto de romero fresco el cual, como se mencionó, tuvo la mayor capacidad antioxidante. Este orden en la capacidad antioxidante se debió, principalmente, a la polaridad de los compuestos. El ácido rosmarínico y el compuesto X permanecieron disueltos en la fase acuosa mientras que el ácido carnósico y el carnosol pudieron localizarse en la interfase aceite-agua, que es el sitio donde los hidroperóxidos y los prooxidantes que se encuentran en la fase acuosa entran en contacto (Frankel y col., 1996; McClements y Decker, 2000). Por otra parte, el carnosol es una lactona derivada de la oxidación del ácido carnósico, con menor polaridad, posiblemente fue un motivo por el que la antioxidación del carnosol no presentó diferencia significativa al ácido carnósico, siendo que la concentración de carnosol agregada a la pasta fue menor a la del ácido (0.072 mg/150 g pasta de carnosol, 0.308 mg/150 g pasta de ácido carnósico). Otro motivo pudo ser el hecho de que el grupo carboxilo del ácido es capaz de interactuar con el hidroxilo del grupo fenol que se encuentra en su

proximidad, vía puente de hidrógeno (unión intramolecular), resultando en la disminución de la capacidad del grupo fenol para donar el hidrógeno, lo que provocó la reducción de la actividad antioxidante del ácido carnósico. Asimismo, la inestabilidad de este ácido pudo provocar una disminución en la disponibilidad del compuesto para llevar a cabo la inactivación de radicales libres (Huang y col., 1996).

Tomando en consideración la actividad antioxidante de los compuestos aislados, se podría decir hubo una contribución de todos los compuestos, una vez que ya forman el extracto; sin embargo, el carnosol y el ácido carnósico son los que contribuyeron en mayor medida, información que concuerda con resultados obtenidos por Del Baño y col. (2003).

No se encontró diferencia significativa del grado de oxidación entre los tiempos de muestreo en pastas añadidas con ácido rosmarínico obtenido del extracto de romero fresco (TBARS medio=0.2078) y puro (TBARS medio= 0.2016). En cuanto al compuesto X, no hubo diferencias significativas en el valor de TBARS, independientemente de la fuente de la cual se obtuvo (0.1761 y 0.1841 para el compuesto aislado del extracto de romero fresco y puro, respectivamente). Finalmente, se observó que el ácido rosmarínico del extracto y puro presentó menor poder antioxidante que el compuesto X.

Pastas con extracto etanólico de salvia fresca y sus compuestos antioxidantes

Por su naturaleza fenólica, el extracto de salvia así como los ácidos rosmarínico y carnósico, y el carnosol obtenidos de este extracto, presentaron actividad antioxidante durante todo el tiempo de estudio al obtenerse TBARS significativamente inferiores al control ($P<0.001$) (Anexo 32, pág. 175). El control presentó mayor grado de oxidación (0.3899), siguiendo en orden descendente las pastas añadidas con el compuesto X, carnosol, ácido carnósico, ácido rosmarínico, y extracto de salvia (Figura 20). Del mismo modo que con las pastas añadidas con extractos de romero fresco y de orégano seco, la mezcla de compuestos fenólicos del extracto de salvia fresca ocasionó una disminución en el grado de oxidación, en comparación con los compuestos con actividad antioxidante, tanto aislados del extracto como puros.

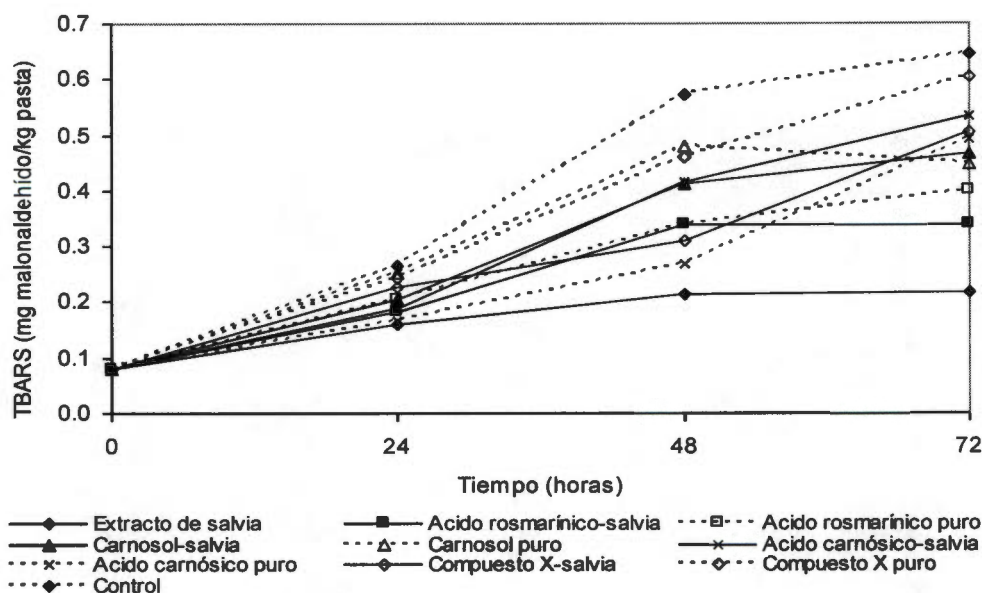


Figura 20. Grado de oxidación en pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de salvia fresca y sus compuestos con actividad antioxidante

Al igual que en los resultados reportados con extracto de orégano, la concentración de ácido rosmarínico en el extracto y que, en consecuencia, se incorporó a las pastas, fue superior a la cantidad de carnosol y de ácido carnósico; sin embargo, en este caso todos los compuestos actuaron como antioxidantes, el ácido rosmarínico mostró mayor actividad que el carnosol y el ácido carnósico, posiblemente debido a que las propiedades químicas y microbiológicas de la pasta fueron diferentes, es decir la concentración de lípidos y la cuenta microbiana inicial pudo ser inferior a las otras pastas, además el pH de las muestras en este experimento fue superior (5.39-5.77) al anterior (5.24-5.48). Por otro lado, en la antioxidación no se mostró la influencia de la polaridad de los compuestos; al parecer, tuvo mayor efecto la concentración de los compuestos antioxidantes. Similar a las pastas con orégano y romero, la actividad del carnosol y del ácido carnósico no presentó diferencia significativa ($P > 0.01$), a pesar de que la concentración de carnosol añadida a las pastas fue inferior a la del ácido carnósico (0.0001 y 0.0002 mg/150 g de pasta, respectivamente).

El compuesto X, presentó un efecto antioxidante, lo cual confirma la sugerencia de que se trata de un compuesto fenólico, con polaridad ligeramente superior a la del ácido gálico; esta conclusión se basa también en los tiempos de retención del compuesto X (3 min) y del ácido gálico (4.5 min).

6.8.3.3. Pastas con ácido carnósico y la solución de la quinona del ácido carnósico

La temperatura de almacenamiento disminuyó significativamente ($P>0.0001$) el grado de oxidación; a temperatura de refrigeración se redujo el grado de oxidación (TBARS=0.6736 y 0.2355, a 20°C y 4°C, respectivamente) (Hultin, 1993) (Anexo 22, pág. 165). Las pastas añadidas con ácido carnósico y con la solución de la quinona presentaron TBARS significativamente menores que el control ($P>0.0001$), debido a su carácter fenólico. Sin embargo, las pastas añadidas con la solución de la quinona presentaron menor grado de oxidación, posiblemente debido a reacciones de óxido-reducción y de isomerización con la consecuente formación de compuestos con actividad antioxidante (Masuda y col., 2002). El tiempo de almacenamiento influyó significativamente en el grado de oxidación ya que a 0 h se presentó el valor de TBARS menor (0.0735) y a las 48 h el más alto (0.6279), con posterior disminución a las 72 h (0.5877) ($P>0.0001$). El incremento en la oxidación, conforme transcurrió el tiempo de estudio, coincidió con resultados reportados por Hernández-Hernández (2004), mientras que el descenso a las 72 h posiblemente se debió a reacciones de malonaldehído con las proteínas cárnicas (Cheftel y col., 1993; Shahidi y Pegg, 1994; Li y King, 1999). A ambas temperaturas de almacenamiento, los antioxidantes incorporados a las pastas acortaron el tiempo en el que se alcanzaron los TBARS máximos; a 20°C el valor máximo se alcanzó a las 24 h, con una disminución posterior; mientras que en el control este valor se presentó a las 48 h (1.6766) (Anexo 33, pág. 176). En almacenamiento refrigerado, estos tiempos fueron 48 h para los antioxidantes (0.2800 y 0.3112 para el ácido carnósico y la solución de la quinona, respectivamente) y 72 h para el control (0.5142). Ya que los TBARS más altos en los tratamientos con ácido carnósico y la quinona son menores a los alcanzados por el control, se puso de manifiesto que los antioxidantes no siempre prolongan el período de inducción de la oxidación (Macrae y col., 1993a; Hamilton, 1994), pero si disminuyen la concentración de los productos secundarios de la oxidación.

El grado de oxidación de las pastas a las que se les incorporó la solución de la quinona del ácido carnósico almacenadas a 20°C, tuvieron TBARS menores que las de ácido carnósico (Anexo 33, pág. 176), lo opuesto se observó en muestras almacenadas en refrigeración, aún cuando estas diferencias, dentro de temperaturas, no fueron significativas ($P>0.01$) (Figura 21). Este comportamiento se debió a que, a 20°C, se incrementó la velocidad de formación del carnosol, 8-lactona carnósica y ácido carnósico a partir de la

quinona del ácido carnósico; estos compuestos pudieron contribuir a la actividad antioxidante de la solución, ya sea en forma individual (Huang y col., 1996; Masuda y col., 2002) y/o mediante reacciones de óxido-reducción y sinergismo (Hernández-Ángel y Prieto-González, 1999; Del Baño y col., 2003; Vági y col., 2005).

Por su parte, la temperatura de refrigeración disminuyó la velocidad de estas reacciones (Hultin, 1993), de tal manera que la antioxidación en las pastas con ácido carnósico fue mayor que la presentada por las muestras añadidas con la mezcla de compuestos de la solución de la quinona. Aunado a esto está el hecho de que la quinona no tiene actividad antioxidante (Masuda y col., 2001 y 2002).

Como consecuencia del efecto antioxidante del ácido carnósico, se forma la quinona que, posteriormente y mediante reacciones de óxido-reducción e isomerización, da lugar a la formación de carnosol, 8-lactona carnósica y ácido carnósico. Debido a esta serie de reacciones, la antioxidación de extractos como el de romero fresco se pudo prolongar por el hecho de que el ácido carnósico es el compuesto mayoritario.

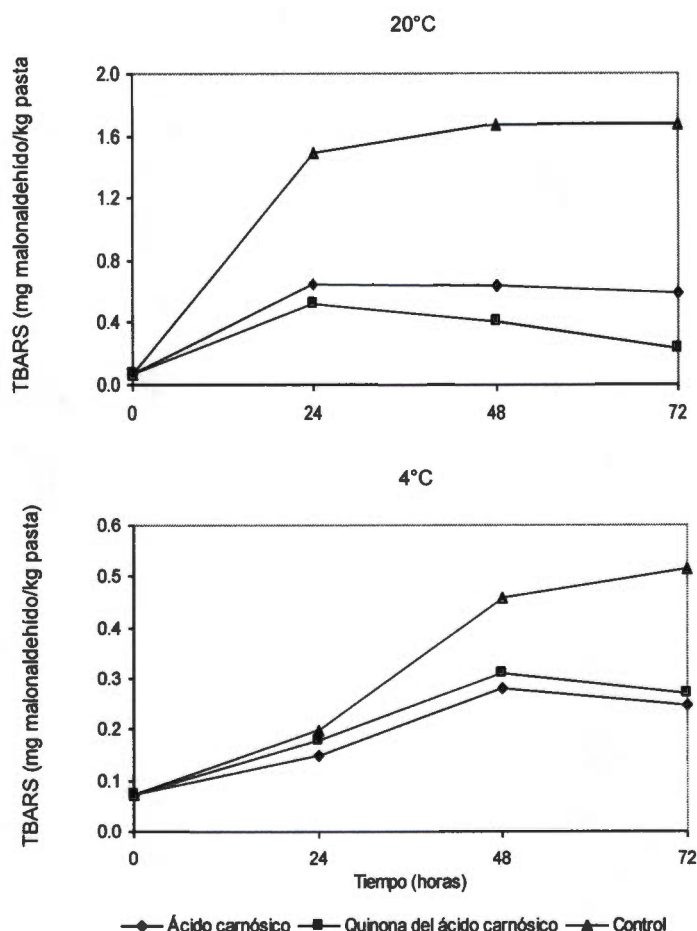


Figura 21. Grado de oxidación en pastas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico, almacenadas a 20 y 4°C

6.9. Propiedades funcionales de la pasta cárnica

6.9.1. Viscosidad aparente

Durante la formación de la pasta cárnica, la hidratación de las fibras musculares y la solubilización de las proteínas miofibrilares incrementan la viscosidad de la fase continua de la matriz proteica, lo cual estabiliza a los glóbulos de grasa en la pasta cruda, restringiendo su movimiento y evitando la coalescencia (Rizvi, 1981; Lee, 1985; Smith, 1988). La viscosidad de la pasta tiende a disminuir cuando aumenta el tiempo y temperatura de emulsificación, por lo que se recomienda llevar esta operación a 15°C como máximo durante aproximadamente 10 min (Rizvi, 1981; Smith, 1988).

La viscosidad aparente de la pasta cárnica fue 63 Pa*s. La viscosidad aparente disminuyó conforme se incrementó la velocidad de deformación (Tabla 16), lo que indicó que la pasta presentó un comportamiento pseudoplástico, debido a que la distribución espacial de las partículas fue alterada por la velocidad de deformación y a que las partículas no esféricas se alinearon en la dirección del flujo, oponiendo menor resistencia al movimiento (McClements, 1999c).

Tabla 16. Velocidad de deformación y viscosidad aparente de la pasta

velocidad de deformación (rpm)	viscosidad de la pasta (Pa*s)
0.3	370
0.5	240
0.6	195
1	125
1.5	93
2	78
2.5	63
3	55
4	43
5	35
6	31

6.9.2. Degradación proteolítica

Conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento el área de los picos correspondiente a 200 kDa (miosina) no tuvo cambios significativos ($P>0.01$); pero se observó un decremento en ésta (1707, 1208, 811 y 614 kDa a las 0, 24, 48 y 72 h, respectivamente) (Anexo 16, pág. 159), indicando que hubo degradación de la proteína. Este resultado concuerda con lo reportado en extractos de proteínas miofibrilares almacenadas a 37°C (Fadda y col., 1999), carne de bovino almacenada a 20°C (Signorini, 2002), carne de cerdo almacenada a 15°C (García-Barrientos y col., 2006) y un homogenizado de proteínas miofibrilares de músculo de atún de aleta azul almacenado a 4°C (Chaijan y col., 2008). Asimismo, se presentaron cambios evidentes en la proteína de 45 kDa (actina), aunque no significativos (2157, 2391,

2262 y 2018 a las 0, 24, 48 y 72 h, respectivamente) ($P>0.01$), debido a la degradación de las cadenas pesadas de miosina (200 kDa), entre otras, con la consecuente formación de fragmentos de bajo peso molecular. Esto pudo deberse a que la catepsina D degrada preferentemente a la miosina, y en menor medida a la actina (Robbins y col., 1979). Signorini (2002) reportó menor degradación de la actina en comparación con la miosina en carne de bovino almacenada a 20°C. La baja degradación de la actina posiblemente se debió, entre otras razones, al arreglo espacial de la molécula, debido a que la miosina es fibrosa y la actina es globular (Flores y Bermell, 1984), por lo tanto la miosina presentó mayor superficie para ser degradada por las proteasas.

La degradación en las muestras a 20°C se hizo evidente por la aparición de nuevos picos y el incremento de las áreas con pesos moleculares menores de 20 kDa (Figura 22). De acuerdo con resultados reportados por Bala y col. (1979), Fadda y col. (1999), Signorini (2002) y García-Barrientos y col. (2006), la proteólisis de productos cárnicos puede ser llevada a cabo por la acción de enzimas endógenas (catepsinas y calpainas) y/o exógenas. En este estudio es posible que incidan ambas fuentes de proteasas, debido a que por una parte la elaboración de la pasta se realizó en condiciones higiénicas pero no estériles y, por otro se incorporó aire a las pastas que posteriormente se almacenaron en frascos parcialmente tapados; por lo tanto, se presentaron condiciones apropiadas para que se desarrollara la microflora contaminante con actividad proteolítica, como *Pseudomonas*. No se observó diferencia significativa en pastas con extractos de orégano seco, salvia fresca, romero fresco y control almacenadas a 20°C con respecto a la concentración de las proteínas de 200 kDa (miosina) y la de 45 kDa (actina) ($P>0.01$) (1145, 1399, 952, 844 y 2205, 2326, 2312, 1986 proteínas de 200 y 45 kDa en pastas con extractos de orégano seco, salvia fresca, romero fresco y control, respectivamente). Sin embargo, se obtuvieron concentraciones menores en el control, lo que indicó que los extractos redujeron la extensión de la degradación proteica posiblemente debido a que los fenoles pudieron interactuar con las proteasas para formar complejos que inhibieron y/o retardaron su actividad (Shishikura y col., 2006). Del mismo modo, las quinonas formadas después de la oxidación de los compuestos antioxidantes, pudieron reaccionar con las enzimas provocando su inactivación (Pierpoint, 1969). A las 72 h de almacenamiento, en el extracto de romero se presentó la mayor densidad de proteínas de 200 kDa (miosina) (233) y la menor densidad para 45 kDa (actina) (1138), indicando que fue el tratamiento que disminuyó en mayor medida la hidrólisis de las proteínas, debido a que contiene compuestos que al reaccionar con las proteínas

propició el entrecruzamiento de las mismas (Punto 6.9.3.1, pág. 116) (Shishikura y col., 2006) o se formaron derivados que indujeron cambios conformacionales en las proteínas que impidieron el acceso de las enzimas a las uniones peptídicas (Kroll y col., 2000).

En concordancia con resultados obtenidos por Signorini (2002) y García-Barrientos y col. (2006), la actividad proteolítica y por ende la hidrólisis de las proteínas de 200 y 45 kDa a 20°C fue superior a la degradación que mostraron en el almacenamiento refrigerado, las densidades de estas proteínas fueron menores a 20°C (981, 1189 y 2078, 2336 para proteína de 200 y 45 kDa a 20°C y 4°C, respectivamente) (Figuras 22 y 23), aún cuando esta diferencia no fue significativa ($P>0.01$).

En las muestras almacenadas a 4°C a partir de las 24 h se observó incremento en la densidad del pico de 200 kDa (miosina) en las pastas con orégano seco, salvia fresca y el control (976 a las 0 h y 1154, 2008 y 1085 las 24 h, respectivamente) (Figura 23). En las pastas con romero fresco la densidad del pico que corresponde a este peso molecular disminuyó (701 a las 24 h), indicando que en los tres primeros tratamientos la degradación de proteínas de alto peso molecular se llevó a cabo desde el inicio del almacenamiento; mientras que en el caso del romero fresco esta proteólisis se retrasó hasta las 72 horas, tiempo en el que aumentó la densidad del pico de 200 kDa (1467) y la densidad de los picos con peso molecular menor a 31 kDa, como se mencionó, esto podría ser consecuencia de la interacción de los fenoles con las enzimas o posiblemente hubo interacción de los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos y de las quionas con los grupos polares de las proteínas miofibrilares (Pierpoint, 1969; Shishikura y col., 2006) y provocó el entrecruzamiento de partículas cercanas, con la consecuente formación de complejos de mayor área superficial (Shishikura y col., 2006) o de compuestos derivados que impidieron el acceso de las enzimas a las uniones peptídicas (Kroll y col., 2000). Al final del período de estudio la densidad del pico de 200 kDa (miosina) de las muestras control fue el menor de todos los tratamientos (1103, 1467, 1222 y 389 para orégano seco, romero fresco, salvia fresca y control, respectivamente), mientras que la densidad de los picos menores a 21.5 kDa fue superior al resto de los tratamientos; por lo tanto los extractos provenientes de las tres hierbas disminuyeron la degradación de las proteínas cárnicas.

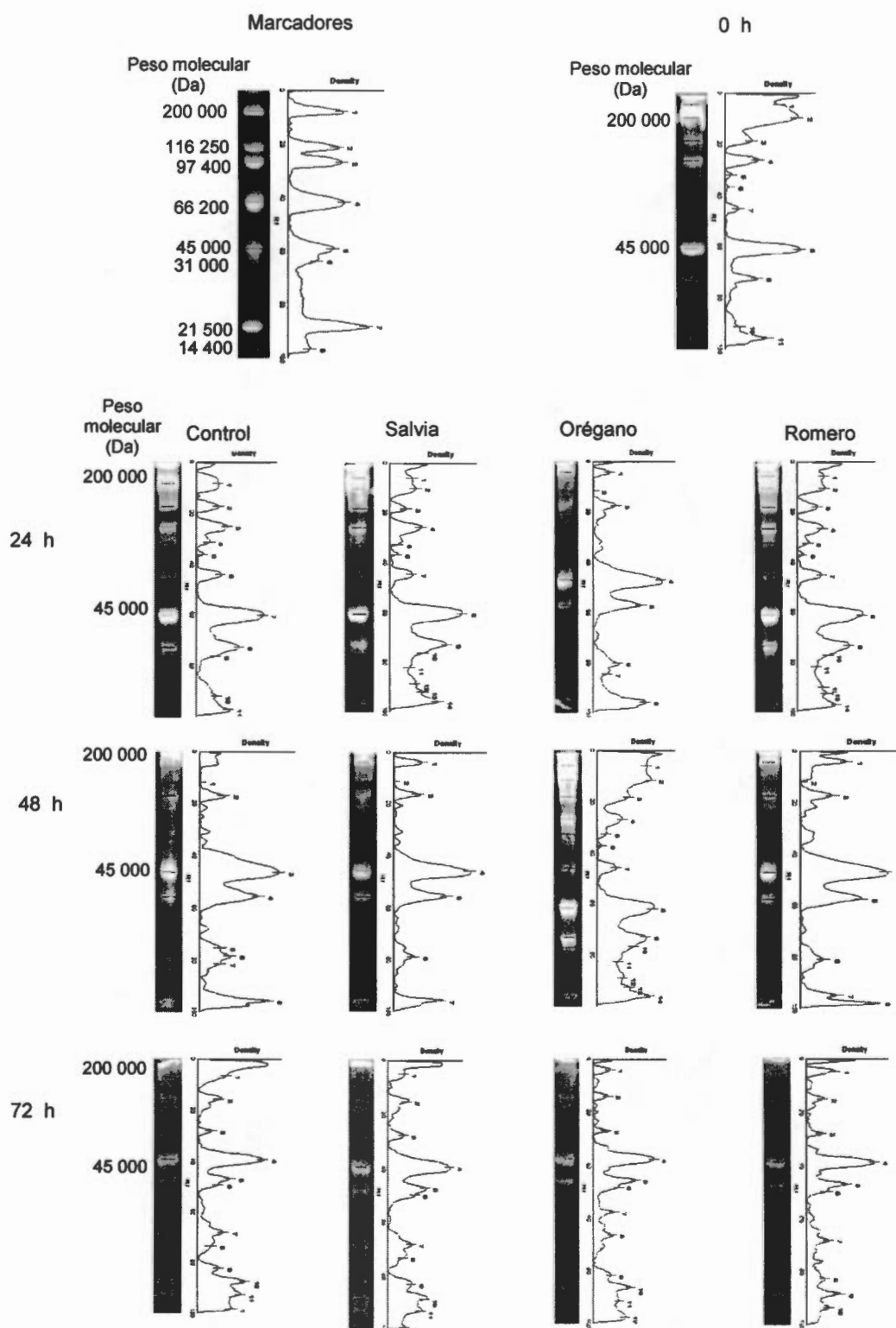


Figura 22. SDS-PAGE de proteínas miofibrilares de pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de salvia fresca, orégano seco y romero fresco, almacenadas a 20°C

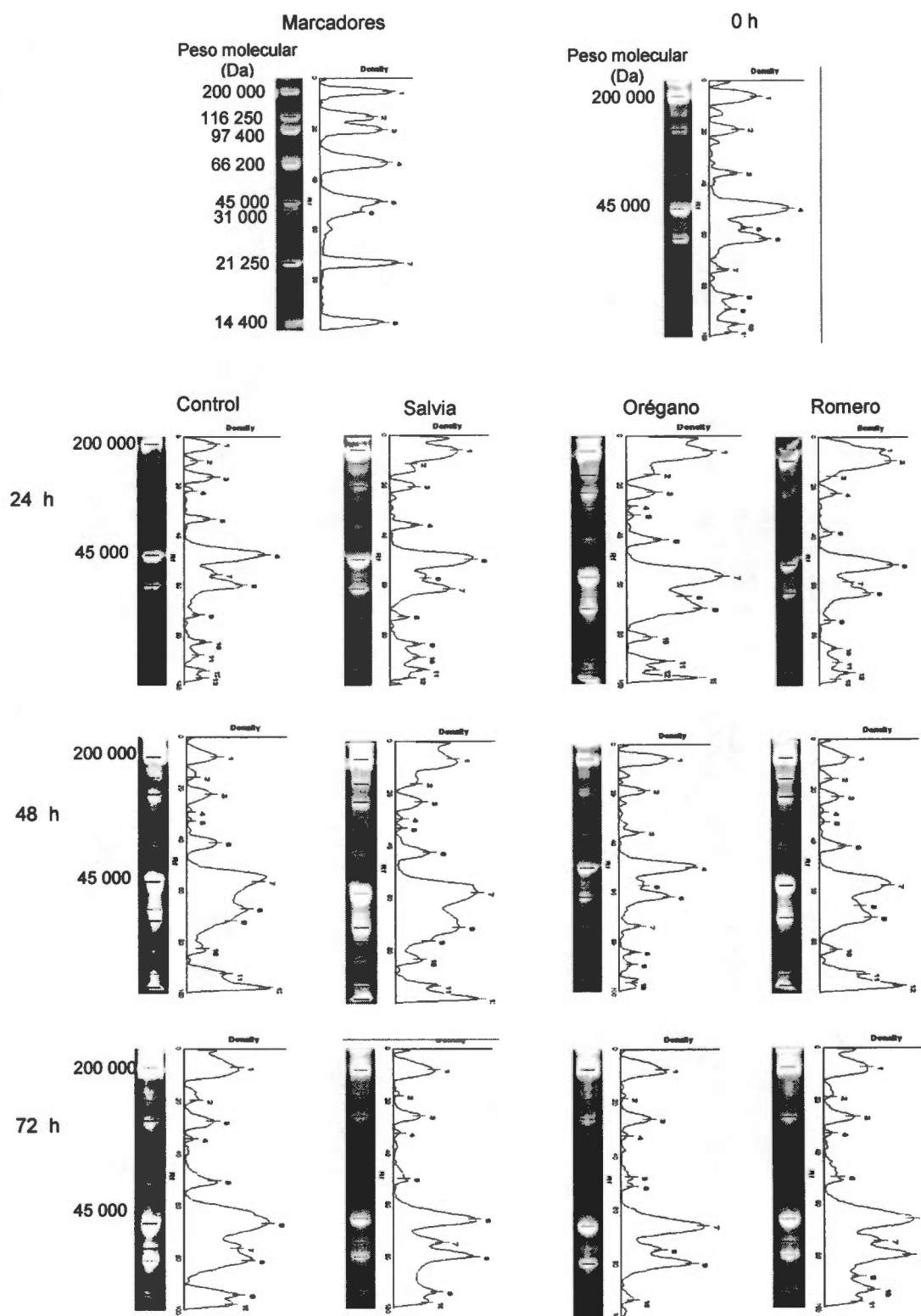


Figura 23. SDS-PAGE de proteínas miofibrilares de pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de salvia fresca, orégano seco y romero fresco, almacenadas a 4°C

6.9.3. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula se analizó considerando el diámetro medio volumen-superficie ($D[3,2]$), que indica el área de la superficie de las partículas expuesta a la fase continua por unidad de volumen de la pasta (McClements, 1999a). Se observó una distribución monodispersa del tamaño de partícula, el diámetro medio fue 150 μm (Anexo 34, pág. 177), mayor a la considerada como una emulsión verdadera ($<20 \mu\text{m}$) (Gordon y Barbut, 1992b).

6.9.3.1. Pastas con extractos etanólicos de orégano seco seco, romero fresco y salvia fresca, y sus compuestos antioxidantes (aislados del extracto y reactivos analíticos puros)

Pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca

Las muestras control tuvieron un diámetro de partícula significativamente menor a los tratamientos (Anexo 16, pág. 159); las pastas con extracto de romero fresco presentaron el tamaño de partícula mayor ($P>0.0001$), posiblemente debido a la interacción de los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos con los grupos polares de las proteínas miofibrilares (Pierpoint, 1969; Shishikura y col., 2006) que se encuentran formando la membrana alrededor de los glóbulos de grasa (Flores y Bermell, 1985; Gordon y Barbut, 1992a), lo que superó la repulsión electrostática entre gotas y provocó el entrecruzamiento de partículas cercanas, con la consecuente formación de complejos de mayor superficie (Shishikura y col., 2006). Por otro lado, la temperatura de almacenamiento no afectó significativamente el tamaño medio de partícula de las muestras (18.78 y 18.36 μm a 20°C y a 4°C, respectivamente) ($P>0.01$). El tiempo de almacenamiento mostró un efecto significativo en el diámetro de partícula, incrementándose a lo largo del estudio ($P>0.0001$), indicando que las reacciones fenol-proteína y/o quinona-proteína también aumentaron con el tiempo.

A ambas temperaturas de almacenamiento las muestras control presentaron un tamaño de partícula medio menor al resto de los tratamientos ($P>0.0001$) (Anexo 35, pág.178 y Figura 24). Flores y Bermell (1985) y McClements (1999c) reportan que en las emulsiones estables debe de contrarrestarse la tendencia espontánea a minimizar el área interfacial a través de la coalescencia; para ello debe incrementarse la interacción repulsiva entre partículas cargadas, lo que se logra disminuyendo el diámetro de partícula. Asimismo, de acuerdo a la Ley de Stokes, a menor diámetro de partícula disminuye la velocidad de

sedimentación. Por otro lado, las muestras con extracto de romero mostraron el mayor tamaño de partícula ($P>0.0001$) debido a la estructura de los compuestos fenólicos y a la concentración de éstos en los extractos. Las pastas almacenadas a 20°C mostraron mayor incremento del diámetro de partícula que las almacenadas en refrigeración, mostrando que la baja temperatura disminuyó la velocidad de reacción entre fenoles y quinonas con las proteínas.

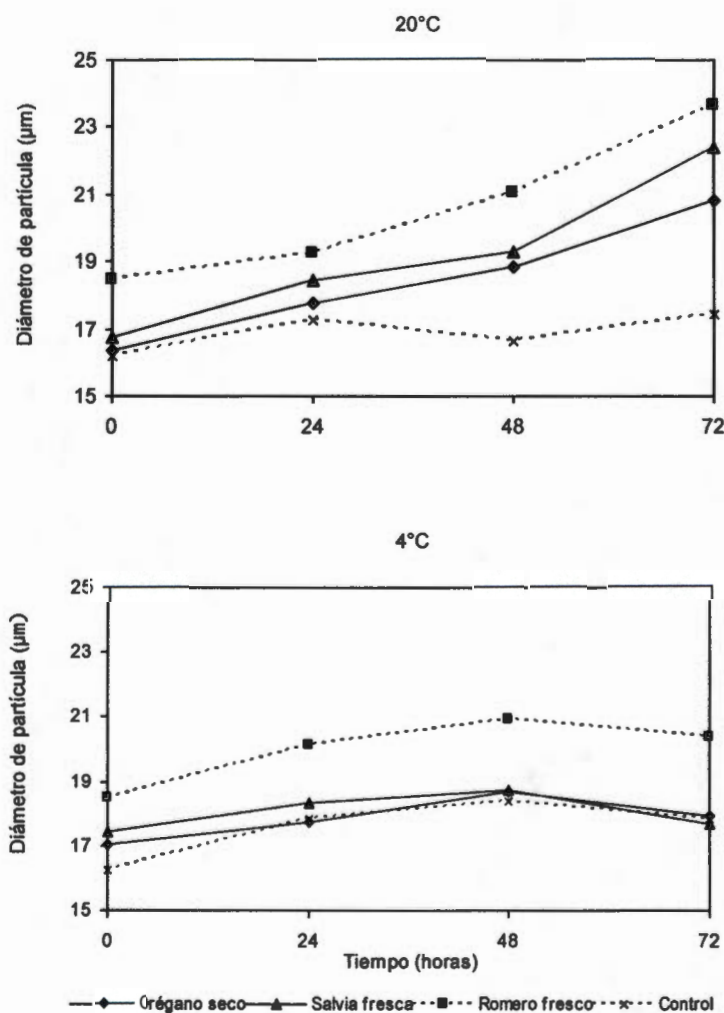


Figura 24. Diámetro de partícula en pastas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, almacenadas a 20 y 4°C

Pastas con extracto etanólico de orégano seco y sus compuestos antioxidantes

Las muestras control mostraron el menor tamaño de partícula en comparación con las

pastas añadidas con extractos etanólicos o sus compuestos antioxidantes aislados ($P>0.0001$) (Figura 25), por lo que fueron las pastas más estables (Flores y Bermell, 1985; y McClements, 1999b).

Desde el inicio del almacenamiento, las muestras con extracto etanólico de orégano seco así como aquellas con los compuestos antioxidantes aislados de este, mostraron tamaño de partícula significativamente mayor al control ($P>0.0001$), lo que indica que la interacción fenoles-proteína y/o quinonas-proteína se llevó a cabo rápidamente, información que coincide con resultados obtenidos por Shishikura y col. (2006).

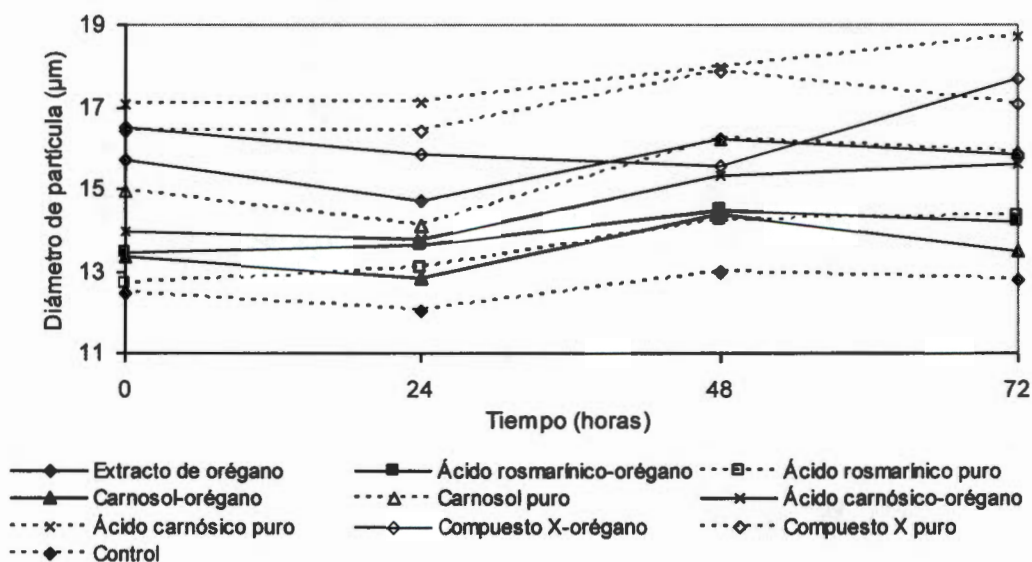


Figura 25. Diámetro de partícula en pastas añadidas con extracto etanólico de orégano seco y sus compuestos con actividad antioxidante

Entre las 0 y 72 h se notó incremento en los valores del diámetro de partícula en todos los tratamientos, aún cuando en algunos casos esta diferencia no fue significativa ($P>0.01$) (Anexo 36, pág. 179). Las pastas añadidas con ácido carnósico aislado del extracto de orégano seco, así como este compuesto puro mostraron el mayor diámetro de partícula (14.65 y 17.71 μm , respectivamente), siguiéndole en orden descendente, carnosol (13.51 y 15.28 μm , respectivamente) y ácido rosmarínico (13.93 y 13.58 μm , respectivamente), indicando que el tamaño de partícula no dependió de la concentración del compuesto que se incorporó a la pasta, en virtud de que el ácido rosmarínico fue el que se agregó en mayor cantidad (0.0655 mg/150 g pasta de ácido rosmarínico, 0.0001 mg/150 g pasta de carnosol, 0.0005 mg/150 g pasta de ácido carnósico); esto se debió posiblemente al arreglo estructural

de la molécula de cada uno de ellos, el cual influyó en la reactividad de los grupos hidroxilo presentes (Bartolomé y col., 2000). Las pastas con el compuesto X (aislado del extracto y puro) presentaron partículas de tamaño igual al observado en las pastas con ácido carnósico puro ($P>0.01$), lo que podría significar que la reactividad de los hidroxilos de su molécula fue similar a la de los grupos presentes en el ácido.

En el cromatograma del extracto de orégano seco (Figura 11, pág. 63) se observó un número de picos correspondientes a diversos compuestos, por lo que se esperaba que el tamaño de partícula de las pastas que contienen a este extracto ($15.62\ \mu\text{m}$) fuera mayor al de las pastas añadidas con los compuestos individuales; sin embargo, el diámetro fue igual al de las pastas con carnosol puro ($15.26\ \mu\text{m}$) e inferior al de las muestras con ácido carnósico puro ($17.71\ \mu\text{m}$) y con compuesto X (16.65 y $16.93\ \mu\text{m}$ aislado del extracto de orégano seco y puro, respectivamente). Lo anterior podría explicarse debido a la reactividad extremadamente elevada del anillo fenólico presente en los compuestos con actividad antioxidante, se pudieron formar enlaces intra e intermoleculares (Morrison y Boyd, 1970b) y/o llevar a cabo reacciones de óxido-reducción y de sinergismo (Hernández-Ángel y Prieto-González, 1999; Masuda y col., 2002; Del Baño y col., 2003; Vági y col., 2005) que disminuyeron la reactividad de los grupos hidroxilo y de las quinonas hacia las proteínas.

Pastas con extracto etanólico de romero fresco y sus compuestos antioxidantes

Las muestras control mostraron el diámetro de partícula medio más pequeño ($P>0.0001$), en comparación con los otros tratamientos (Anexo 36, pág. 179), indicando que fueron las muestras más estables (Flores y Bermell, 1985; McClements, 1999c). Esta diferencia fue evidente desde el inicio del período de estudio (Figura 26), por lo que la interacción fenoles-proteína y/o quinonas-proteína se llevó a cabo rápidamente (Shishikura y col., 2006).

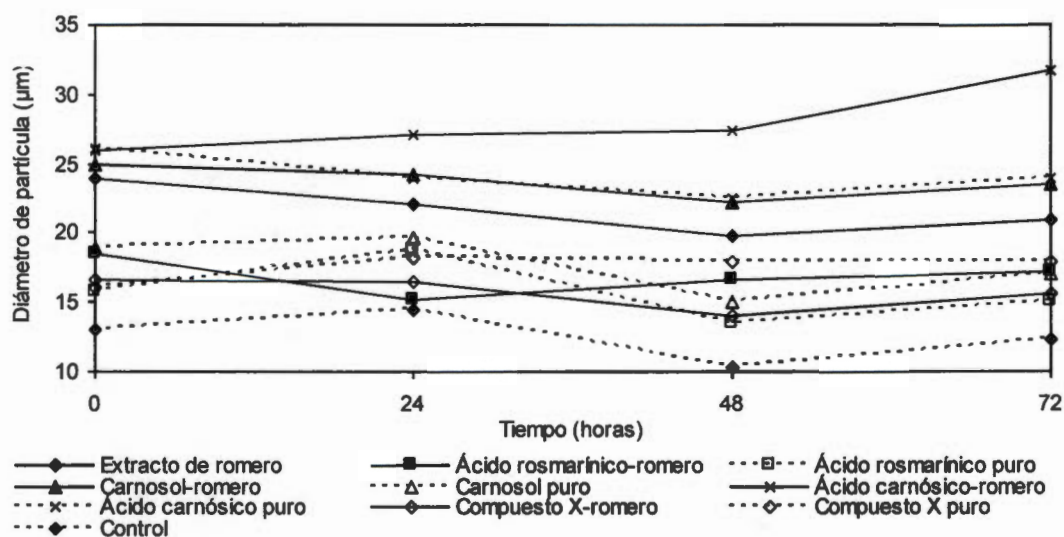


Figura 26. Diámetro de partícula en pastas añadidas con extracto etanólico de romero fresco y sus compuestos con actividad antioxidante

Las pastas con ácido carnósico aislado del extracto de romero fresco y puro mostraron el mayor tamaño de partícula medio (28.03, 24.11 µm, respectivamente) siguiendo en orden descendente las muestras con carnosol (23.66, 17.61 µm, respectivamente), compuesto X (15.72, 17.49 µm, respectivamente) y ácido rosmarínico (16.88, 15.75 µm, respectivamente), posiblemente debido al arreglo estructural de la molécula de cada uno de ellos.

Por otra parte, el diámetro medio de las partículas de las pastas con extracto de romero fresco fue menor ($P > 0.0001$) al observado en las muestras con ácido carnósico, en ambos casos la concentración del ácido carnósico incorporado fue la misma (0.308 mg/150 g pasta). Esta diferencia podría ser debida a que algunos compuestos que se encuentran en el extracto pudieron interactuar con los grupos hidroxilo del ácido carnósico, disminuyendo su reactividad hacia los grupos hidrofílicos de las proteínas (Morrison y Boyd, 1970b).

Pastas con extracto etanólico de salvia fresca y sus compuestos antioxidantes

De acuerdo con la Ley de Stokes, las muestras control fueron las más estables al presentar el diámetro de partícula medio significativamente más pequeño ($P > 0.0001$) (Flores y Bermell, 1985; McClements, 1999c) (Anexo 36, pág. 179). El mayor diámetro de partícula se observó en las pastas adicionadas con extracto etanólico de salvia fresca y sus

compuestos fenólicos, tanto aislados del extracto como puros, posiblemente debido a la interacción fenoles-proteína o quinonas-proteína con el consecuente entrecruzamiento entre gotas cercanas (Pierpoint, 1969; Shishikura y col., 2006).

Las pastas con ácido carnósico obtenido del extracto de salvia y puro mostraron mayor tamaño de partícula (17.59 y 18.04 μm , respectivamente) comparado con el carnosol (16.69 y 17.49 μm , respectivamente) y el ácido rosmarínico (15.52 y 16.63 μm , respectivamente), aunque la diferencia fue significativa solo en el caso del ácido rosmarínico obtenido del extracto de salvia fresca ($P > 0.0001$). La desigualdad en el tamaño de partícula pudo deberse al arreglo estructural de las moléculas, influyendo en la reactividad de los grupos hidroxilo. Asimismo, debido a la elevada reactividad del anillo fenólico para formar enlaces intra e intermoleculares (Morrison y Boyd, 1970b; Hernández-Ángel y Prieto-González, 1999; Masuda y col., 2002; Del Baño y col., 2003; Vági y col., 2005), el diámetro de partícula de las muestras con extracto de salvia fresca no superó el de las pastas con los compuestos antioxidantes incorporados en forma individual.

En este experimento las pastas con el compuesto X (17.29 y 17.23 μm aislado del extracto de salvia y puro, respectivamente) no presentó diferencia significativa ($P > 0.01$) con las muestras añadidas con ácido carnósico (17.59 y 18.04 μm aislado del extracto de salvia y puro, respectivamente).

Durante el tiempo de estudio disminuyó el diámetro medio de partícula en todos los tratamientos (Figura 27), debido a la degradación de la proteína que forma la membrana interfásica de los glóbulos de grasa (Signorini, 2002; García-Barrientos, 2006; Chaijan y col., 2008) y/o a cambios en la estructura tridimensional de la misma (Cheftel y col., 1989a) que ocurrieron al aumentar el tiempo de almacenamiento (Chaijan y col., 2008).

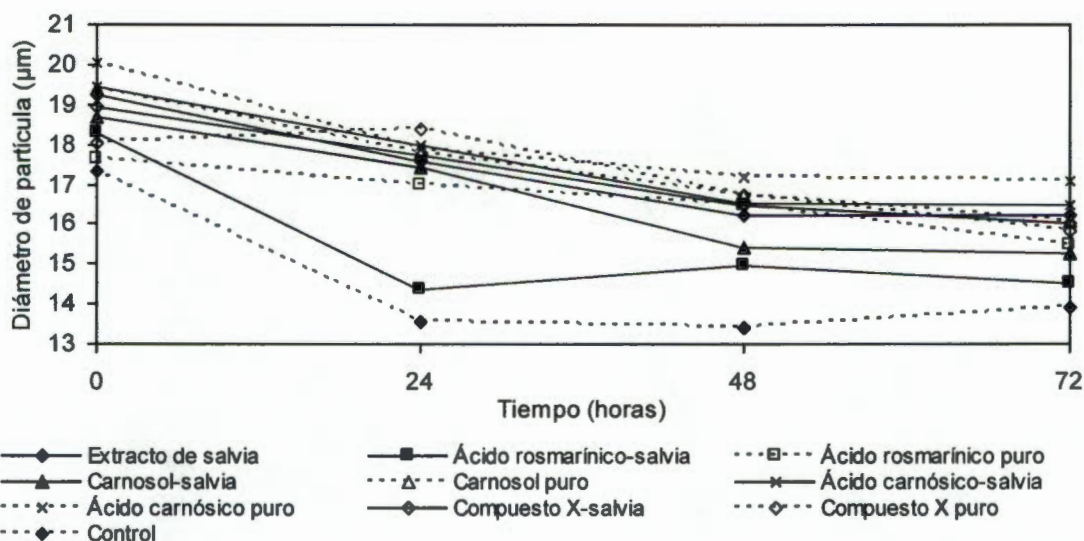


Figura 27. Diámetro de partícula en pastas añadidas con extracto etanólico de salvia fresca y sus compuestos con actividad antioxidante

6.9.3.2. Pastas con ácido carnósico y la solución de la quinona del ácido carnósico

Las muestras añadidas con ácido carnósico mostraron el diámetro de partícula mayor, mientras que las muestras control tuvieron el menor, aún cuando no se observó diferencia significativa con las pastas añadidas con la solución de la quinona del ácido carnósico (24.83, 21.11 y 19.82 μm para muestras con ácido carnósico, solución de la quinona del ácido carnósico y control, respectivamente) ($P > 0.01$) (Anexo 22, pág. 165); por lo que las muestras control fueron las más estables; además, los grupos hidroxilo del ácido carnósico y de los compuestos en la solución de la quinona, así como la quinona misma pudieron formar enlaces con los grupos hidrofílicos de las proteínas. En general, la temperatura de almacenamiento no mostró influencia significativa en el tamaño de partícula ($P > 0.01$). Por otro lado, conforme se incrementó el tiempo de estudio el tamaño de partícula disminuyó significativamente ($P > 0.0001$).

En las muestras almacenadas a 4 y a 20°C se observó una disminución en el tamaño de partícula al término del período de análisis (Anexo 37, pág. 180), debido posiblemente a la degradación de la proteína y/o a cambios en la estructura tridimensional de la misma. Sin embargo, en las muestras almacenadas a 4°C el intervalo de este cambio fue menor (Figura 28). Este comportamiento se relaciona con una menor degradación de las proteínas

miofibrilares que formaron la membrana alrededor de los glóbulos de grasa en muestras almacenadas en refrigeración, comparada con la hidrólisis de proteínas mostrada en pastas mantenidas a 20°C (Punto 6.9.2, pág. 111), como lo reportan Signorini (2002) y García-Barrientos y col. (2006).

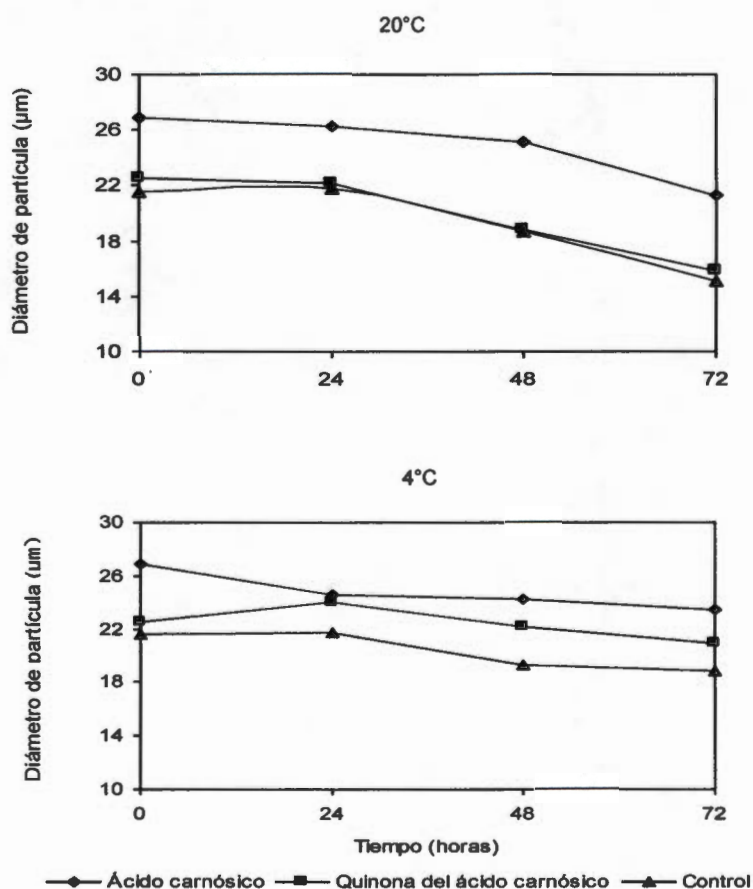


Figura 28. Diámetro de partícula en pastas añadidas con ácido carnósico y la solución de la quinona del ácido carnósico, almacenadas a 20 y 4°C

7. CONCLUSIONES

Debido a que el interés de la presente tesis se centró en la obtención de fenoles totales, se concluyó que el extracto de mayor capacidad antioxidante fue el etanólico de orégano, debido a que presentó la mayor concentración de fenoles totales. Los extractos de romero fresco en cloroformo presentaron mayor contenido de carnosol y ácido carnósico comparado con los de orégano seco y salvia fresca, mientras que la concentración más alta de ácido rosmarínico se obtuvo en el extracto de orégano seco con etanol. Sin embargo, la eficiencia en la actividad antioxidante de los extractos no dependió de su concentración de fenoles totales sino de la concentración, polaridad y estructura de los compuestos que forman parte de ellos; esta actividad antioxidante, a la vez, depende de la concentración de compuestos con actividad antioxidante (la cual estuvo en función del disolvente utilizado) y a factores como la composición química de la pasta y el tiempo y temperatura de almacenamiento de las mismas, entre otros. Bajo condiciones de bajo grado de oxidación, el extracto etanólico de orégano seco es una buena alternativa como antioxidante natural. El extracto de romero fresco en cloroformo fue más eficiente como antioxidante que los extractos etanólicos de la misma hierba.

Con respecto a los disolventes empleados, se extrajo mayor cantidad de ácido carnósico y carnosol a partir de romero fresco y de orégano fresco y seco utilizando cloroformo, mientras que se obtuvo mayor cantidad de ácido rosmarínico en extractos etanólicos de romero fresco, orégano fresco y seco y salvia fresca, si bien la concentración de ácido rosmarínico en los extractos dependió del estado de madurez de las hierbas utilizadas. Se encontró que el ácido rosmarínico fue más estable que el ácido carnósico, ya que una vez extraído de las hojas, el ácido carnósico se oxidó rápidamente para formar carnosol, entre otros compuestos. El tiempo óptimo de maceración en etanol para obtener un máximo de actividad antioxidante dependió de la hierba empleada: de 7 a 10 días para orégano seco y salvia fresca, y 3 h para romero fresco. Aunque no se determinó la composición del compuesto "X", tanto este como el ácido rosmarínico y el carnosol, aislados de los extractos etanólicos fueron estables durante el almacenamiento a 4 y 20°C. Lo mismo se observó en los extractos que contenían estos compuestos.

El color de las pastas estuvo relacionado con el grado de oxidación; a mayores

TBARS, el color varió en un intervalo mayor. Si bien la deshidratación de la superficie de la pasta varió las coordenadas de color, a mayor temperatura de almacenamiento hubo una disminución en la intensidad y contribución del rojo en la pasta, además de aumentar la luminosidad. El extracto de romero fresco en cloroformo fue el más eficiente para prevenir la oxidación de pigmentos; de igual forma, el extracto etanólico de romero fresco fue el más eficiente antioxidante comparado con los extractos de orégano seco y de salvia fresca obtenidos con el mismo disolvente. Los extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca disminuyeron en mayor medida la oxidación de oximioglobina y TBARS que los compuestos antioxidantes por separado. De éstos el ácido carnósico fue el más eficiente; este ácido presentó mayor capacidad antioxidante sobre la oximioglobina, que la quinona del ácido carnósico, si bien ésta dió lugar a la formación de compuestos con actividad antioxidante en pastas almacenadas tanto a 4 como a 20°C. El efecto del ácido carnósico y del carnosol en los extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca como antioxidantes de la oximioglobina dependió de su concentración y de la oxidación de lípidos en la pasta.

La pasta cárnica fue un fluido pseudoplástico con una distribución del tamaño de partícula monodispersa, con diámetro medio de 150 μm . El tamaño de partícula medio más pequeño se observó en las pastas a las que no se les añadieron extractos de hierbas, mientras que los compuestos fenólicos presentes en los extractos etanólicos incrementaron el diámetro medio debido posiblemente a interacción con las proteínas presentes. Sin embargo, el tamaño de partícula de estas pastas fue menor al observado en las muestras añadidas con ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico incorporados en forma individual, debido a la reactividad del anillo fenólico en los compuestos con actividad antioxidante, pudiéndose formar enlaces intra e intermoleculares y/o se llevaron a cabo reacciones de óxido-reducción y de sinergismo que disminuyeron la reactividad de los grupos hidroxilo y de las quinonas hacia las proteínas. El arreglo molecular de los compuestos antioxidantes aislados influyó en la reactividad de los grupos hidroxilo; por ello las pastas con ácido carnósico aislado de los extractos presentaron mayor diámetro de partícula que las muestras con ácido rosmarínico y con carnosol, ya que posiblemente la cercanía entre el carboxilo y los grupos hidroxilo en la molécula de ácido carnósico, incrementó la reactividad de los hidroxilos hacia los grupos hidrofílicos de las proteínas.

Los extractos etanólicos disminuyeron la degradación proteica, debido a la

interacción de los fenoles y quinonas con las proteasas para formar complejos que inhibieron y/o retardaron su actividad, los fenoles reaccionaron con las proteínas propiciando el entrecruzamiento de las mismas o se formaron derivados que indujeron cambios en la conformación de las proteínas que impidieron el acceso de las enzimas a las uniones peptídicas.

Las pastas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia de bolita fresca pueden considerarse como alimentos funcionales, debido a que contienen compuestos fenólicos con actividad antioxidante.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón-Rojo, A. D. 1992. Constitución química y bioquímica del músculo y calidad de la carne. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia, División de Posgrado e Investigación.
- Alasnier, C., Meynier, A., Viau, M. y Gandemer, G. 2000. Hydrolytic and oxidative changes in the lipids of chicken breast and thigh muscles during refrigerated storage. *Journal of Food Science*, 65(1): 9 –14.
- Almajano, M. R., Carbó, R., Delgado, M. E. y Gordon M. H. 2007. Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. *Journal of Food Science*, 72(5): 258-263.
- Ander, P. y Sonnessa, A. J. 1979a. Solubilidad de sales iónicas. Iones en solución. En: Principios de Química. Introducción a los Conceptos Teóricos. Editorial Limusa, México, pp. 275-280.
- Ander, P. y Sonnessa, A. J. 1979b. Variables que afectan las concentraciones de equilibrio. Equilibrio químico. En: Principios de Química. Introducción a los Conceptos Teóricos. Editorial Limusa, México, pp. 489-494.
- Areias, F., Valentao, P., Andrade, P. B., Ferreres, F. y Seabra, R. M. 2000. Flavonoids and phenolic acids of sage: influence of some agricultural factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12): 6081-6084.
- Argueta, A. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol. III. Instituto Nacional Indigenista, México, pp. 1222, 1223 y 1257.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Aeschbach, R. y Löliger, J. 1992. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, 22(2): 257-268.
- Bala, K., Marshall, R.T., Stringer, W. C. y Naumann, H. D. 1979. Stability of sterile beef and beef extract to protease and lipase from *Pseudomonas fragi*. *Journal of Food Science*, 44(5): 1294–1298.
- Bartolomé, B., Estrella, I. y Hernández, M. T. 2000. Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). *Journal of Food Science*, 65(4): 617-621.
- Betancourt, Y., Gutiérrez, M. A. y Betancourt, I. 2003. Red mexicana de plantas medicinales. Red de plantas medicinales de Tlaxcala. <http://www.geocities.com/florbach/>. Fecha de consulta: 01-10-2003.

- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M. C., Oliver, G y Toldrá, F. 1999. Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8): 3540-3546.
- Fernández-López, J., Sevilla, L., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., Marín, F. y Pérez-Alvárez, J. A. 2003. Evaluation of the antioxidant potential of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in cooked pork meat. *Journal of Food Science*, 68(2): 660-664.
- Fiorucci, S., Golebiowski, J., Cabrol-Bass, D. y Antonczak, S. 2007. DFT study of quercetin activated forms involved in antiradical, antioxidant, and prooxidant biological processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3): 903-911.
- Fischer, A. 1994. Tecnología de la producción y elaboración de productos cárnicos. En: Tecnología e Higiene de la Carne. Prädli, O., Fischer, A., Schmidhofer, T. y Sinell, H. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 511-625.
- Fisher, B. y Bender, A. E. 1972. Productos de consumo. En: Valor Nutritivo de los Alimentos. Centro Regional de Ayuda Técnica. Agencia para el Desarrollo Internacional (AID). Editorial Limusa Wiley, México, pp. 124-125.
- Flores, J. y Bermell, S. 1984. Estructura, composición y propiedades bioquímicas de las proteínas miofibrilares. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 24(1): 15-24.
- Flores, J. y Bermell, S. 1985. Capacidad de emulsión de las proteínas miofibrilares. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 25(4): 481-489.
- Fox, J. B. 1994. Los pigmentos de la carne. En: Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 175-198.
- Frankel, E. N. y Huang, S. W. 1996. Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(2): 201-208.
- Frankel, E. N., Huang, S. W., Aeschbach, R. y Prior, E. 1996. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1): 131-135.
- Friedman, M. y Jürgens, H. S. 2000. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6): 2101-2110.

- García-Barrientos, R. 2007. Efecto de enzimas proteolíticas endógenas y una bacteriana en la formación de emulsiones modelo a partir del músculo estriado de cazón (*Rhizopriondon terraenovae*) y cerdo. Tesis de Doctorado en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- García-Barrientos, R., Pérez-Chabela, M. L., Montejano, J. G. y Guerrero-Legarreta, I. 2006. Changes in pork and shark (*Rhizopriondon terraenovae*) protein emulsions due to exogenous and endogenous proteolytic activity. *Food Research International*, 39(9): 1012-1022.
- Gordon, A. y Barbut, S. 1992a. Effect of chloride salts on protein extraction and interfacial protein film formation in meat batters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58: 227-238.
- Gordon, A. y Barbut, S. 1992b. Mechanisms of meat batter stabilization: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(4): 299-332.
- Guadarrama, A. y Rivas, N. 1995. Purificación y caracterización cinética de la enzima polifenol oxidasa del ocumo (*Xanthosoma sagittifolium*). *Revista de la Facultad de Agronomía* (Maracay, Venezuela), 16: 65-86.
- Guerrero-Legarreta, I., Ponce-Alquicira, E. y Pérez-Chabela, M. L. 2002. Curso Práctico de Tecnología de Carne y Pescado. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México.
- Guías Empresariales. 2008. Subsecretaría para la Pequeña y Mediana Empresa. Secretaría de Economía. México.
<http://www.pyme.gob.mx/guiasempresariales/guias.asp?s=14&guia=12&giro=1&ins=228>. Fecha de consulta: 02-junio-2008
- Gutiérrez, M. A. y Betancourt, Y. 2003. El mercado de plantas medicinales en México, situación actual y perspectivas de desarrollo. En: <http://www.herbotecnia.com>. Fecha de consulta: 01-10-2003.
- Hagler, L., Coppes, R. I., y Herman, R. H. 1979. Metmyoglobin reductase. Identification and purification of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from bovine heart which reduces metmyoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 254 (14): 6505-6514.
- Hamilton, R. J. 1994. The chemistry of rancidity in foods. En: Rancidity in Foods. Allen, J. C. y Hamilton, R. J. (Eds.). Chapman and Hall, Londres, Gran Bretaña, pp. 1-21.

- Hernández-Ángel, M. y Prieto-González, E. A. 1999. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(1): 12-14.
- Hernández-Hernández, E. 2004. Efecto antioxidante de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y de salvia (*Buddleia perfoliata* Kunth) en una pasta de carne cruda de cerdo. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- Hidalgo, P. J., Ubera, J. L., Tena, M. T. y Valcárcel, M. 1998. Determination of the carnosic acid content in wild and cultivated *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7): 2624-2627.
- Ho, C. y Chen, Q. 1994. Lipids in food flavor. An overview. En: Lipids in Food Flavors. National Meeting of the American Chemical Society, Denver, Colorado, 1993, Ho, C. T. y Hartman, T. G. (Eds.), Washington, pp. 2-14.
- Hopia, A. I., Huang, S. W., Schwarz, K., German, J. B. y Frankel, E. N. 1996. Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8): 2030-2036.
- Hounscome, N., Hounscome, B., Tomos, D. y Edwards-Jones, G. 2008. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*. 73(4): 48-73.
- Huang, D., Ou, B. y Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Reviews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6): 1841-1856.
- Huang, S., Frankel, E. N., Schwarz, K., Aeschbach, R. y German, J. B. 1996. Antioxidant activity of carnosic acid and methyl carnosate in bulk oils and oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10): 2951-2956.
- Huerta, C. 2002. Orégano mexicano: oro vegetal.
http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/oregano.html. Fecha de consulta: 15-octubre-2004.
- Hultin, H. O. 1993. Características del tejido muscular. En: Química de los Alimentos. Fennema, O. R. (Ed.). Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 815-888.
- Inatani, R., Nakatani, N. y Fuwa, H. 1983. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agricultural and Biological Chemical*, 47(3): 521-528.
- Jadhav, S. J., Nikbalkar, S. S., Kulkarni, A. D. y Madhavi, D. L. 1996. Lipid oxidation in biological and food systems. En: Food Antioxidants. Technological, Toxicological and

- Health Perspectives. Madhavi, D. L., Deshpande, S. S. y Salunkhe, D. K. (Eds.), Marcel Dekker, Nueva York, pp. 5-64.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T. S. y Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10): 3954-3962.
- Kilic, B. y Richards, M. P. 2003. Lipid oxidation in poultry döner kebab: pro-oxidative and anti-oxidative factors. *Journal of Food Science*, 68(2): 686-689.
- Kroll, J. y Rawel, H. M. 2001. Reactions of plant phenols with myoglobin: influence of chemical structure of the phenolic compounds. *Journal of Food Science*, 66(1): 48-58.
- Kroll, J., Rawel, H. M. y Seidelmann, N. 2000. Physicochemical properties and susceptibility to proteolytic digestion of myoglobin-phenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5): 1580-1587.
- Kulišić, T., Dragović-Uzelac, V. y Miloš, M. 2006. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technology and Biotechnology*, 44(4): 485-492.
- Larson, R. A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27(4): 969 - 978.
- Lawrie, R. A. 1985. Chemical and biochemical constitution of muscle. En: Meat Science. Pergamon Press, Oxford, Inglaterra, pp. 43-73.
- Lee, Ch. M. 1985. Microstructure of meat emulsions in relation to fat stabilization. *Food Microstructure*. 4:63-72.
- Lee, S., Hernández, P., Djordjevic, D., Faraji, H., Hollender, R., Faustman, C. y Decker, E. A. 2006. Effect of antioxidants and cooking on stability of n-3 fatty acids in fortified meat products. *Journal of Food Science*, 71(3): 233-238.
- Leung, A. Y. y Foster, S. 1996. Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics. John Wiley and Sons, Nueva York, pp. xxxii.
- Li, C. T., Wick, M. y Marriott, N. G. 1999. Evaluation of lipid oxidation in animal fat. Research and Reviews: Meat. The Ohio State University, Circular especial 172-199. http://ohioline.osu.edu/sc172/sc172_6.html. Fecha de consulta: 20-junio-2003.
- Li-Chan, E., Nakai, S. y Wood, D. F. 1985. Relationship between functional (fat binding, emulsifying) and physicochemical properties of muscle proteins. Effects of heating, freezing, pH and species. *Journal of Food Science*, 50(4): 1034-1040.
- Lila, M. A. y Raskin, I. 2005. Health-related interactions of phytochemicals. *Journal of Food Science*, 70(1): 20-27.

- Li, S. J. y King, A. J. 1999. Structural changes of rabbit myosin subfragment 1 altered by malonaldehyde a byproduct of lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(8): 3124-3129.
- Livingston, D. J. y Brown, W. D. 1981. The chemistry of myoglobin and its reactions. *Food Technology*, 35(5): 244-251.
- Lynch, M. P. y Faustman, C. 2000. Effect of aldehyde lipid oxidation products on myoglobin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3): 600-604.
- Macrae, R., Robinson, R. K. y Sadler, M. J. (Eds). 1993a. Antioxidants. En: *Encyclopaedia of Food Science. Food Technology and Nutrition, Volumen I*, Academic Press, San Diego, California, pp. 212-237.
- Macrae, R., Robinson, R. K. y Sadler, M. J. (Eds). 1993b. Herbs. En: *Encyclopaedia of Food Science. Food Technology and Nutrition, Volumen IV*, Academic Press, San Diego, California, pp. 2334-2367.
- Macrae, R., Robinson, R. K. y Sadler, M. J. (Eds). 1993c. Phenolic compounds. En: *Encyclopaedia of Food Science. Food Technology and Nutrition, Volumen VI*, Academic Press, San Diego, California, pp. 3548-3553.
- Madhavi, D. L. y Carpenter, C. E. 1993. Aging and processing affect color, metmyoglobin reductase and oxygen consumption of beef muscles. *Journal of Food Science*, 58(5): 939-942.
- Madhavi, D. L. y Salunkhe, D. K. 1996. Toxicological aspects of food antioxidants. En: *Food Antioxidants. Technological, Toxicological and Health Perspectives*. Madhavi, D. L., Deshpande, S. S. y Salunkhe, D. K. (Eds.), Marcel Dekker, Nueva York, pp. 267-359.
- Madhavi, D. L., Singhal, R. S. y Kulkarni, P. R. 1996. Technological aspects of food antioxidants. En: *Food Antioxidants. Technological, Toxicological and Health Perspectives*, Marcel Dekker, Nueva York, pp. 159-266.
- Madsen, H. L. y Bertelsen, G. 1995. Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 271-277.
- Martínez, M. 1979. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, p. 788.
- Masuda, T., Inaba, Y., Maekawa, T., Takeda, Y., Tamura, H. y Yamaguchi, H. 2002. Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21): 5863-5869.

- Masuda, T., Inaba, Y. y Takeda, Y. 2001. Antioxidant mechanism of carnosic acid: structural identification of two oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11): 5560-5565.
- McClements, D. J. 1999a. Context and Background. En: Food Emulsions. Principles, Practice, and Techniques, CRC Press. Boca Ratón, Florida, pp. 1-16.
- McClements, D. J. 1999b. Emulsion formation. En: Food Emulsions. Principles, Practice, and Techniques, CRC Press. Boca Ratón, Florida, pp. 161-184.
- McClements, D. J. 1999c. Emulsion rheology. En: Food Emulsions. Principles, Practice, and Techniques, CRC Press. Boca Ratón, Florida, pp. 235-266.
- McClements, D. J. y Decker, E. A. 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65(8): 1270-282.
- Medallion Laboratories. 2004. Reference Daily Intakes/Daily Reference Values. Minneapolis, Minn.
- Merkel, R. A. 1994a. Carbohidratos. Química de los tejidos animales. En: Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 103-109.
- Merkel, R. A. 1994b. Compuestos inorgánicos. Química de los tejidos animales. En: Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 111-123.
- Min, B., Nam, K. C., Cordray, J y Ahn, D. U. 2008. Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats. *Journal of Food Science*, 73(6): 439-446.
- Minor-Pérez, H. 1998. Cambios en Parámetros Fisicoquímicos Relacionados con la Calidad de la Carne de Cerdo Sometida a Fermentación Láctica como Método de Bioconservación. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- Montgomery, D. C. 1991. Experimentos con un solo factor: análisis de variancia. En: Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica, México, pp. 45-84.
- Morrison, R. T. y Boyd, R. N. 1970a. Estructura y propiedades. En: Química Orgánica. Fondo Educativo Interamericano, México, pp. 3-41.
- Morrison, R. T. y Boyd, R. N. 1970b. Fenoles. En: Química Orgánica. Fondo Educativo Interamericano, México, pp. 808-836.

- Morrison, R. T. y Boyd, R. N. 1970c. Metano. En: Química Orgánica. Fondo Educativo Interamericano, México, pp. 42-75.
- Munné-Bosch, S. y Alegre, L. 2001. Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. *Plant Physiology*, 125: 1094-1102.
- Nam, D. C., Anh, D. U. y Jo, C. 2001. Lipid oxidation, color, volatiles, and sensory characteristics of aerobically packaged and irradiated pork with different ultimate pH. *Journal of Food Science*, 66(8): 1225-129.
- Nautiyal, C. S., Govindarajan, R., Lavania, M. y Pushpangadan, P. 2008. Novel mechanism of modulating natural antioxidants in functional foods: involvement of plant growth promoting Rhizobacteria NRRL B-30488. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12): 4474-4481.
- Nawar, W. W. 1993. Lípidos. En: Química de los Alimentos. Fennema, O. R. (Ed.) Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 157-274.
- Nelson, K. A. y Labuza, T. P. 1991. Relationship between water and lipid oxidation rates. En: Lipid oxidation in food. American Chemical Society at the Fourth Chemical Congress of North America, St. Angelo, A. J. (Ed.), Washington, pp. 93-103.
- Niven Jr., C. F. 1994. Microbiología y parasitología de la carne. En: Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 199-237.
- NOM-213-SSA1-2002. 2005. Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Secretaría de Salud. Estados Unidos Mexicanos.
- Nuchi, C. D., Hernandez, P., McClements, D. J. y Decker, E. A. 2002. Ability of lipid hydroperoxides to partition into surfactant micelles and alter lipid oxidation rates in emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19): 5445-5449.
- Ockerman, H. W. 1980. Quality Control of Post-mortem Muscle Tissue. Meat and Additives Analysis. Volumen 1. Department of Animal Science, The Ohio State University and the Ohio Agricultural Research and Development Center, Columbus, Ohio.
- O'Grady, M. N., Monahan, F. J. y Brunton, N. P. 2001. Oxymyoglobin oxidation and lipid oxidation in bovine muscle – mechanistic studies. *Journal of Food Science*, 66(3): 386-392.

- Okamura, N., Fujimoto, Y., Kuwabara, S. y Yagi, A. 1994. High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 679: 381-386.
- Pearson, A. M. 1994. La función muscular y los cambios postmortem. En: Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 139-173.
- Pearson, A. M. y Tauber, F. W. 1984. Processed Meats. AVI Publishing, Wesport, Connecticut, pp. 19-39 y 351-353.
- Pérez-Alvarez, J. A., Fernández-López, J. y Sayas-Barberá, E. 2000. Fundamentos físicos, químicos, ultraestructurales y tecnológicos en el color de la carne. En: Nuevas Tendencias en la Tecnología e Higiene de la Industria Cárnica. Rosmini, M. R., Pérez-Alvarez, J. A. y Fernández-López, J. (Eds). Universidad Miguel Angel, España y Universidad del Litoral, Argentina. pp. 51-71.
- Pérez-Chabela, M. L. Guerrero-Legarreta, I. y Ponce-Alquicira, E. 2000. Maduración. Enzimología de la maduración. Bioquímica del músculo. En: Nuevas Tendencias en la Tecnología e Higiene de la Industria Cárnica. Rosmini, M. R., Pérez-Alvarez, J. A. y Fernández-López, J. (Eds). Universidad Miguel Angel, España y Universidad del Litoral, Argentina. pp. 23-30.
- Petersen, M. y Simmonds, M. S. J. 2003. Molecules of interest. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 62: 121-125.
- Pierpoint, W. S. 1969. o-Quinones formed in plant extracts. *Biochemical Journal*, 112:609-616.
- Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Überegger, E y Conte, L. C. 2002. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(14): 1645-1651.
- Price, J. F. y Schweigert, B. S. 1994. Introducción. En: Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 1-9.
- Quijano, C. 2003. Teoría del color (Parte II). <http://www.octubre.com>. Fecha de consulta: 10-junio-224.
- Quintín, J. 1990. Tablas de Valores Nutritivos para Cálculos Dietéticos. Editorial Méndez Cervantes, México, pp. 5, 8 y 23.

- Rababah, T. H., Hettiarachchy, N. S. y Horax, R. 2004. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gota kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and *tert*-butylhydroquinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16): 5183-5186.
- Rajalakshmi, D. y Narasimhan, S. 1996. Food antioxidants: Sources and methods of evaluation. En: Food Antioxidants. Technological, Toxicological and Health Perspectives. Marcel Dekker, Nueva York, pp. 65-158.
- Ranken, M. D. 1994. Rancidity in meats. En: Rancidity in Foods. Allen, J. C. y Hamilton, R. J. (Eds.), Chapman and Hall, Londres, Gran Bretaña, pp. 191-202.
- Rhee, K. S. 1992. Fatty acids in meats and meat products. En: Fatty Acids in Foods and their Health Implications. Ching Kuang Chow (Ed.), Marcel Dekker, Nueva York, pp. 65-93.
- Rhyu, H. Y. 1979. Gas Chromatographic characterization of oregano and other selected spices of the labiate family. *Journal of Food Science*, 44(5): 1373-1378.
- Rižnar, K., Čelan, S., Knez, Z., Škerget, M., Bauman, D y Glaser, R. 2006. Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary extract in chicken frankfurters. *Journal of Food Science*, 71(7): 425-429.
- Rizvi, S. S. H. 1981. Rheological properties of comminuted meat systems. *Food Technology*, 35(5): 238-243.
- Robbins, F. M., Walter, J. E., Cohen, S. H. y Chatterjee, S. 1979. Action of proteolytic enzymes on bovine myofibrils. *Journal of Food Science*, 44(6): 1672-1677.
- Robbins, R. J. 2003. Phenolic acids in foods: a overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10): 2866-2887.
- Rodrigo-García, J., Álvarez-Padilla, E., A. de la Rosa, L. Mercado-Mercado, G. y Herrera-Duenez, B. 2006. Valoración de la capacidad antioxidante y actividad polifenol oxidasa en duraznos de diferentes áreas de producción. I Simposio Ibero-Americano de vegetales frescos cortados, San Pedro, SP, Brasil, pp. 111-116.
- Rosmini, M. R. y Schneider, R. 2000. Elaboración de embutidos: consideraciones higiénicas y tecnológicas. En: Nuevas Tendencias en la Tecnología e Higiene de la Industria Cárnica. Rosmini, M. R., Pérez-Alvarez, J. A. y Fernández-López, J. (Eds). Universidad Miguel Ángel, España y Universidad del Litoral, Argentina. pp. 165-177.
- Rossell, J. B. 1994. Measurement of rancidity. En: Rancidity in Foods. Allen, J. C. y Hamilton, R. J. (Eds.). Chapman and Hall, Londres, Gran Bretaña, pp. 22-53.

- Rust, R. E. 1994. Productos embutidos. En: Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 415-439.
- SAGARPA. 2008.
<http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/Monografias/Espicias/Oregano.html>.
Fecha de consulta: 02-junio-2008.
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrescano, G., Beltrán, J. A. y Roncales, P. 2003. Antioxidant action of borage, rosemary, oregano and ascorbic acid in beef patties packaged in modified atmosphere. *Journal of Food Science*, 68(1): 339-344.
- Schmidt, G. R. 1994. Comportamiento funcional de los componentes de la carne durante el procesado. En: Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 377-391.
- Schmidt, R. F., Mawson, R. F. y Siegel, D. G. 1981. Functionality of a protein matrix in comminuted meat products. *Food Technology*. 35(5): 235-237.
- Schweigert, B. S. 1994. Contenido en nutrientes y valor nutritivo de la carne y los productos cárnicos. En: Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 249-277.
- Seydim, A. C., Guzel-Seydim, Z. B., Acton, J. C. y Dawson, P. L. 2006. Effects of rosemary extract and sodium lactate on quality of vacuum-packaged ground ostrich meat. *Journal of Food Science*, 1(71): 71-76.
- Shahidi, F. 2004. Functional foods: their role in health promotion and disease prevention. *Journal of Food Science*. 69(5): 146-149.
- Shahidi, F., Janitha, P. K. y Wanasundara, P. D. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1): 67-103.
- Shahidi, F. y Pegg, R. B. 1994. Hexanal as an indicator of the flavor deterioration of meat and meat products. En: Lipids in Food Flavors. National Meeting of the American Chemical Society, Denver, Colorado, pp. 256-279.
- Shishikura, Y., Khokhar, S. y Murray, B. S. 2006. Effects of tea polyphenols on emulsification of olive oil in a small intestine model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5): 1906-1913.
- Shriner, R. L., Fuson, R. C. y Curtin, D. Y. 2004. Comportamiento de solubilidad. En: Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos. Editorial Limusa, México, pp. 81-102.

- Signorini, M. 2002. Fermentación Láctica y su Efecto sobre las Propiedades Funcionales de la Carne. Tesis de Doctorado en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- Smith, D. M. 1988. Meat proteins: functional properties in comminuted meat products. *Food Technology*, 42(4): 116-121.
- Spainer, A. M., Miller, J. A. y Bland, J. M. 1991. Lipid oxidation. Effect on meat proteins. En: *Lipid Oxidation in Food*. American Chemical Society at the Fourth Chemical Congress of North America, St. Angelo, A. J. (Ed.), Washington, pp. 104-119.
- Stewart, J. M. 1990. Free acids enhance the oxidation of oxymyoglobin and inhibit the peroxidase activity of metmyoglobin. *Biochemistry and Cell Biology*, 68: 1096-1102.
- Townsend, W. E. y Olson, D. G. 1994. Las carnes curadas y su procesado. En: *Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos*. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 393-414.
- Urbain, W. M. y Campbell, J. F. 1994. La conservación de la carne. En: *Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos*. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 337-375.
- Vági, E., Rapavi, E., Hadolin, M., Vásárhelyiné-Perédi, K., Balázs, A., Blázovics, A. y Simándi, B. 2005. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum mejorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1): 17-21.
- Verde-Calvo, J. R. y Orozco-Villafuerte, J. 2005. Cromatografía de gases: Principios básicos y manejo del equipo. Curso teórico-práctico. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México.
- Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., La Voie, E. J., Huang, T. C. y Ho, C. T. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12): 4869-4873.
- Wellwood, C. R. L. y Cole, R. A. 2004. Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.) accessions for optimization of antioxidant yield. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20): 6101-6107.
- Wisner-Pedersen, J. 1994. Agua. Química de los tejidos animales. En: *Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos*. Price, J. F. y Schweigert, B. S. (Eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 125-138.
- Xiong, Y. L., Blanchard, S. P. 1994. Myofibrillar protein gelation: viscoelastic changes related to heating procedures. *Journal of Food Science*, 59(4):734-738.

- Yang, W. T. y Min, D. B. 1994. Chemistry of singlet oxygen oxidation of foods. En: Lipids in Food Flavors. National Meeting of the American Chemical Society, Denver, Colorado, 1993, Ho, C. T. y Hartman, T. G. (Eds.), Washington, pp. 14-29.
- Yasosky, J. J., Aberle, E. D., Peng, I. C., Mills, E. W. y Judge, M. D. 1984. Effects of pH and time of grinding on lipid oxidation of fresh ground pork. *Journal of Food Science*, 49(6): 1510-1512.
- Yin, M. C., y Cheng, W. S. 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Science*, 63: 23-28.
- Yin, M. C. y Faustman, C. 1993. Influence of temperature, pH and phospholipid composition upon the stability of myoglobin and phospholipid: a liposome model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(6): 853-857.
- Yin, M. C., Faustman, C., Riesen, J. W. y Williams, S. N. 1993. α -tocopherol and ascorbate delay oxymyoglobin and phospholipid oxidation *in vitro*. *Journal of Food Science*, 58(6): 1273-1281.
- Yu, L., Scanlin, L., Wilson, J. y Schmidt, G. 2002. Rosemary extracts as inhibitors of lipid oxidation and color change in cooked turkey products during refrigerated storage. *Journal of Food Science*, 67(2): 582-585.
- Zheng, W. y Wang, S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11): 5165-5170.
- Zhu, L. G. y Brewer, M. S. 1998. Metmyoglobin reducing capacity of fresh normal, PSE and DFD pork during retail display. *Journal of Food Science*, 63(3): 390-393.

ANEXOS

Anexo 1. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración del “compuesto X” en el extracto etanólico de orégano seco

Concentración del compuesto X como reactivo analítico (unidades de absorbancia)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0795 ^{Aa(1)(3)} ± 0.010 ⁽²⁾	0.0725 ^{Aa} ± 0.008
24	0.0795 ^{Aa} ± 0.010	0.0700 ^{Aa} ± 0.006
48	0.0799 ^{Aa} ± 0.011	0.0729 ^{Aa} ± 0.007
72	0.0787 ^{Aa} ± 0.010	0.0734 ^{Aa} ± 0.005
Media	0.0794 ^A ± 0.010	0.0722 ^B ± 0.006

Concentración del compuesto X aislado del extracto de orégano seco (unidades de absorbancia)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0807 ^{Aa(1)(3)} ± 0.009 ⁽²⁾	0.0805 ^{Aa} ± 0.008
24	0.0783 ^{Aa} ± 0.014	0.0765 ^{Aa} ± 0.007
48	0.0811 ^{Aa} ± 0.009	0.0761 ^{Aa} ± 0.004
72	0.0815 ^{Aa} ± 0.005	0.0784 ^{Aa} ± 0.003
Media	0.0804 ^A ± 0.009	0.0779 ^A ± 0.006

Concentración del extracto de orégano seco como compuesto X (unidades de absorbancia)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.1286 ^{Aa(1)(3)} ± 0.029 ⁽²⁾	0.1396 ^{Aa} ± 0.007
24	0.1272 ^{Aa} ± 0.032	0.1391 ^{Aa} ± 0.001
48	0.1223 ^{Aa} ± 0.026	0.1412 ^{Aa} ± 0.0007
72	0.1242 ^{Aa} ± 0.028	0.1423 ^{Aa} ± 0.001
Media	0.1256 ^B ± 0.028	0.1407 ^A ± 0.004

⁽¹⁾Media de 12 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencia entre temperaturas, y las minúsculas dentro de cada temperatura)

Anexo 2. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración del "compuesto X" en el extracto etanólico de romero fresco

Concentración del compuesto X como reactivo analítico (unidades de absorbancia)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0821 ^{Aa(1)(3)} ± 0.005 ⁽²⁾	0.0812 ^{Aa} ± 0.004
24	0.0826 ^{Aa} ± 0.003	0.0813 ^{Aa} ± 0.001
48	0.0794 ^{Aa} ± 0.007	0.0816 ^{Aa} ± 0.001
72	0.0793 ^{Aa} ± 0.007	0.0797 ^{Aa} ± 0.016
Media	0.0809 ^A ± 0.006	0.0809 ^A ± 0.010

Concentración del compuesto X aislado del extracto de romero fresco (unidades de absorbancia)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0769 ^{Aa(1)(3)} ± 0.008 ⁽²⁾	0.0798 ^{Aa} ± 0.010
24	0.0801 ^{Aa} ± 0.005	0.0800 ^{Aa} ± 0.006
48	0.0810 ^{Aa} ± 0.005	0.0799 ^{Aa} ± 0.001
72	0.0793 ^{Aa} ± 0.006	0.0725 ^{Aa} ± 0.008
Media	0.0793 ^A ± 0.006	0.0780 ^A ± 0.008

Concentración del extracto de romero fresco como compuesto X (unidades de absorbancia)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.2678 ^{Aa(1)(3)} ± 0.018 ⁽²⁾	0.2621 ^{Aa} ± 0.006
24	0.2546 ^{Aa} ± 0.018	0.2672 ^{Aa} ± 0.007
48	0.2673 ^{Aa} ± 0.016	0.2679 ^{Aa} ± 0.009
72	0.2748 ^{Aa} ± 0.017	0.2712 ^{Aa} ± 0.008
Media	0.2661 ^A ± 0.018	0.2671 ^A ± 0.008

⁽¹⁾Media de 12 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencia entre temperaturas, y las minúsculas dentro de cada temperatura)

Anexo 3. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración del “compuesto X” en el extracto etanólico de salvia fresca

Concentración del compuesto X como reactivo analítico (unidades de absorbancia)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0701 ^{As(1)(3)} ± 0.007 ⁽²⁾	0.0749 ^{As} ± 0.005
24	0.0656 ^{Bs} ± 0.002	0.0785 ^{As} ± 0.005
48	0.0649 ^{Bs} ± 0.002	0.0790 ^{As} ± 0.005
72	0.0699 ^{Bs} ± 0.006	0.0824 ^{As} ± 0.005
Media	0.0676 ^B ± 0.006	0.0787 ^A ± 0.006

Concentración del compuesto X aislado del extracto de salvia fresca (unidades de absorbancia)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0824 ^{As(1)(3)} ± 0.001 ⁽²⁾	0.0778 ^{Bs} ± 0.003
24	0.0757 ^{As} ± 0.009	0.0774 ^{As} ± 0.005
48	0.0759 ^{As} ± 0.009	0.0773 ^{As} ± 0.006
72	0.0813 ^{As} ± 0.004	0.0809 ^{As} ± 0.004
Media	0.0788 ^A ± 0.007	0.0783 ^A ± 0.005

Concentración del extracto de salvia fresca como compuesto X (unidades de absorbancia)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.2538 ^{As(1)(3)} ± 0.003 ⁽²⁾	0.2497 ^{Bs} ± 0.0007
24	0.2497 ^{Bs} ± 0.004	0.2508 ^{Ab} ± 0.001
48	0.2519 ^{Asb} ± 0.003	0.2490 ^{Ab} ± 0.002
72	0.2541 ^{As} ± 0.007	0.2552 ^{As} ± 0.004
Media	0.2523 ^A ± 0.005	0.2511 ^A ± 0.003

⁽¹⁾Media de 12 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencia entre temperaturas, y las minúsculas dentro de cada temperatura)

Anexo 4. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de ácido rosmarínico en el extracto etanólico de orégano seco

Concentración de ácido rosmarínico como reactivo analítico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0032 ^{Aa(1)(3)} ± 0.0002 ⁽²⁾	0.0034 ^{Aa} ± 0.0004
24	0.0032 ^{Aa} ± 0.0003	0.0034 ^{Aa} ± 0.0002
48	0.0033 ^{Aa} ± 0.0003	0.0035 ^{Aa} ± 0.0002
72	0.0033 ^{Aa} ± 0.0003	0.0035 ^{Aa} ± 0.0002
Media	0.0033 ^B ± 0.0003	0.0035 ^A ± 0.0003

Concentración de ácido rosmarínico aislado del extracto de orégano seco (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0035 ^{Ba(1)(3)} ± 0.00007 ⁽²⁾	0.0039 ^{Aa} ± 0.0002
24	0.0036 ^{Aab} ± 0.0001	0.0038 ^{Aa} ± 0.0001
48	0.0037 ^{Ba} ± 0.00009	0.0038 ^{Aa} ± 0.0001
72	0.0037 ^{Aa} ± 0.00005	0.0038 ^{Aa} ± 0.0001
Media	0.0036 ^B ± 0.0001	0.0038 ^A ± 0.0001

Concentración del extracto de orégano seco como ácido rosmarínico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0041 ^{Aa(1)(3)} ± 0.0009 ⁽²⁾	0.0045 ^{Aab} ± 0.0002
24	0.0041 ^{Aa} ± 0.0001	0.0044 ^{Ab} ± 0.00004
48	0.0039 ^{Aa} ± 0.0008	0.0045 ^{Aab} ± 0.00004
72	0.0040 ^{Aa} ± 0.0009	0.0046 ^{Aa} ± 0.00004
Media	0.0040 ^B ± 0.0009	0.0045 ^A ± 0.0001

⁽¹⁾Media de 12 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencia entre temperaturas, y las minúsculas dentro de cada temperatura).

Anexo 5. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de ácido rosmarínico en el extracto etanólico de romero fresco

Concentración de ácido rosmarínico como reactivo analítico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0020 ^{Ba(1)(3)} ± 0.0002 ⁽²⁾	0.0025 ^{Ab} ± 0.0003
24	0.0024 ^{Aa} ± 0.0004	0.0026 ^{Ab} ± 0.0002
48	0.0021 ^{Ba} ± 0.0005	0.0026 ^{Ab} ± 0.0002
72	0.0025 ^{Ba} ± 0.0005	0.0027 ^{Aa} ± 0.0002
Media	0.0022 ^B ± 0.0005	0.0026 ^A ± 0.0003

Concentración de ácido rosmarínico aislado del extracto de romero fresco (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0024 ^{Ba(1)(3)} ± 0.0002 ⁽²⁾	0.0027 ^{Aa} ± 0.00007
24	0.0024 ^{Ba} ± 0.0002	0.0028 ^{Aa} ± 0.0001
48	0.0024 ^{Aa} ± 0.0006	0.0029 ^{Aa} ± 0.0002
72	0.0028 ^{Aa} ± 0.0007	0.0029 ^{Aa} ± 0.0001
Media	0.0025 ^B ± 0.0005	0.0028 ^A ± 0.0002

Concentración del extracto de romero fresco como ácido rosmarínico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0085 ^{Aa(1)(3)} ± 0.0005 ⁽²⁾	0.0083 ^{Aa} ± 0.0002
24	0.0081 ^{Aa} ± 0.0005	0.0085 ^{Aa} ± 0.0002
48	0.0085 ^{Aa} ± 0.0005	0.0085 ^{Aa} ± 0.0002
72	0.0087 ^{Aa} ± 0.0005	0.0086 ^{Aa} ± 0.0002
Media	0.0085 ^A ± 0.0006	0.0085 ^A ± 0.0002

⁽¹⁾Media de 12 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencia entre temperaturas, y las minúsculas dentro de cada temperatura).

Anexo 6. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de ácido rosmarínico en el extracto etanólico de salvia fresca

Concentración de ácido rosmarínico como reactivo analítico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	$0.0012^{Aa(1)(3)} \pm 0.0001^{(2)}$	$0.0011^{Ab} \pm 0.00004$
24	$0.0012^{Aa} \pm 0.00007$	$0.0012^{Aab} \pm 0.00004$
48	$0.0012^{Aa} \pm 0.0001$	$0.0012^{Aab} \pm 0.00004$
72	$0.0011^{Aa} \pm 0.0001$	$0.0012^{Aa} \pm 0.00008$
Media	$0.0012^A \pm 0.0001$	$0.0012^A \pm 0.00006$

Concentración de ácido rosmarínico aislado del extracto de salvia fresca (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	$0.0011^{Aa(1)(3)} \pm 0.00005^{(2)}$	$0.0010^{Ab} \pm 0$
24	$0.0011^{Aa} \pm 0.00007$	$0.0010^{Ab} \pm 0.00003$
48	$0.0011^{Aa} \pm 0.00006$	$0.0012^{Aa} \pm 0.0001$
72	$0.0012^{Aa} \pm 0.0002$	$0.0012^{Aa} \pm 0.0001$
Media	$0.0011^A \pm 0.0001$	$0.0011^A \pm 0.0001$

Concentración del extracto de salvia fresca como ácido rosmarínico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	$0.0081^{Aa(1)(3)} \pm 0.0001^{(2)}$	$0.0079^{Bc} \pm 0.00004$
24	$0.0079^{Ab} \pm 0.0001$	$0.0080^{Ab} \pm 0.00004$
48	$0.0080^{Aab} \pm 0.0001$	$0.0079^{Abc} \pm 0.00004$
72	$0.0081^{Aa} \pm 0.0002$	$0.0081^{Aa} \pm 0.0001$
Media	$0.0080^A \pm 0.0001$	$0.0080^A \pm 0.0001$

⁽¹⁾Media de 12 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencia entre temperaturas, y las minúsculas dentro de cada temperatura)

Anexo 7. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de carnosol en el extracto etanólico de orégano seco

Concentración de carnosol como reactivo analítico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0039 ^{Aa(1)(3)} ± 0.0003 ⁽²⁾	0.0038 ^{Aa} ± 0.0003
24	0.0040 ^{Aa} ± 0.0003	0.0038 ^{Aa} ± 0.0004
48	0.0041 ^{Aa} ± 0.0003	0.0039 ^{Aa} ± 0.0004
72	0.0041 ^{Aa} ± 0.0003	0.0039 ^{Aa} ± 0.0002
Media	0.0040 ^A ± 0.0003	0.0039 ^A ± 0.0003

Concentración de carnosol aislado del extracto de orégano seco (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0038 ^{Aa(1)(3)} ± 0.0004 ⁽²⁾	0.0038 ^{Aa} ± 0.00008
24	0.0037 ^{Aa} ± 0.0004	0.0039 ^{Aa} ± 0.0002
48	0.0038 ^{Aa} ± 0.0005	0.0041 ^{Aa} ± 0.0003
72	0.0038 ^{Aa} ± 0.0004	0.0041 ^{Aa} ± 0.0002
Media	0.0037 ^B ± 0.0004	0.0040 ^A ± 0.0002

Concentración del extracto de orégano seco como carnosol (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0040 ^{Ba(1)(3)} ± 0.0001 ⁽²⁾	0.0044 ^{Ac} ± 0.0001
24	0.0043 ^{Ab} ± 0.0001	0.0043 ^{Ac} ± 0.00008
48	0.0044 ^{Bb} ± 0.00005	0.0046 ^{Ab} ± 0.00008
72	0.0047 ^{Aa} ± 0.0001	0.0049 ^{Aa} ± 0.0002
Media	0.0043 ^B ± 0.0002	0.0046 ^A ± 0.0002

⁽¹⁾Media de 12 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencia entre temperaturas, y las minúsculas dentro de cada temperatura)

Anexo 8. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de carnosol en el extracto etanólico de romero fresco

Concentración de carnosol como reactivo analítico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0055 ^{Ba(1)(3)} ± 0.0004 ⁽²⁾	0.0065 ^{Aa} ± 0.0012
24	0.0055 ^{Aa} ± 0.0005	0.0063 ^{Aa} ± 0.0008
48	0.0057 ^{Aa} ± 0.0005	0.0064 ^{Aa} ± 0.0009
72	0.0057 ^{Ba} ± 0.0003	0.0066 ^{Aa} ± 0.0012
Media	0.0056 ^B ± 0.0005	0.0064 ^A ± 0.0010

Concentración de carnosol aislado del extracto de romero fresco (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0050 ^{Aa(1)(3)} ± 0.0001 ⁽²⁾	0.0048 ^{Aa} ± 0.0002
24	0.0051 ^{Aa} ± 0.0002	0.0048 ^{Aa} ± 0.0002
48	0.0051 ^{Aa} ± 0.0001	0.0048 ^{Aa} ± 0.0003
72	0.0052 ^{Aa} ± 0.0002	0.0050 ^{Aa} ± 0.0003
Media	0.0051 ^A ± 0.0002	0.0048 ^B ± 0.0003

Concentración del extracto de romero fresco como carnosol (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0060 ^{Ab(1)(3)} ± 0.0005 ⁽²⁾	0.0058 ^{Ab} ± 0.0003
24	0.0060 ^{Ab} ± 0.0002	0.0060 ^{Abb} ± 0.0003
48	0.0064 ^{Aa} ± 0.0001	0.0062 ^{Aa} ± 0.0004
72	0.0067 ^{Aa} ± 0.0002	0.0064 ^{Ba} ± 0.0002
Media	0.0063 ^A ± 0.0004	0.0061 ^B ± 0.0003

⁽¹⁾Media de 12 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencia entre temperaturas, y las minúsculas dentro de cada temperatura)

Anexo 9. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de carnosol en el extracto etanólico de salvia fresca

Concentración de carnosol como reactivo analítico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0041 ^{Ab(1)(3)} ± 0.0001 ⁽²⁾	0.0041 ^{Aa} ± 0.0002
24	0.0042 ^{Aa} ± 0.0001	0.0042 ^{Aa} ± 0.0001
48	0.0043 ^{Aa} ± 0.0001	0.0042 ^{Aa} ± 0.00008
72	0.0041 ^{Aa} ± 0.0001	0.0042 ^{Aa} ± 0.0001
Media	0.0042 ^A ± 0.0001	0.0042 ^A ± 0.0001

Concentración de carnosol aislado del extracto de salvia fresca (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0040 ^{Ab(1)(3)} ± 0.0001 ⁽²⁾	0.0038 ^{Bc} ± 0.0001
24	0.0040 ^{Ab} ± 0.00006	0.0039 ^{Bbc} ± 0.00007
48	0.0041 ^{Ab} ± 0.0001	0.0039 ^{Bb} ± 0.00009
72	0.0042 ^{Aa} ± 0.0002	0.0040 ^{Ba} ± 0.0001
Media	0.0041 ^A ± 0.0002	0.0039 ^B ± 0.0001

Concentración del extracto de salvia fresca como carnosol (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0052 ^{Ab(1)(3)} ± 0.0001 ⁽²⁾	0.0050 ^{Bc} ± 0.00005
24	0.0053 ^{Ab} ± 0.0001	0.0051 ^{Bb} ± 0.00007
48	0.0054 ^{Ab} ± 0.0002	0.0052 ^{Bb} ± 0
72	0.0058 ^{Aa} ± 0.0002	0.0055 ^{Ba} ± 0.00005
Media	0.0054 ^A ± 0.0003	0.0052 ^B ± 0.0001

⁽¹⁾Media de 12 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencia entre temperaturas, y las minúsculas dentro de cada temperatura)

Anexo 10. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de ácido camósico en el extracto etanólico de orégano seco

Concentración de ácido camósico como reactivo analítico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0287 ^{Aa(1)(3)} ± 0.004 ⁽²⁾	0.0281 ^{Aa} ± 0.001
24	0.0289 ^{Aa} ± 0.003	0.0284 ^{Aa} ± 0.001
48	0.0295 ^{Aa} ± 0.002	0.0290 ^{Aa} ± 0.002
72	0.0301 ^{Aa} ± 0.002	0.0293 ^{Aa} ± 0.003
Media	0.0298 ^A ± 0.004	0.0293 ^A ± 0.002

Concentración de ácido camósico aislado del extracto de orégano seco (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0235 ^{Ba(1)(3)} ± 0.001 ⁽²⁾	0.0272 ^{Ad} ± 0.001
24	0.0295 ^{Ab} ± 0.001	0.0298 ^{Ac} ± 0.001
48	0.0320 ^{Ab} ± 0.001	0.0323 ^{Ab} ± 0.001
72	0.0401 ^{Aa} ± 0.004	0.0345 ^{Ba} ± 0.002
Media	0.0313 ^A ± 0.006	0.0310 ^A ± 0.003

Concentración del extracto de orégano seco como ácido camósico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0234 ^{Ba(1)(3)} ± 0.001 ⁽²⁾	0.0264 ^{Aa} ± 0.001
24	0.0258 ^{Ab} ± 0.0008	0.0263 ^{Aa} ± 0.0006
48	0.0267 ^{Ba} ± 0.0005	0.0281 ^{Aa} ± 0.0005
72	0.0288 ^{Aa} ± 0.001	0.0302 ^{Aa} ± 0.002
Media	0.0262 ^B ± 0.002	0.0277 ^A ± 0.002

⁽¹⁾Media de 12 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencia entre temperaturas, y las minúsculas dentro de cada temperatura)

Anexo 11. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de ácido carnósico en el extracto etanólico de romero fresco

Concentración de ácido carnósico como reactivo analítico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0420 ^{Aa(1)(3)} ± 0.020 ⁽²⁾	0.0421 ^{Aa} ± 0.002
24	0.0420 ^{Aa} ± 0.003	0.0426 ^{Aa} ± 0.001
48	0.0419 ^{Aa} ± 0.004	0.0424 ^{Aa} ± 0.003
72	0.0427 ^{Aa} ± 0.003	0.0426 ^{Aa} ± 0.003
Media	0.0421 ^A ± 0.010	0.0424 ^A ± 0.003

Concentración de ácido carnósico aislado del extracto de romero fresco (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0418 ^{Ac(1)(3)} ± 0.002 ⁽²⁾	0.0435 ^{Ac} ± 0.001
24	0.0459 ^{Ab} ± 0.0006	0.0468 ^{Ab} ± 0.002
48	0.0476 ^{Bb} ± 0.001	0.0501 ^{Aa} ± 0.002
72	0.0535 ^{Aa} ± 0.003	0.0508 ^{Ba} ± 0.001
Media	0.0472 ^A ± 0.004	0.0478 ^A ± 0.003

Concentración del extracto de romero fresco como ácido carnósico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0377 ^{Ab(1)(3)} ± 0.003 ⁽²⁾	0.0361 ^{Ab} ± 0.002
24	0.0378 ^{Ab} ± 0.001	0.0378 ^{Ab} ± 0.002
48	0.0407 ^{Aa} ± 0.001	0.0388 ^{Aa} ± 0.002
72	0.0429 ^{Aa} ± 0.001	0.0396 ^{Ba} ± 0.001
Media	0.0397 ^A ± 0.003	0.0381 ^B ± 0.002

⁽¹⁾Media de 12 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencia entre temperaturas, y las minúsculas dentro de cada temperatura)

Anexo 12. Efecto del tiempo de almacenamiento en la concentración de ácido camósico en el extracto etanólico de salvia fresca

Concentración de ácido camósico como reactivo analítico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0346 ^{Aa(1)(3)} ± 0.001 ⁽²⁾	0.0318 ^{Ba} ± 0.0005
24	0.0347 ^{Aa} ± 0.002	0.0318 ^{Ba} ± 0.001
48	0.0355 ^{Aa} ± 0.006	0.0325 ^{Aa} ± 0.005
72	0.0358 ^{Aa} ± 0.006	0.0329 ^{Aa} ± 0.004
Media	0.0353 ^A ± 0.005	0.0322 ^B ± 0.003

Concentración de ácido camósico aislado del extracto de salvia fresca (mg/mL)

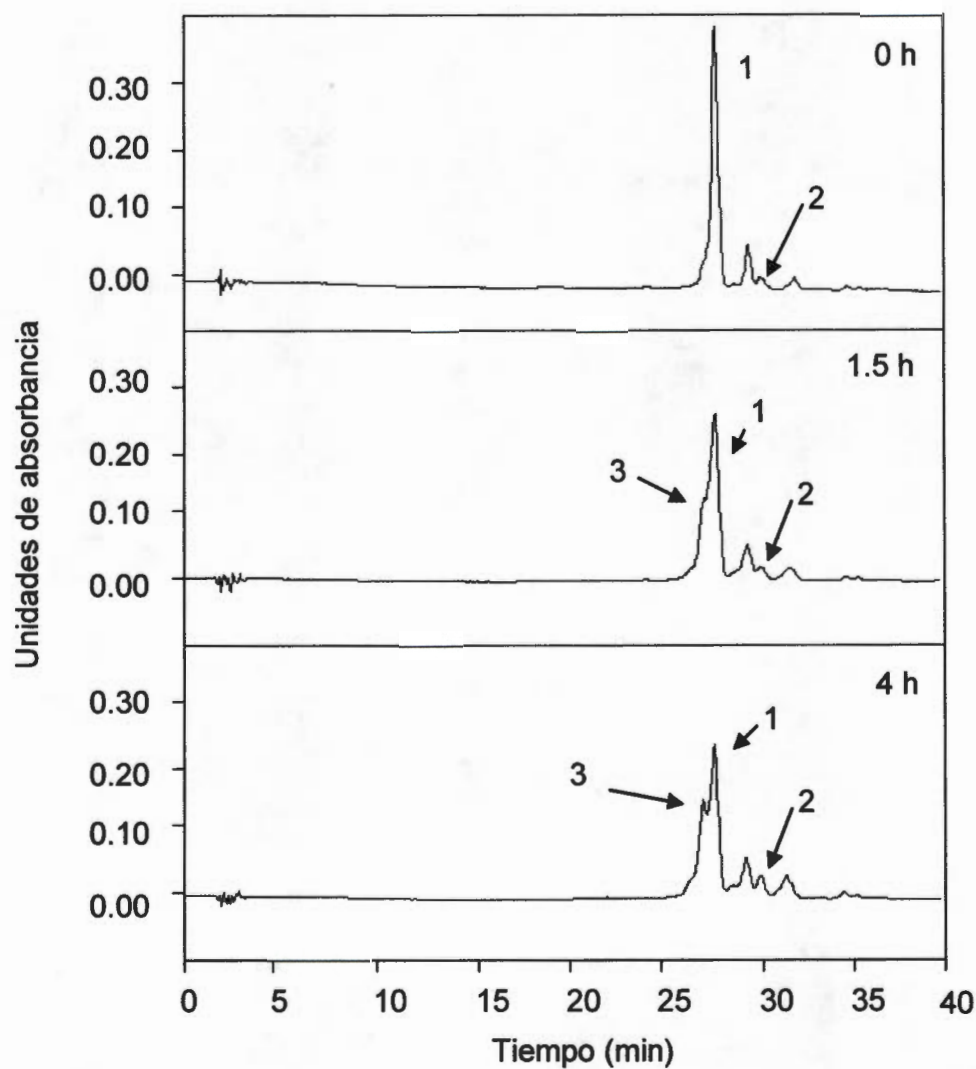
Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0314 ^{Ac(1)(3)} ± 0.0003 ⁽²⁾	0.0312 ^{Ad} ± 0.0004
24	0.0353 ^{Abc} ± 0.004	0.0331 ^{Ac} ± 0.0005
48	0.0372 ^{Aeb} ± 0.005	0.0345 ^{Ab} ± 0.001
72	0.0407 ^{Aa} ± 0.002	0.0403 ^{Aa} ± 0.001
Media	0.0362 ^A ± 0.004	0.0348 ^A ± 0.003

Concentración del extracto de salvia fresca como ácido camósico (mg/mL)

Tiempo (horas)	Temperatura	
	Ambiente	4°C
0	0.0325 ^{Ab(1)(3)} ± 0.001 ⁽²⁾	0.0309 ^{Bc} ± 0.0003
24	0.0330 ^{Ab} ± 0.001	0.0317 ^{Bb} ± 0.0003
48	0.0338 ^{Ab} ± 0.002	0.0318 ^{Bb} ± 0.0001
72	0.0365 ^{Aa} ± 0.001	0.0345 ^{Ba} ± 0.0002
Media	0.0340 ^A ± 0.002	0.0322 ^B ± 0.001

¹⁾Media de 12 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencia entre temperaturas, y las minúsculas dentro de cada temperatura)

Anexo 13. Cromatogramas de la solución de la quinona del ácido carnósico a las 0, 1.5 y 4 h de almacenamiento a 20°C. Obtenido por HPLC utilizando una columna C₁₈ a 284 nm. (1) quinona del ácido carnósico; (2) ácido carnósico; (3) carnosol



Anexo 14. Valores medios de TBARS, pH y color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extractos de orégano fresco y seco y romero fresco, obtenidos con cloroformo y con etanol, con alta y baja oxidación inicial de lípidos, almacenadas a 20 y 4°C durante un total de 72 h

Fuente de variación	Nivel	Valor medio				
		Valor TBARS (mg malonaldehído/kg pasta)	pH	Luminosidad	Cromaticidad	Tonalidad (grados)
Hierba	Orégano fresco	1.3305 ^{abc(2)} ± 1.428 ⁽¹⁾	5.541 ^a ± 0.371	70.847 ^a ± 4.614	15.744 ^a ± 1.357	80.117 ^a ± 4.333
	Orégano seco	1.2954 ^{ab} ± 1.344	5.537 ^a ± 0.336	71.243 ^a ± 4.288	15.676 ^a ± 1.272	80.219 ^a ± 4.341
	Romero fresco	0.8622 ^b ± 1.047	5.505 ^a ± 0.373	71.052 ^a ± 4.458	15.792 ^a ± 1.242	79.281 ^a ± 3.712
	Control	1.4363 ^a ± 1.312	5.458 ^a ± 0.347	71.984 ^a ± 4.140	15.483 ^a ± 1.337	80.190 ^a ± 4.064
Temperatura (°C)	20	1.8310 ^a ± 1.382	5.795 ^a ± 0.430	67.283 ^b ± 3.556	16.426 ^a ± 1.239	79.423 ^a ± 4.931
	4	0.4526 ^b ± 0.569	5.649 ^a ± 0.186	74.610 ^a ± 1.077	14.973 ^b ± 0.811	80.431 ^a ± 3.003
Tiempo (horas)	0	0.0409 ^c ± 0.035	5.494 ^a ± 0.171	71.562 ^a ± 3.954	16.219 ^a ± 1.670	77.601 ^d ± 5.252
	24	1.1171 ^b ± 1.239	5.568 ^a ± 0.321	70.239 ^a ± 5.279	15.800 ^b ± 1.039	78.568 ^c ± 2.457
	48	1.7602 ^a ± 1.372	5.491 ^a ± 0.395	71.352 ^a ± 4.095	15.593 ^b ± 1.182	81.406 ^b ± 2.976
	72	1.6495 ^a ± 1.111	5.513 ^a ± 0.478	71.511 ^a ± 4.128	15.177 ^c ± 0.928	82.139 ^a ± 3.135
Oxidación inicial de lípidos	Alta	1.4596 ^a ± 1.483	6.403 ^a ± 0.161	72.271 ^a ± 2.254	15.034 ^b ± 0.859	81.449 ^a ± 3.996
	Baja	0.8242 ^b ± 0.934	5.248 ^b ± 0.275	69.614 ^b ± 5.285	16.362 ^a ± 1.284	78.419 ^b ± 3.628

⁽¹⁾Desviación estándar; ⁽²⁾ Superíndices iguales en la columna no son significativamente diferentes

Anexo 15. Valores medios de TBARS, pH y color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extractos de orégano fresco y seco, y romero fresco obtenidos con cloroformo y con etanol (confundiendo los efectos de temperatura, tiempo y oxidación inicial de las pastas)

Disolvente	Hierba	Variable				
		Valor TBARS (mg malonaldehído/kg pasta)	pH	Luminosidad	Cromaticidad	Tonalidad (grados)
Cloroformo	Orégano fresco	1.4498 ^{a(1)(3)} ± 1.616 ⁽²⁾	5.568 ^a ± 0.365	71.064 ^{bc} ± 4.580	15.729 ^{ab} ± 1.334	79.905 ^{bcd} ± 4.395
	Orégano seco	1.3931 ^{ab} ± 1.459	5.529 ^a ± 0.320	71.359 ^b ± 4.249	15.795 ^{ab} ± 1.199	79.618 ^{cd} ± 4.227
	Romero fresco	0.7223 ^d ± 0.723	5.548 ^a ± 0.376	70.495 ^c ± 4.256	15.855 ^{ab} ± 1.226	78.549 ^d ± 3.601
Cloroformo-etanol	Romero fresco	1.1595 ^c ± 1.413	5.511 ^a ± 0.376	71.472 ^b ± 4.085	15.828 ^{ab} ± 1.112	79.496 ^{cd} ± 3.330
Etanol	Orégano fresco	1.2112 ^{bc} ± 1.226	5.513 ^a ± 0.381	70.630 ^c ± 4.710	15.758 ^a ± 1.400	80.329 ^{abc} ± 4.329
	Orégano seco	1.1977 ^c ± 1.232	5.546 ^a ± 0.356	71.126 ^{bc} ± 4.392	15.558 ^a ± 1.349	80.819 ^{ab} ± 4.436
	Romero fresco	0.5664 ^d ± 0.745	5.439 ^a ± 0.372	69.465 ^d ± 5.250	15.579 ^b ± 1.454	80.510 ^{abc} ± 4.288
	Control	1.4363 ^a ± 1.312	5.458 ^a ± 0.347	73.474 ^a ± 4.140	16.173 ^a ± 1.337	81.410 ^a ± 4.064

⁽¹⁾Media de 32 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales en la columna no son significativamente diferentes

Anexo 16. Valores medios de TBARS, pH, color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad), diámetro de partícula y concentración de proteínas de 200 y 45 kDa en pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, almacenadas a 20 y 4°C

Fuente de variación	Nivel	Valor medio							
		Valor TBARS (mg malonaldehído/kg pasta)	pH	Luminosidad	Cromaticidad	Tonalidad (grados)	Diámetro de partícula (µm)	Concentración de proteínas de 200 kDa*	Concentración de proteínas de 45 kDa*
Extracto etanólico	Orégano seco	1.7881 ^{a(1)(3)} ± 2.644 ⁽²⁾	5.459 ^a ± 0.146	72.000 ^b ± 1.446	16.905 ^a ± 0.668	75.795 ^b ± 1.753	18.146 ^b ± 1.844	1145.38 ^a ± 781.60	2205 ^a ± 499.88
	Salvia fresca	2.0443 ^a ± 3.046	5.435 ^a ± 0.147	72.270 ^b ± 1.305	16.652 ^a ± 0.721	76.716 ^b ± 2.697	18.640 ^b ± 2.181	1399.75 ^a ± 939.07	2326.75 ^a ± 557.19
	Romero fresco	1.3372 ^a ± 1.965	5.443 ^a ± 0.157	72.480 ^b ± 1.930	16.088 ^b ± 0.889	79.133 ^a ± 3.477	20.283 ^a ± 2.417	952.88 ^a ± 702.28	2312.13 ^a ± 715.91
	Control	2.2484 ^a ± 3.199	5.454 ^a ± 0.152	73.815 ^a ± 1.573	15.487 ^c ± 0.940	80.968 ^a ± 4.265	17.219 ^c ± 1.534	844.25 ^a ± 730.62	1986.25 ^a ± 414.77
Temperatura (°C)	20	3.5376 ^a ± 3.059	5.360 ^a ± 0.118	72.973 ^a ± 1.768	15.881 ^b ± 0.909	79.839 ^a ± 3.420	18.781 ^a ± 2.736	981.69 ^a ± 951.04	2078.94 ^a ± 638.42
	4	0.1614 ^b ± 0.172	5.535 ^a ± 0.124	72.309 ^a ± 1.599	16.686 ^a ± 0.866	76.468 ^b ± 3.303	18.363 ^a ± 1.744	1189.44 ^a ± 586	2336.13 ^a ± 421.46
Tiempo (horas)	0	0.0568 ^b ± 0.017	5.452 ^a ± 0.092	72.000 ^b ± 1.446	16.905 ^a ± 0.668	75.795 ^b ± 1.753	17.123 ^c ± 1.664	1707 ^a ± 781.47	2157.50 ^a ± 169.44
	24	0.9150 ^b ± 0.971	5.532 ^a ± 0.139	72.270 ^b ± 1.305	16.652 ^a ± 0.721	76.716 ^b ± 2.697	18.342 ^b ± 2.004	1208.88 ^a ± 645.91	2391.88 ^a ± 668.64
	48	2.5112 ^a ± 2.482	5.470 ^a ± 0.152	72.480 ^b ± 1.930	16.088 ^b ± 0.889	79.133 ^a ± 3.477	19.063 ^{ab} ± 2.054	811.63 ^a ± 769.87	2262.50 ^a ± 457.99
	72	3.9151 ^a ± 3.830	5.337 ^b ± 0.140	73.815 ^a ± 1.573	15.487 ^c ± 0.940	80.968 ^a ± 4.265	19.761 ^a ± 2.548	614.75 ^a ± 552.18	2018.25 ^a ± 746.98

⁽¹⁾Desviación estándar; ⁽²⁾Superíndices iguales en la columna no son significativamente diferentes

* determinada por densitometría

Anexo 17. Efecto del tiempo de almacenamiento en el color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, almacenadas a 20°C

Luminosidad

Tiempo (horas)	Orégano seco	Romero fresco	Salvia fresca	Control
0	74.180 ^{ABa(1)(3)} ± 1.030 ⁽²⁾	74.227 ^{Aa} ± 1.186	73.412 ^{Aa} ± 1.772	75.567 ^{Aa} ± 0.749
24	72.212 ^{Aa} ± 0.808	72.650 ^{Aa} ± 1.634	71.892 ^{Aa} ± 2.166	73.280 ^{Aa} ± 0.678
48	71.990 ^{Aa} ± 1.931	72.787 ^{Aa} ± 2.245	71.772 ^{Aa} ± 2.385	73.125 ^{Aa} ± 2.419
72	71.815 ^{Aa} ± 1.055	72.057 ^{Aa} ± 1.178	72.530 ^{Aa} ± 1.791	74.077 ^{Aa} ± 1.043
Media	72.549 ^A ± 1.509	72.930 ^A ± 1.667	72.401 ^A ± 1.948	74.012 ^A ± 1.609

Cromaticidad

Tiempo (horas)	Orégano seco	Romero fresco	Salvia fresca	Control
0	16.727 ^{ABa(1)(3)} ± 0.114 ⁽²⁾	16.306 ^{ABa} ± 0.212	17.043 ^{Aa} ± 0.535	16.065 ^{Ba} ± 0.302
24	16.435 ^{Aa} ± 0.127	16.390 ^{Aa} ± 1.004	16.693 ^{Aa} ± 0.943	15.906 ^{Aa} ± 0.205
48	16.149 ^{Aa} ± 0.581	14.958 ^{Ab} ± 0.456	16.204 ^{Aa} ± 0.893	15.430 ^{Aa} ± 1.098
72	15.159 ^{ABb} ± 0.065	14.680 ^{ABb} ± 0.487	15.510 ^{Aa} ± 0.394	14.440 ^{Ba} ± 0.384
Media	16.117 ^{AB} ± 0.667	15.583 ^{AB} ± 0.966	16.362 ^A ± 0.882	15.460 ^B ± 0.851

Tonalidad

Tiempo (horas)	Orégano seco	Romero fresco	Salvia fresca	Control
0	77.423 ^{Ac(1)(3)} ± 0.468 ⁽²⁾	75.382 ^{Ab} ± 0.595	77.728 ^{Ab} ± 1.875	75.699 ^{Ac} ± 0.531
24	78.568 ^{Ac} ± 0.995	76.216 ^{Ab} ± 1.956	78.805 ^{Ab} ± 2.102	77.195 ^{Ac} ± 1.461
48	81.280 ^{Ab} ± 1.376	80.252 ^{Aa} ± 2.337	80.640 ^{Ab} ± 1.051	80.475 ^{Ab} ± 1.915
72	84.586 ^{Aa} ± 0.919	83.429 ^{Aa} ± 1.103	84.214 ^{Aa} ± 0.847	85.532 ^{Aa} ± 1.074
Media	80.464 ^A ± 2.987	78.820 ^A ± 3.653	80.347 ^A ± 2.902	79.725 ^A ± 4.076

⁽¹⁾ Media de 4 mediciones; ⁽²⁾ Desviación estándar; ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre extractos y las minúsculas dentro de cada extracto)

Anexo 18. Efecto del tiempo de almacenamiento en el color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de orégano seco, romero fresco y salvia fresca almacenadas a 4°C.

Luminosidad

Tiempo (horas)	Orégano seco	Romero fresco	Salvia fresca	Control
0	72.522 ^{Aa(1)(3)} ± 1.759 ⁽²⁾	72.555 ^{Aa} ± 1.754	73.560 ^{Aa} ± 0.862	74.500 ^{Aa} ± 1.649
24	71.445 ^{Aa} ± 0.477	72.222 ^{Aa} ± 0.885	71.282 ^{Ab} ± 0.521	73.177 ^{Aa} ± 1.671
48	71.690 ^{Aa} ± 0.945	72.100 ^{Aa} ± 1.416	72.357 ^{Aab} ± 0.911	74.020 ^{Aa} ± 2.927
72	70.607 ^{Aa} ± 0.804	71.305 ^{Aa} ± 0.602	71.452 ^{Ab} ± 0.444	72.160 ^{Aa} ± 1.945
Media	71.566 ^A ± 1.212	72.045 ^A ± 1.212	72.163 ^A ± 1.131	73.464 ^A ± 2.101

Cromaticidad

Tiempo (horas)	Orégano seco	Romero fresco	Salvia fresca	Control
0	17.494 ^{Aa(1)(3)} ± 0.208 ⁽²⁾	17.097 ^{Aa} ± 0.915	17.746 ^{Aa} ± 0.427	16.766 ^{Aa} ± 0.388
24	16.866 ^{Aa} ± 0.496	16.771 ^{Aa} ± 0.825	17.525 ^{Aa} ± 0.246	16.632 ^{Aa} ± 0.664
48	16.736 ^{Aa} ± 0.531	16.121 ^{Aa} ± 0.791	16.805 ^{Aa} ± 0.588	16.304 ^{Aa} ± 0.869
72	16.383 ^{Aa} ± 0.512	15.891 ^{Aa} ± 0.886	16.323 ^{Aa} ± 1.104	15.511 ^{Aa} ± 1.275
Media	16.870 ^A ± 0.582	16.470 ^A ± 0.914	17.100 ^A ± 0.840	16.303 ^A ± 0.920

Tonalidad

Tiempo (horas)	Orégano seco	Romero fresco	Salvia fresca	Control
0	76.042 ^{Aa(1)(3)} ± 0.997 ⁽²⁾	74.042 ^{Aa} ± 2.069	75.320 ^{Aa} ± 1.393	74.724 ^{Aa} ± 2.329
24	76.925 ^{Aa} ± 2.611	74.445 ^{Aa} ± 3.140	76.116 ^{Aa} ± 2.928	75.470 ^{Aa} ± 4.245
48	78.453 ^{Aa} ± 4.331	76.308 ^{Aa} ± 3.356	77.995 ^{Aa} ± 4.836	77.661 ^{Aa} ± 5.500
72	78.512 ^{Aa} ± 2.782	76.240 ^{Aa} ± 2.821	77.728 ^{Aa} ± 3.422	77.508 ^{Aa} ± 4.636
Media	77.483 ^A ± 2.834	75.259 ^A ± 2.791	76.790 ^A ± 3.231	76.341 ^A ± 4.094

⁽¹⁾Media de 4 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre extractos y las minúsculas diferencias dentro de cada extracto)

Anexo 19. Efecto del tiempo de almacenamiento en el color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de orégano seco, y sus compuestos con actividad antioxidante.

Luminosidad										
Tiempo (horas)	Extracto de orégano seco	Ácido rosmarínico - extracto de orégano seco	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Carnosol - extracto de orégano seco	Carnosol - reactivo analítico	Ácido carnóico - extracto de orégano seco	Ácido carnóico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de orégano seco	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	73.220 ^{Ab(1)(2)} ± 0.381 ⁽²⁾	72.795 ^{Ab} ± 0.162	73.085 ^{Ab} ± 1.873	74.555 ^{Ab} ± 0.162	73.825 ^{Ab} ± 0.233	73.190 ^{Ab} ± 0.988	71.395 ^{Ba} ± 0.445	72.480 ^{Ab} ± 0.240	72.370 ^{Ab} ± 0.287	72.470 ^{Ab} ± 0.367
24	73.305 ^{Ab} ± 0.275	74.050 ^{Ab} ± 0.834	71.870 ^{Ab} ± 0.847	74.210 ^{Ab} ± 0.438	73.170 ^{Ab} ± 0.155	72.545 ^{Ab} ± 0.403	71.845 ^{Ab} ± 0.275	73.480 ^{Ab} ± 0.398	73.750 ^{Ab} ± 0.480	74.880 ^{Ab} ± 1.343
48	72.940 ^{Ab} ± 1.159	75.200 ^{Ab} ± 1.131	73.890 ^{Ab} ± 1.456	75.425 ^{Ab} ± 0.502	75.130 ^{Ab} ± 0.486	75.005 ^{Ab} ± 0.841	72.340 ^{Ab} ± 2.276	74.480 ^{Ab} ± 0.056	75.580 ^{Ab} ± 0.381	75.095 ^{Ab} ± 1.534
72	73.350 ^{Ab} ± 0.070	73.220 ^{Ab} ± 0.820	73.700 ^{Ab} ± 0.565	75.270 ^{Ab} ± 0.438	74.370 ^{Ab} ± 0.287	74.120 ^{Ab} ± 1.173	73.145 ^{Ab} ± 0.304	74.540 ^{Ab} ± 0.084	73.940 ^{Ab} ± 0.212	74.485 ^{Ab} ± 2.510
Media	73.203 ^B ± 0.503	73.316 ^A ± 1.233	73.338 ^A ± 1.435	74.865 ^A ± 0.817	74.123 ^A ± 0.804	73.485 ^A ± 1.188	72.831 ^B ± 1.737	73.737 ^A ± 0.812	73.910 ^A ± 1.247	74.180 ^A ± 1.838
Cromaticidad										
Tiempo (horas)	Extracto de orégano seco	Ácido rosmarínico - extracto de orégano seco	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Carnosol - extracto de orégano seco	Carnosol - reactivo analítico	Ácido carnóico - extracto de orégano seco	Ácido carnóico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de orégano seco	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	17.119 ^{Ab(1)(2)} ± 0.816 ⁽²⁾	15.862 ^{Ab} ± 0.016	15.009 ^{Ba} ± 1.315	16.425 ^{Ab} ± 0.519	15.954 ^{Ab} ± 0.198	16.432 ^{Ab} ± 0.228	16.426 ^{Ab} ± 0.382	16.977 ^{Ab} ± 0.342	16.230 ^{Ab} ± 0.135	16.119 ^{Ab} ± 0.882
24	16.726 ^{Ab} ± 0.037	15.624 ^{Ab} ± 0.336	15.812 ^{Ab} ± 1.127	15.650 ^{Ab} ± 0.481	15.711 ^{Ab} ± 0.224	16.243 ^{Ab} ± 0.207	16.577 ^{Ab} ± 0.353	15.988 ^{Ab} ± 0.136	15.638 ^{Ab} ± 0.125	15.925 ^{Ab} ± 0.402
48	16.887 ^{Ab} ± 0.138	14.783 ^{Ba} ± 0.041	15.134 ^{Ba} ± 0.422	14.807 ^{Ba} ± 0.283	15.142 ^{Ba} ± 0.114	13.556 ^{Ca} ± 0.884	15.598 ^{Ba} ± 0.121	15.118 ^{Ba} ± 0.162	15.053 ^{Ba} ± 0.408	14.733 ^{Ba} ± 0.211
72	16.625 ^{Ab} ± 0.147	14.816 ^{Ba} ± 0.079	13.980 ^{Ca} ± 0.543	14.625 ^{Ba} ± 0.316	14.262 ^{Ba} ± 0.215	15.165 ^{Ba} ± 0.168	14.888 ^{Ba} ± 0.063	14.738 ^{Ba} ± 0.110	14.959 ^{Ba} ± 0.200	14.632 ^{Ba} ± 0.572
Media	16.835 ^A ± 0.407	15.286 ^B ± 0.534	14.984 ^B ± 0.993	15.377 ^A ± 0.828	15.267 ^A ± 0.710	15.348 ^B ± 1.272	15.872 ^{Ab} ± 0.752	15.708 ^{Ab} ± 0.836	15.470 ^B ± 0.575	15.352 ^B ± 0.815
Tonalidad										
Tiempo (horas)	Extracto de orégano seco	Ácido rosmarínico - extracto de orégano seco	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Carnosol - extracto de orégano seco	Carnosol - reactivo analítico	Ácido carnóico - extracto de orégano seco	Ácido carnóico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de orégano seco	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	82.408 ^{Ab(1)(2)} ± 0.216 ⁽²⁾	78.527 ^{Ba} ± 0.090	79.162 ^{Ba} ± 0.887	78.082 ^{Ba} ± 0.701	77.680 ^{Ba} ± 0.261	77.385 ^{Ba} ± 0.731	77.240 ^{Ba} ± 0.674	77.142 ^{Ba} ± 0.785	76.344 ^{Ba} ± 1.195	76.404 ^{Ba} ± 2.042
24	83.323 ^{Ab} ± 0.057	78.877 ^{Ba} ± 0.365	77.897 ^{Ba} ± 0.485	78.208 ^{Ba} ± 0.258	78.880 ^{Ba} ± 0.545	77.520 ^{Ba} ± 0.161	77.821 ^{Ba} ± 0.338	78.353 ^{Ba} ± 0.106	79.163 ^{Ba} ± 0.352	77.787 ^{Ba} ± 0.311
48	85.308 ^{Ab} ± 0.443	83.739 ^{Ab} ± 0.202	82.751 ^{Ab} ± 1.550	81.845 ^{Ab} ± 2.479	82.756 ^{Ab} ± 0.862	83.157 ^{Ab} ± 1.853	83.009 ^{Ab} ± 2.541	81.710 ^{Ab} ± 0.127	82.152 ^{Ab} ± 1.362	83.055 ^{Ab} ± 2.199
72	86.349 ^{Ab} ± 1.042	83.821 ^{Ba} ± 0.323	84.540 ^{Ab} ± 1.039	82.987 ^{Ba} ± 0.788	82.510 ^{Ba} ± 0.459	82.345 ^{Ca} ± 0.084	82.164 ^{Ca} ± 0.186	82.750 ^{Ba} ± 0.333	81.894 ^{Ca} ± 0.383	82.742 ^{Ba} ± 0.272
Media	84.347 ^A ± 1.724	81.241 ^A ± 2.725	81.087 ^A ± 2.980	80.282 ^A ± 2.542	80.401 ^A ± 2.457	80.102 ^A ± 2.957	80.083 ^A ± 2.887	79.989 ^A ± 2.481	79.888 ^A ± 2.619	79.997 ^A ± 3.349

⁽¹⁾Media de 2 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferentes entre compuestos y las minúsculas dentro de cada compuesto)

Anexo 20. Efecto del tiempo de almacenamiento en el color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de romero fresco y sus compuestos con actividad antioxidante

Luminosidad										
Tiempo (horas)	Extracto de romero fresco	Ácido rosmarínico - extracto de romero fresco	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Camosol - extracto de romero fresco	Camosol - reactivo analítico	Ácido caméico - extracto de romero fresco	Ácido caméico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de romero fresco	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	69.940 ^{ABC(1)(2)} ± 0.042 ⁽²⁾	70.205 ^{ABa} ± 0.388	70.180 ^{ABa} ± 0.109	69.980 ^{ABa} ± 0.268	71.045 ^{ABa} ± 1.081	68.675 ^{BCa} ± 0.162	67.545 ^{Ca} ± 0.281	69.720 ^{ABab} ± 0.183	70.090 ^{ABa} ± 0.155	68.165 ^{Ca} ± 0.586
24	70.075 ^{ABCa} ± 0.049	70.930 ^{ABa} ± 0.622	70.690 ^{ABa} ± 0.891	70.725 ^{ABa} ± 0.940	68.430 ^{CCa} ± 0.240	69.035 ^{BCa} ± 0.162	67.765 ^{CCa} ± 0.275	70.730 ^{ABa} ± 0.381	70.810 ^{ABa} ± 0.098	67.185 ^{Ca} ± 0.685
48	68.850 ^{ABa} ± 0.551	70.635 ^{ABa} ± 0.148	69.890 ^{ABa} ± 0.721	70.220 ^{ABa} ± 0.919	68.895 ^{ABa} ± 0.318	68.605 ^{Ca} ± 0.502	70.025 ^{ABa} ± 3.217	69.170 ^{ABa} ± 0.141	69.430 ^{ABa} ± 0.113	66.640 ^{ABa} ± 1.541
72	69.490 ^{ABa} ± 1.357	71.165 ^{ABa} ± 1.039	69.805 ^{ABa} ± 0.572	70.620 ^{ABa} ± 0.777	68.670 ^{ABa} ± 0.396	68.890 ^{ABa} ± 1.442	68.210 ^{ABa} ± 1.159	69.110 ^{ABa} ± 0.127	67.850 ^{ABa} ± 0.098	67.170 ^{ABa} ± 1.414
Media	69.585 ^{ABCD} ± 0.754	70.733 ^A ± 0.617	70.136 ^{ABC} ± 0.612	70.395 ^{AB} ± 0.668	69.260 ^{BCD} ± 1.207	68.795 ^{CD} ± 0.611	68.385 ^{DE} ± 1.667	69.682 ^{ABCD} ± 0.716	69.545 ^{ABCD} ± 1.172	67.290 ^E ± 1.043
Cromaticidad										
Tiempo (horas)	Extracto de romero fresco	Ácido rosmarínico - extracto de romero fresco	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Camosol - extracto de romero fresco	Camosol - reactivo analítico	Ácido caméico - extracto de romero fresco	Ácido caméico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de romero fresco	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	17.481 ^{AB(1)(2)} ± 0.472 ⁽²⁾	17.342 ^{ABa} ± 0.492	17.855 ^{ABa} ± 0.246	17.314 ^{ABa} ± 0.281	16.285 ^{ABa} ± 1.844	17.015 ^{ABa} ± 0.080	17.333 ^{ABa} ± 0.561	16.736 ^{ABa} ± 0.076	16.146 ^{ABa} ± 0.119	16.564 ^{ABa} ± 0.204
24	16.400 ^{BCa} ± 0.050	16.173 ^{Ca} ± 0.189	16.037 ^{Ca} ± 0.416	15.950 ^{Ca} ± 0.159	17.801 ^{ABa} ± 0.179	16.368 ^{Ca} ± 0.059	16.616 ^{BCa} ± 0.408	16.597 ^{BCD} ± 0.137	16.351 ^{Ca} ± 0.288	17.189 ^{ABa} ± 0.119
48	16.889 ^{ABa} ± 0.023	16.436 ^{ABa} ± 0.031	16.746 ^{ABa} ± 0.321	15.675 ^{ABa} ± 0.095	15.565 ^{ABa} ± 1.947	16.066 ^{ABa} ± 0.454	15.860 ^{ABa} ± 0.830	17.502 ^{ABa} ± 0.248	17.210 ^{ABa} ± 0.079	17.182 ^{ABa} ± 0.435
72	16.846 ^{ABa} ± 0.031	15.972 ^{ABa} ± 0.213	16.533 ^{ABa} ± 0.743	15.472 ^{ABa} ± 0.065	16.171 ^{ABa} ± 0.903	16.236 ^{ABa} ± 0.557	17.173 ^{ABa} ± 0.136	17.837 ^{ABa} ± 0.258	17.253 ^{ABa} ± 0.118	16.830 ^{ABa} ± 0.396
Media	16.854 ^A ± 0.465	16.481 ^A ± 0.600	16.793 ^A ± 0.795	16.103 ^A ± 0.779	16.456 ^A ± 1.387	16.422 ^A ± 0.471	16.745 ^A ± 0.741	17.168 ^A ± 0.572	16.740 ^A ± 0.545	16.941 ^A ± 0.368
Tonalidad										
Tiempo (horas)	Extracto de romero fresco	Ácido rosmarínico - extracto de romero fresco	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Camosol - extracto de romero fresco	Camosol - reactivo analítico	Ácido caméico - extracto de romero fresco	Ácido caméico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de romero fresco	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	78.008 ^{AB(1)(2)} ± 2.373 ⁽²⁾	76.734 ^{ABa} ± 1.512	75.422 ^{ABa} ± 0.521	74.862 ^{ABa} ± 0.227	78.785 ^{ABa} ± 3.153	75.935 ^{ABa} ± 0.201	75.372 ^{ABa} ± 0.627	77.508 ^{ABa} ± 0.157	78.461 ^{ABa} ± 0.323	78.147 ^{ABa} ± 1.148
24	78.319 ^{ABa} ± 0.592	79.210 ^{ABa} ± 1.428	79.161 ^{ABa} ± 2.574	75.330 ^{ABa} ± 0.584	79.032 ^{ABa} ± 0.969	76.126 ^{ABa} ± 0.637	76.030 ^{ABa} ± 1.714	75.521 ^{ABa} ± 0.280	79.358 ^{ABa} ± 0.176	78.104 ^{ABa} ± 2.107
48	77.050 ^{ABa} ± 0.091	76.184 ^{ABa} ± 0.658	76.236 ^{ABa} ± 3.768	75.385 ^{ABa} ± 1.644	78.805 ^{ABa} ± 3.333	75.615 ^{ABa} ± 2.865	76.317 ^{ABa} ± 0.204	72.479 ^{ABa} ± 0.422	74.082 ^{ABa} ± 0.071	79.259 ^{ABa} ± 5.369
72	76.625 ^{ABa} ± 1.926	76.688 ^{ABa} ± 4.669	75.349 ^{ABa} ± 2.391	75.209 ^{ABa} ± 0.098	77.796 ^{ABa} ± 2.358	73.890 ^{ABa} ± 2.937	76.020 ^{ABa} ± 2.082	74.159 ^{ABa} ± 0.425	75.192 ^{ABa} ± 0.381	79.756 ^{ABa} ± 5.558
Media	77.500 ^{ABC} ± 1.388	77.204 ^{ABC} ± 2.319	76.542 ^{ABC} ± 2.565	75.202 ^C ± 0.698	78.604 ^{AB} ± 2.048	75.384 ^A ± 1.841	75.685 ^{BC} ± 1.182	74.916 ^C ± 1.987	76.773 ^{ABC} ± 2.355	78.816 ^A ± 3.152

⁽¹⁾Media de 2 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre compuestos y las minúsculas dentro de cada compuesto)

Anexo 21. Efecto del tiempo de almacenamiento en el color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) en pastas cárnicas añadidas con extracto etanólico de salvia fresca y sus compuestos con actividad antioxidante

Luminosidad										
Tiempo (horas)	Extracto de salvia fresca	Ácido rosmarínico - extracto de salvia fresca	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Carnosol - extracto de salvia fresca	Carnosol - reactivo analítico	Ácido carnóico - extracto de salvia fresca	Ácido carnóico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de salvia fresca	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	66.745 ^{Aa(1)(2)} ± 2.948 ⁽²⁾	67.655 ^{Aa} ± 1.534	67.805 ^{Aa} ± 0.615	67.510 ^{Aa} ± 0.678	68.080 ^{Aa} ± 0.183	67.065 ^{Aa} ± 0.205	64.745 ^{Aa} ± 2.170	64.860 ^{Aa} ± 0.196	68.250 ^{Aa} ± 0.141	69.145 ^{Aa} ± 0.473
24	64.530 ^{Ca} ± 0.919	67.515 ^{Aba} ± 0.770	67.670 ^{Aba} ± 0.480	67.460 ^{Aba} ± 0.240	67.350 ^{Aba} ± 0.820	66.365 ^{Ba} ± 0.021	66.415 ^{Ba} ± 0.827	64.680 ^{Ca} ± 0.113	67.570 ^{Aba} ± 0.127	68.765 ^{Aa} ± 0.190
48	65.225 ^{Ca} ± 0.473	67.590 ^{Aba} ± 1.167	67.745 ^{Aba} ± 0.473	66.835 ^{Ba} ± 0.346	67.725 ^{Aba} ± 0.304	66.450 ^{Ba} ± 1.131	67.450 ^{Ba} ± 0.933	64.570 ^{Ca} ± 0.096	66.190 ^{Ba} ± 0.084	69.465 ^{Aa} ± 0.007
72	65.325 ^{Ba} ± 0.261	67.570 ^{Aba} ± 1.258	66.635 ^{Aba} ± 0.556	66.045 ^{Ba} ± 0.219	66.805 ^{Aba} ± 0.502	66.460 ^{Aba} ± 1.357	67.190 ^{Aba} ± 0.084	62.730 ^{Ca} ± 0.196	65.690 ^{Ba} ± 0.155	68.410 ^{Aa} ± 0.282
Media	65.456 ^{Ca} ± 1.464	67.582 ^B ± 0.923	67.463 ^B ± 0.654	66.967 ^B ± 0.710	67.490 ^B ± 0.636	66.592 ^{Ba} ± 0.741	66.450 ^{Ba} ± 1.472	64.210 ^{Ca} ± 0.928	66.925 ^B ± 1.104	68.946 ^A ± 0.477
Cromaticidad										
Tiempo (horas)	Extracto de salvia fresca	Ácido rosmarínico - extracto de salvia fresca	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Carnosol - extracto de salvia fresca	Carnosol - reactivo analítico	Ácido carnóico - extracto de salvia fresca	Ácido carnóico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de salvia fresca	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	14.582 ^{Aa(1)(2)} ± 0.195 ⁽²⁾	13.169 ^{Ba} ± 0.338	12.601 ^{Ba} ± 0.034	12.663 ^{Ba} ± 0.210	12.861 ^{Ba} ± 0.072	13.120 ^{Ba} ± 0.005	12.870 ^{Ba} ± 0.234	13.193 ^{Ba} ± 0.259	13.026 ^{Ba} ± 0.073	12.492 ^{Ba} ± 0.394
24	13.943 ^{Aa} ± 0.420	12.741 ^{Ba} ± 0.327	12.501 ^{Ba} ± 0.267	12.380 ^{Ba} ± 0.091	12.995 ^{Ba} ± 0.071	12.629 ^{Ba} ± 0.036	12.611 ^{Ba} ± 0.162	12.462 ^{Ba} ± 0.057	12.793 ^{Ba} ± 0.092	12.365 ^{Ba} ± 0.105
48	13.620 ^{Aa} ± 0.173	12.186 ^{Ba} ± 0.036	12.211 ^{Ba} ± 0.193	12.207 ^{Ba} ± 0.332	12.748 ^{Ba} ± 0.141	12.568 ^{Ba} ± 0.313	12.449 ^{Ba} ± 0.262	11.496 ^{Ca} ± 0.084	11.586 ^{Ca} ± 0.071	12.314 ^{Ba} ± 0.096
72	13.435 ^{Aa} ± 0.050	12.319 ^{Ba} ± 0.241	12.271 ^{Ba} ± 0.138	12.674 ^{Ba} ± 0.072	12.561 ^{Ba} ± 0.196	12.445 ^{Ba} ± 0.145	12.330 ^{Ba} ± 0.130	12.074 ^{Ca} ± 0.101	11.805 ^{Ca} ± 0.134	12.115 ^{Ba} ± 0.281
Media	13.897 ^A ± 0.506	12.604 ^B ± 0.457	12.446 ^B ± 0.265	12.468 ^B ± 0.266	12.796 ^B ± 0.199	12.665 ^B ± 0.301	12.565 ^B ± 0.267	12.307 ^B ± 0.668	12.303 ^B ± 0.663	12.321 ^B ± 0.239
Tonalidad										
Tiempo (horas)	Extracto de salvia fresca	Ácido rosmarínico - extracto de salvia fresca	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Carnosol - extracto de salvia fresca	Carnosol - reactivo analítico	Ácido carnóico - extracto de salvia fresca	Ácido carnóico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de salvia fresca	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	89.304 ^{Aa(1)(2)} ± 0.976 ⁽²⁾	80.575 ^{Ba} ± 3.780	78.623 ^{Ba} ± 0.515	79.487 ^{Ba} ± 0.468	78.445 ^{Ba} ± 0.322	79.615 ^{Ba} ± 0.035	75.856 ^{Ba} ± 0.028	74.493 ^{Ca} ± 1.535	77.362 ^{Ca} ± 0.309	78.224 ^{Ba} ± 1.842
24	89.016 ^{Aa} ± 1.047	80.245 ^{Ba} ± 2.554	79.277 ^{Ba} ± 2.096	77.145 ^{Ca} ± 0.676	78.292 ^{Ca} ± 0.629	80.360 ^{Ca} ± 0.980	76.784 ^{Ca} ± 1.422	75.785 ^{Ca} ± 0.268	76.116 ^{Ca} ± 0.093	81.925 ^{Ba} ± 1.691
48	87.994 ^{Aa} ± 1.186	80.859 ^{Ba} ± 2.264	77.862 ^{Ba} ± 1.842	79.192 ^{Ba} ± 0.378	77.567 ^{Ba} ± 0.074	80.136 ^{Ba} ± 1.946	75.946 ^{Ba} ± 1.207	73.945 ^{Ca} ± 0.173	75.710 ^{Ba} ± 0.595	81.385 ^{Ba} ± 5.159
72	86.375 ^{Aa} ± 1.920	79.502 ^{Ba} ± 1.880	78.047 ^{Ba} ± 3.479	79.037 ^{Ba} ± 3.714	76.717 ^{Ba} ± 0.512	77.606 ^{Ba} ± 0.747	76.187 ^{Ba} ± 2.864	72.902 ^{Ba} ± 0.202	75.330 ^{Ba} ± 0.325	80.111 ^{Aba} ± 2.176
Media	88.172 ^A ± 1.588	80.295 ^B ± 2.125	78.452 ^{Ba} ± 1.796	78.715 ^{Ba} ± 1.748	77.260 ^{Ca} ± 0.945	79.430 ^{Ba} ± 1.452	76.194 ^{Ca} ± 1.348	74.281 ^E ± 1.261	76.129 ^{Ca} ± 0.864	80.411 ^B ± 2.773

⁽¹⁾Media de 2 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre compuestos y las minúsculas dentro de cada compuesto)

Anexo 22. Valores medios de TBARS, pH, color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad) y diámetro de partícula en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico, almacenadas a 20 y 4°C durante un total de 72 h

Fuente de variación	Nivel	Valores medios					
		Valor TBARS (mg malonaldehído/kg pasta)	pH	Luminosidad	Cromaticidad	Tonalidad (grados)	Diámetro de partícula (µm)
Tratamiento	Ácido carnósico	0.3365 ^{bc2} ± 0.236 ⁽¹⁾	5.603 ^a ± 0.174	59.902 ^a ± 1.623	13.319 ^a ± 0.841	70.477 ^a ± 4.459	24.832 ^a ± 2.416
	Solución de la quinona del ácido carnósico	0.2583 ^b ± 0.151	5.537 ^a ± 0.077	62.232 ^a ± 1.286	13.346 ^a ± 0.648	72.027 ^a ± 5.358	21.115 ^b ± 3.248
	Control	0.7689 ^a ± 0.725	5.537 ^a ± 0.149	60.822 ^a ± 2.970	13.273 ^a ± 0.968	72.352 ^a ± 5.316	19.829 ^b ± 2.667
Temperatura (°C)	20	0.6736 ^a ± 0.621	5.578 ^a ± 0.124	59.579 ^b ± 1.829	12.803 ^b ± 0.810	74.460 ^a ± 5.585	21.342 ^a ± 3.837
	4	0.2355 ^b ± 0.139	5.540 ^a ± 0.156	62.392 ^a ± 1.729	13.822 ^a ± 0.388	68.777 ^b ± 1.869	22.509 ^a ± 3.044
Tiempo (horas)	0	0.0735 ^b ± 0.0005	5.562 ^b ± 0.024	60.791 ^a ± 1.317	14.027 ^a ± 0.193	66.916 ^c ± 0.489	25.654 ^a ± 2.119
	24	0.5293 ^a ± 0.475	5.467 ^c ± 0.033	61.040 ^a ± 2.054	13.395 ^{ab} ± 0.784	70.749 ^{bc} ± 3.030	22.654 ^b ± 1.225
	48	0.6279 ^a ± 0.507	5.485 ^{bc} ± 0.090	61.175 ^a ± 2.929	13.158 ^b ± 0.738	72.559 ^{ab} ± 3.863	20.150 ^c ± 3.289
	72	0.5877 ^a ± 0.5756	5.721 ^a ± 0.176	60.935 ^a ± 2.695	12.671 ^b ± 0.800	76.250 ^a ± 5.965	19.245 ^c ± 2.790

⁽¹⁾Desviación estándar; ⁽²⁾Superíndices iguales en la columna no son significativamente diferentes

Anexo 23. Luminosidad en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico almacenadas a 20 y 4°C

20°C

Tiempo (horas)	Ácido carnósico	Solución de la quinona del ácido carnósico	Control
0	59.65 ^{Aa(1)(3)} ± 0.87 ⁽²⁾	62.41 ^{Aa} ± 0.44	60.31 ^{Aa} ± 0.48
24	58.89 ^{Aa} ± 0.20	62.34 ^{Aa} ± 0.09	58.24 ^{Aa} ± 0.94
48	58.26 ^{Aa} ± 1.89	61.41 ^{Aa} ± 0.09	57.22 ^{Aa} ± 0.40
72	58.20 ^{Aa} ± 0.75	59.78 ^{Aa} ± 2.14	58.21 ^{Aa} ± 0.21

4°C

Tiempo (horas)	Ácido carnósico	Solución de la quinona del ácido carnósico	Control
0	59.65 ^{Aa(1)(3)} ± 0.87 ⁽²⁾	62.41 ^{Aa} ± 0.44	60.31 ^{Aa} ± 0.48
24	61.45 ^{Aa} ± 1.23	62.63 ^{Aa} ± 0.34	62.67 ^{Aa} ± 2.18
48	61.70 ^{Aa} ± 0.57	63.34 ^{Aa} ± 0.22	65.12 ^{Aa} ± 0.94
72	61.41 ^{Aa} ± 1.64	63.52 ^{Aa} ± 0.00	64.48 ^{Aa} ± 0.77

⁽¹⁾Media de 2 mediciones; ⁽²⁾ Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre compuestos y las minúsculas dentro de cada compuesto)

Anexo 24. Cromaticidad en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico almacenadas a 20 y 4°C

20°C

Tiempo (horas)	Ácido carnósico	Solución de la quinona del ácido carnósico	Control
0	14.075 ^{Aa(1)(3)} ± 0.127 ⁽²⁾	13.883 ^{Aa} ± 0.074	14.122 ^{Aa} ± 0.345
24	12.625 ^{Ab} ± 0.171	13.076 ^{Aab} ± 0.317	12.467 ^{Ab} ± 0.121
48	12.415 ^{Ab} ± 0.162	12.607 ^{Ab} ± 0.258	12.414 ^{Ab} ± 0.154
72	12.056 ^{Ab} ± 0.199	12.249 ^{Ab} ± 0.252	11.646 ^{Ab} ± 0.169

4°C

Tiempo (horas)	Ácido carnósico	Solución de la quinona del ácido carnósico	Control
0	14.075 ^{Aa(1)(3)} ± 0.127 ⁽²⁾	13.883 ^{Aa} ± 0.074	14.122 ^{Aa} ± 0.345
24	14.162 ^{Aa} ± 0.063	13.910 ^{Aa} ± 0.222	14.129 ^{Aa} ± 0.266
48	13.865 ^{Aa} ± 0.019	13.858 ^{Aa} ± 0.012	13.791 ^{Aa} ± 0.532
72	13.280 ^{Aa} ± 0.618	13.303 ^{Aa} ± 0.253	13.492 ^{Aa} ± 0.605

⁽¹⁾Media de 2 mediciones; ⁽²⁾ Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre compuestos y las minúsculas dentro de cada compuesto)

Anexo 25. Tonalidad en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico almacenadas a 20 y 4°C

20°C

Tiempo (horas)	Ácido carnósico	Solución de la quinona del ácido carnósico	Control
0	66.46 ^{Ac(1)(3)} ± 0.40 ⁽²⁾	67.22 ^{Ac} ± 0.72	67.05 ^{Ac} ± 0.001
24	72.71 ^{Ab} ± 0.84	73.92 ^{Ab} ± 0.20	73.76 ^{Ab} ± 0.40
48	73.87 ^{Ab} ± 1.07	76.92 ^{Ab} ± 1.19	76.42 ^{Ab} ± 1.91
72	79.34 ^{Aa} ± 2.05	82.71 ^{Aa} ± 0.88	83.08 ^{Aa} ± 1.22

4°C

Tiempo (horas)	Ácido carnósico	Solución de la quinona del ácido carnósico	Control
0	66.46 ^{Aa(1)(3)} ± 0.40 ⁽²⁾	67.22 ^{Aa} ± 0.72	67.05 ^{Aa} ± 0.001
24	67.30 ^{Aa} ± 0.20	68.08 ^{Aa} ± 0.61	68.70 ^{Aa} ± 2.68
48	68.10 ^{Aa} ± 0.34	69.09 ^{Aa} ± 0.92	70.93 ^{Aa} ± 0.19
72	69.54 ^{Aa} ± 2.00	71.02 ^{Aa} ± 0.17	71.78 ^{Aa} ± 0.60

⁽¹⁾Media de 2 mediciones; ⁽²⁾ Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre compuestos y las minúsculas dentro de cada compuesto)

Anexo 26. pH en pastas cárnicas añadidas con extractos de orégano fresco y seco y romero fresco obtenidos con cloroformo y con etanol, con alta y baja oxidación inicial de lípidos, almacenadas a 20°C

alta oxidación inicial de lípidos

Tiempo (horas)	Romero (cloroformo)	Romero (cloroformo-etanol)	Orégano fresco (cloroformo)	Orégano seco (cloroformo)	Orégano fresco (etanol)	Orégano seco (etanol)	Control
0	5.970 ^{De(1)(2)} ± 0.028 ⁽²⁾	5.985 ^{ABb} ± 0.007	5.990 ^{Aa} ± 0	5.980 ^{Da} ± 0.014	5.905 ^{CDa} ± 0.007	5.950 ^{BCb} ± 0.014	5.910 ^{CDb} ± 0
24	6.030 ^{Aa} ± 0.070	5.950 ^{Aa} ± 0.028	5.945 ^{Aa} ± 0.063	5.935 ^{Aa} ± 0.007	5.945 ^{Aa} ± 0.106	5.980 ^{Aa} ± 0.028	6.005 ^{Aa} ± 0.063
48	6.015 ^{ABb} ± 0.155	6.105 ^{Aa} ± 0	6.010 ^{Aa} ± 0.014	6.025 ^{ABa} ± 0.084	6.005 ^{Aa} ± 0.035	5.985 ^{Aa} ± 0.007	5.475 ^{Ba} ± 0.035
72	6.115 ^{Aa} ± 0.081	6.125 ^{Aa} ± 0.049	6.130 ^{Aa} ± 0.254	6.080 ^{Aa} ± 0.212	6.140 ^{Aa} ± 0.155	6.010 ^{Aa} ± 0.070	5.440 ^{Aa} ± 0.056
Media	6.032 ^A ± 0.277	6.041 ^A ± 0.127	6.018 ^A ± 0.217	6.005 ^A ± 0.189	5.998 ^A ± 0.208	5.983 ^A ± 0.182	5.707 ^A ± 0.150

baja oxidación inicial de lípidos

Tiempo (horas)	Romero (cloroformo)	Romero (cloroformo-etanol)	Orégano fresco (cloroformo)	Orégano seco (cloroformo)	Orégano fresco (etanol)	Orégano seco (etanol)	Control
0	5.845 ^{Aa(1)(3)} ± 0.007 ⁽²⁾	5.860 ^{Aa} ± 0.014	5.880 ^{Aa} ± 0.014	5.855 ^{Aa} ± 0.035	5.870 ^{Aa} ± 0.042	5.840 ^{Aa} ± 0.028	5.590 ^{Aa} ± 0.028
24	5.590 ^{ABb} ± 0	5.335 ^{Ab} ± 0.021	5.620 ^{Aa} ± 0.042	5.630 ^{Aa} ± 0	5.445 ^{ABb} ± 0.134	5.485 ^{Aa} ± 0.120	5.425 ^{Aa} ± 0.007
48	5.225 ^{Cc} ± 0.021	5.310 ^{ABCa} ± 0.028	5.350 ^{ABb} ± 0.042	5.365 ^{Ab} ± 0.007	5.270 ^{BCb} ± 0.028	5.305 ^{ABCa} ± 0.021	5.225 ^{Ca} ± 0.007
72	5.275 ^{ABc} ± 0.134	5.010 ^{Aa} ± 0.014	5.205 ^{Ab} ± 0.035	5.260 ^{Ab} ± 0.070	5.110 ^{Ab} ± 0.014	5.305 ^{Aa} ± 0.021	5.190 ^{Aa} ± 0.127
Media	5.426 ^A ± 0.198	5.353 ^A ± 0.211	5.458 ^A ± 0.203	5.477 ^A ± 0.183	5.373 ^A ± 0.229	5.433 ^A ± 0.157	4.357 ^A ± 0.179

⁽¹⁾Media de 2 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre extractos y las minúsculas dentro de cada extracto)

Anexo 27. pH en pastas cárnicas añadidas con extractos de orégano fresco y seco y romero fresco obtenidos con cloroformo y con etanol, con alta y baja oxidación inicial de lípidos, almacenadas a 4°C

alta oxidación inicial de lípidos

Tiempo (horas)	Romero (cloroformo)	Romero (cloroformo-etanol)	Orégano fresco (cloroformo)	Orégano seco (cloroformo)	Romero (etanol)	Orégano fresco (etanol)	Orégano seco (etanol)	Control
0	5.675 ^{Ab(1)(2)} ± 0.021 ⁽²⁾	5.690 ^{Ab} ± 0.014	5.740 ^{Ab} ± 0.084	5.680 ^{Ab} ± 0.014	5.690 ^{Ab} ± 0.014	5.705 ^{Ab} ± 0.007	5.720 ^{Ab} ± 0.042	5.730 ^{Ab} ± 0
24	5.790 ^{Ab} ± 0.028	5.800 ^{Ab} ± 0.014	5.845 ^{Ab} ± 0.035	5.800 ^{Ab} ± 0.014	5.845 ^{Ab} ± 0.021	5.805 ^{Ab} ± 0.049	5.830 ^{Ab} ± 0.014	5.850 ^{Ab} ± 0.014
48	5.885 ^{Ab} ± 0.007	5.880 ^{Ab} ± 0.014	5.880 ^{Ab} ± 0.028	5.890 ^{Ab} ± 0	5.900 ^{Ab} ± 0	5.870 ^{Ab} ± 0.014	5.880 ^{Ab} ± 0.028	5.895 ^{Ab} ± 0.007
72	5.905 ^{Ab} ± 0.007	5.925 ^{Ab} ± 0.035	5.930 ^{Ab} ± 0.070	5.930 ^{Ab} ± 0	5.910 ^{Ab} ± 0.042	5.900 ^{Ab} ± 0.028	5.950 ^{Ab} ± 0.070	5.915 ^{Ab} ± 0.007
Media	5.813 ^A ± 0.098	5.823 ^A ± 0.098	5.848 ^A ± 0.087	5.825 ^A ± 0.103	5.836 ^A ± 0.095	5.820 ^A ± 0.082	5.845 ^A ± 0.095	5.847 ^A ± 0.077

baja oxidación inicial de lípidos

Tiempo (horas)	Romero (cloroformo)	Romero (cloroformo-etanol)	Orégano fresco (cloroformo)	Orégano seco (cloroformo)	Romero (etanol)	Orégano fresco (etanol)	Orégano seco (etanol)	Control
0	5.520 ^{Ab(1)(2)} ± 0.028 ⁽²⁾	5.490 ^{Ab} ± 0.028	5.535 ^{Ab} ± 0.007	5.515 ^{Ab} ± 0.021	5.490 ^{Ab} ± 0.028	5.510 ^{Ab} ± 0.070	5.485 ^{Ab} ± 0.007	5.480 ^{Ab} ± 0
24	5.500 ^{Ab} ± 0.028	5.485 ^{Ab} ± 0.049	5.525 ^{Ab} ± 0.035	5.505 ^{Ab} ± 0.035	5.530 ^{Ab} ± 0.014	5.485 ^{Ab} ± 0.007	5.535 ^{Ab} ± 0.035	5.550 ^{Ab} ± 0.042
48	5.490 ^{Ab} ± 0.014	5.485 ^{Ab} ± 0.049	5.480 ^{Ab} ± 0	5.505 ^{Ab} ± 0.007	5.485 ^{Ab} ± 0.021	5.435 ^{Ab} ± 0.007	5.440 ^{Ab} ± 0	5.455 ^{Ab} ± 0.021
72	5.505 ^{Ab} ± 0.035	5.485 ^{Ab} ± 0.007	5.475 ^{Ab} ± 0.007	5.475 ^{Ab} ± 0.021	5.445 ^{Ab} ± 0.007	5.425 ^{Ab} ± 0.077	5.480 ^{Ab} ± 0	5.445 ^{Ab} ± 0.021
Media	5.503 ^A ± 0.023	5.481 ^A ± 0.030	5.498 ^A ± 0.036	5.500 ^A ± 0.023	5.482 ^A ± 0.036	5.463 ^A ± 0.054	5.485 ^A ± 0.038	5.477 ^A ± 0.049

⁽¹⁾Media de 2 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre extractos y las minúsculas dentro de cada extracto)

Anexo 28. pH en pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca y sus compuestos con actividad antioxidante

Tiempo (horas)	Extracto de orégano seco	Ácido rosmarínico - extracto de orégano seco	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Camosol - extracto de orégano seco	Camosol - reactivo analítico	Ácido camésico - extracto de orégano seco	Ácido camésico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de orégano seco	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	5.282 ^{CDa(1)(2)} ± 0.017 ⁽²⁾	5.275 ^{DEa} ± 0.012	5.282 ^{CDa} ± 0.017	5.362 ^{Ba} ± 0.017	5.315 ^{Ca} ± 0.012	5.312 ^{Ca} ± 0.017	5.397 ^{Ab} ± 0.015	5.355 ^{Ca} ± 0.007	5.285 ^{CDa} ± 0.007	5.242 ^{Ea} ± 0.017
24	5.385 ^{BCa} ± 0.040	5.417 ^{ABa} ± 0.012	5.355 ^{CDa} ± 0.020	5.420 ^{ABa} ± 0.018	5.347 ^{Ca} ± 0.012	5.325 ^{DEa} ± 0.012	5.352 ^{CDa} ± 0.009	5.365 ^{CDa} ± 0.007	5.455 ^{Aa} ± 0.007	5.297 ^{Ea} ± 0.020
48	5.360 ^{DEa} ± 0.008	5.442 ^{Aab} ± 0.017	5.440 ^{Aa} ± 0.018	5.445 ^{Aa} ± 0.020	5.400 ^{BCa} ± 0.018	5.425 ^{Aa} ± 0.012	5.380 ^{CDa} ± 0.008	5.450 ^{Aa} ± 0.014	5.430 ^{ABa} ± 0.014	5.342 ^{Ea} ± 0.017
72	5.382 ^{Ea} ± 0.009	5.452 ^{BCa} ± 0.017	5.475 ^{ABa} ± 0.012	5.339 ^{Ba} ± 0.012	5.442 ^{Ca} ± 0.012	5.390 ^{EB} ± 0.008	5.430 ^{CDa} ± 0.014	5.485 ^{Aa} ± 0.007	5.410 ^{DEa} ± 0.014	5.337 ^{Fa} ± 0.022
Media	5.355 ^{AB} ± 0.049	5.396 ^A ± 0.075	5.386 ^A ± 0.079	5.390 ^A ± 0.047	5.376 ^A ± 0.062	5.363 ^{AB} ± 0.049	5.390 ^A ± 0.030	5.413 ^A ± 0.059	5.395 ^A ± 0.070	5.305 ^B ± 0.044

Tiempo (horas)	Extracto de romero fresco	Ácido rosmarínico - extracto de romero fresco	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Camosol - extracto de romero fresco	Camosol - reactivo analítico	Ácido camésico - extracto de romero fresco	Ácido camésico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de romero fresco	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	5.887 ^{ABa(1)(2)} ± 0.012 ⁽²⁾	5.865 ^{BCDa} ± 0.009	5.842 ^{CDa} ± 0.009	5.845 ^{CDa} ± 0.012	5.845 ^{CDa} ± 0.012	5.887 ^{ABa} ± 0.009	5.912 ^{Ab} ± 0.015	5.845 ^{CDa} ± 0.021	5.880 ^{Ba} ± 0.014	5.837 ^{Ca} ± 0.015
24	5.900 ^{Ca} ± 0.021	5.885 ^{Ca} ± 0.017	6.015 ^{Aa} ± 0.012	5.915 ^{Ca} ± 0.017	5.917 ^{Ca} ± 0.012	5.905 ^{Ca} ± 0.012	6.027 ^{Aa} ± 0.012	6.035 ^{Aa} ± 0.007	5.970 ^{Ba} ± 0.014	5.980 ^{Ba} ± 0.008
48	5.822 ^{Fa} ± 0.025	5.890 ^{CDa} ± 0.021	5.867 ^{DEa} ± 0.012	5.845 ^{EPa} ± 0.012	6.017 ^{Aa} ± 0.015	5.882 ^{DEa} ± 0.017	6.032 ^{Aa} ± 0.017	5.925 ^{BCa} ± 0.007	5.955 ^{Ba} ± 0.007	6.052 ^{Aa} ± 0.017
72	5.727 ^{Fa} ± 0.029	5.907 ^{BCa} ± 0.018	5.752 ^{Fa} ± 0.020	5.815 ^{Ba} ± 0.026	5.850 ^{DEa} ± 0.029	5.832 ^{EB} ± 0.023	5.942 ^{Ba} ± 0.017	5.895 ^{BCDa} ± 0.007	5.870 ^{CDa} ± 0.014	6.045 ^{Aa} ± 0.030
Media	5.834 ^C ± 0.073	5.886 ^{BC} ± 0.022	5.869 ^{BC} ± 0.098	5.852 ^{BC} ± 0.042	5.905 ^{BC} ± 0.076	5.876 ^{BC} ± 0.031	5.908 ^A ± 0.065	5.922 ^{AB} ± 0.078	5.918 ^{AB} ± 0.048	5.986 ^A ± 0.078

Tiempo (horas)	Extracto de salvia fresca	Ácido rosmarínico - extracto de salvia fresca	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Camosol - extracto de salvia fresca	Camosol - reactivo analítico	Ácido camésico - extracto de salvia fresca	Ácido camésico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de salvia fresca	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	5.562 ^{ABa(1)(2)} ± 0.012 ⁽²⁾	5.577 ^{ABa} ± 0.009	5.550 ^{ABa} ± 0.040	5.575 ^{ABa} ± 0.023	5.530 ^{BCa} ± 0.008	5.487 ^{CDa} ± 0.009	5.595 ^{Ab} ± 0.012	5.550 ^{ABa} ± 0.014	5.460 ^{Df} ± 0.014	5.397 ^{Ea} ± 0.025
24	5.627 ^{Aa} ± 0.022	5.557 ^{CDa} ± 0.022	5.642 ^{Ab} ± 0.020	5.632 ^{Aa} ± 0.023	5.522 ^{DEa} ± 0.027	5.600 ^{ABCa} ± 0.008	5.620 ^{Ab} ± 0.014	5.605 ^{ABa} ± 0.007	5.565 ^{BCDa} ± 0.007	5.510 ^{Ea} ± 0.016
48	5.667 ^{ABa} ± 0.124	5.650 ^{ABa} ± 0.029	5.670 ^{ABa} ± 0.024	5.565 ^{BCDa} ± 0.019	5.515 ^{CDa} ± 0.023	5.627 ^{ABa} ± 0.033	5.685 ^{Aa} ± 0.005	5.685 ^{Aa} ± 0.007	5.615 ^{ABCa} ± 0.007	5.500 ^{Dh} ± 0.018
72	5.722 ^{Aa} ± 0.049	5.652 ^{Ba} ± 0.030	5.717 ^{Aa} ± 0.012	5.625 ^{BCa} ± 0.019	5.590 ^{BCa} ± 0.024	5.577 ^{Ca} ± 0.012	5.635 ^{BCa} ± 0.030	5.720 ^{Aa} ± 0.014	5.770 ^{Aa} ± 0	5.512 ^{Dh} ± 0.037
Media	5.645 ^A ± 0.085	5.609 ^{AB} ± 0.049	5.645 ^A ± 0.067	5.599 ^{ABC} ± 0.036	5.539 ^{CD} ± 0.036	5.573 ^{BC} ± 0.056	5.633 ^{AB} ± 0.037	5.640 ^{AB} ± 0.071	5.602 ^{ABC} ± 0.119	5.480 ^D ± 0.054

(1) Media de 2 mediciones; (2) Desviación estándar; (3) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre compuestos con actividad antioxidante y las minúsculas dentro de cada extracto)

Anexo 29. pH en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico, almacenadas a 20 y 4°C

20°C

Tiempo (horas)	Ácido carnósico	Solución de la quinona del ácido carnósico	Control
0	5.570 ^{Ab(1)(3)} ± 0.018 ⁽²⁾	5.582 ^{Aa} ± 0.012	5.535 ^{Bb} ± 0.012
24	5.502 ^{Ab} ± 0.032	5.457 ^{Ab} ± 0.017	5.420 ^{Ab} ± 0.040
48	5.592 ^{Ab} ± 0.049	5.567 ^{Aa} ± 0.049	5.512 ^{Ab} ± 0.101
72	5.687 ^{Ba} ± 0.060	5.620 ^{Ba} ± 0.046	5.890 ^{Aa} ± 0.029
Media	5.588 ^A ± 0.078	5.556 ^A ± 0.070	5.589 ^A ± 0.191

4°C

Tiempo (horas)	Ácido carnósico	Solución de la quinona del ácido carnósico	Control
0	5.570 ^{Ab(1)(3)} ± 0.018 ⁽²⁾	5.582 ^{Aa} ± 0.012	5.535 ^{Ba} ± 0.012
24	5.462 ^{Ac} ± 0.005	5.482 ^{Ab} ± 0.015	5.480 ^{Ab} ± 0.011
48	5.437 ^{Ac} ± 0.022	5.407 ^{Ac} ± 0.012	5.397 ^{Ac} ± 0.017
72	5.575 ^{Aa} ± 0.019	5.587 ^{Aa} ± 0.017	5.530 ^{Aa} ± 0.029
Media	5.511 ^A ± 0.236	5.514 ^A ± 0.080	5.485 ^A ± 0.059

⁽¹⁾Media de 2 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre compuestos con actividad antioxidante y las minúsculas dentro de cada compuesto)

Anexo 30. Grado de oxidación (TBARS) en pastas cárnicas añadidas con extractos de orégano fresco y seco y romero fresco obtenidos con cloroformo y con etanol, con alta y baja oxidación inicial de lípidos, almacenadas a 20 y 4°C por un total de 72 h

20°C, alta oxidación inicial

Tiempo (horas)	Romero (cloroformo)	Romero (cloroformo-etanol)	Orégano fresco (cloroformo)	Orégano seco (cloroformo)	Orégano fresco (etanol)	Orégano seco (etanol)	Control
0	0.0882 ^{Ab(1)(3)} ± 0.007 ⁽²⁾	0.0882 ^{Ac} ± 0.007	0.0882 ^{Ab} ± 0.007	0.0882 ^{Ab} ± 0.007	0.0882 ^{Ab} ± 0.007	0.0882 ^{Ab} ± 0.007	0.0882 ^{Ab} ± 0.007
24	1.5732 ^{Aa} ± 0.175	2.8147 ^{Ab} ± 0.311	3.5906 ^{Aa} ± 0.218	3.1643 ^{Aa} ± 0.362	2.9204 ^{Aa} ± 0.227	2.6999 ^{Aa} ± 0.783	3.9679 ^{Aa} ± 0.568
48	1.6849 ^{Da} ± 0.355	4.4411 ^{ABa} ± 0.105	5.0137 ^{Aa} ± 0.599	4.4898 ^{ABa} ± 0.122	3.0075 ^{Ca} ± 0.461	3.3722 ^{BCa} ± 0.123	3.3526 ^{BCa} ± 0.153
72	1.9960 ^{Aa} ± 0.181	3.4667 ^{Ab} ± 0.203	3.9959 ^{Aa} ± 0.764	3.6862 ^{Aa} ± 0.832	3.5269 ^{Aa} ± 0.139	3.0394 ^{Aa} ± 0.330	2.8483 ^{Aa} ± 0.098
Media	1.3356 ^A ± 0.804	2.7027 ^A ± 1.734	3.1721 ^A ± 2.017	2.8571 ^A ± 1.815	2.3857 ^A ± 1.453	2.2999 ^A ± 1.426	2.5642 ^A ± 1.601

20°C, baja oxidación inicial

Tiempo (horas)	Romero (cloroformo)	Romero (cloroformo-etanol)	Orégano fresco (cloroformo)	Orégano seco (cloroformo)	Orégano fresco (etanol)	Orégano seco (etanol)	Control
0	0.0123 ^{Ab(1)(3)} ± 0.002 ⁽²⁾	0.0123 ^{Ac} ± 0.002	0.0123 ^{Ab} ± 0.002	0.0123 ^{Ab} ± 0.002	0.0123 ^{Ac} ± 0.002	0.0123 ^{Ad} ± 0.002	0.0123 ^{Ab} ± 0.002
24	1.0206 ^{Cab} ± 0.153	1.4465 ^{BCb} ± 0.065	1.6457 ^{BCa} ± 0.039	1.7696 ^{Ba} ± 0.285	3.1503 ^{Ab} ± 0.279	1.4630 ^{BCc} ± 0.036	2.5368 ^{Aa} ± 0.265
48	1.7104 ^{Ba} ± 0.411	2.5476 ^{Ba} ± 0.190	2.4521 ^{Ba} ± 0.543	2.6117 ^{Ba} ± 0.132	4.3870 ^{Aa} ± 0.052	2.6747 ^{Ba} ± 0.077	2.5557 ^{Ba} ± 0.045
72	1.2645 ^{Ca} ± 0.056	1.7258 ^{BCb} ± 0.246	1.9768 ^{Ba} ± 0.133	1.9561 ^{Ba} ± 0.190	4.0727 ^{Aa} ± 0.060	2.0121 ^{Ba} ± 0.208	2.0821 ^{Ba} ± 0.014
Media	1.0019 ^A ± 0.686	1.4330 ^A ± 0.9852	1.5217 ^A ± 1.003	1.5874 ^A ± 1.037	2.9055 ^A ± 0.983	1.5405 ^A ± 1.052	1.7967 ^A ± 1.124

4°C, alta oxidación inicial

Tiempo (horas)	Romero (cloroformo)	Romero (cloroformo-etanol)	Orégano fresco (cloroformo)	Orégano seco (cloroformo)	Romero (etanol)	Orégano fresco (etanol)	Orégano seco (etanol)	Control
0	0.0458 ^{Ab(1)(3)} ± 0.058 ⁽²⁾	0.0458 ^{Ac} ± 0.058	0.0458 ^{Ac} ± 0.058	0.0458 ^{Ac} ± 0.058	0.0458 ^{Ac} ± 0.058	0.0458 ^{Ac} ± 0.058	0.0458 ^{Ac} ± 0.058	0.0458 ^{Ab} ± 0.058
24	0.1820 ^{BCb} ± 0.023	0.0896 ^{Ca} ± 0.023	0.1477 ^{Ca} ± 0.035	0.2136 ^{BCc} ± 0.036	0.3944 ^{Bbc} ± 0.066	0.1337 ^{Cc} ± 0.057	0.1484 ^{Cc} ± 0.008	0.8905 ^{Ab} ± 0.153
48	0.6919 ^{CDa} ± 0.059	0.6429 ^{Da} ± 0.206	1.3632 ^{ABb} ± 0.141	1.4504 ^{ABb} ± 0.113	0.8643 ^{CDab} ± 0.115	1.0552 ^{BCc} ± 0.054	1.2771 ^{ABb} ± 0.096	1.5277 ^{Aa} ± 0.061
72	0.8942 ^{Ba} ± 0.165	0.7241 ^{Ba} ± 0.280	2.1626 ^{Aa} ± 0.059	1.8833 ^{Aa} ± 0.062	0.9317 ^{Ba} ± 0.152	1.7734 ^{Aa} ± 0.181	1.7503 ^{Aa} ± 0.157	1.7689 ^{Aa} ± 0.263
Media	0.4535 ^A ± 0.381	0.3756 ^A ± 0.357	0.9298 ^A ± 0.943	0.8983 ^A ± 0.841	0.5090 ^A ± 0.359	0.7520 ^A ± 0.782	0.8054 ^A ± 0.782	1.0082 ^A ± 0.741

4°C, baja oxidación inicial

Tiempo (horas)	Romero (cloroformo)	Romero (cloroformo-etanol)	Orégano fresco (cloroformo)	Orégano seco (cloroformo)	Romero (etanol)	Orégano fresco (etanol)	Orégano seco (etanol)	Control
0	0.0231 ^{Ac(1)(3)} ± 0.004 ⁽²⁾	0.0231 ^{Ab} ± 0.004	0.0231 ^{Ab} ± 0.004	0.0231 ^{Ab} ± 0.004	0.0231 ^{Ab} ± 0.004	0.0231 ^{Ab} ± 0.004	0.0231 ^{Ab} ± 0.004	0.0231 ^{Ab} ± 0.004
24	0.0231 ^{Ac} ± 0.012	0.0263 ^{Ab} ± 0.021	0.0102 ^{Ac} ± 0.003	0.0812 ^{Ab} ± 0.070	0.0084 ^{Ab} ± 0.010	0 ^{Ab}	0.0564 ^{Ab} ± 0.079	0.0441 ^{Ab} ± 0.021
48	0.2040 ^{Ba} ± 0.007	0.2065 ^{Bab} ± 0.071	0.2453 ^{Ba} ± 0.130	0.3843 ^{Ba} ± 0.005	0.1858 ^{Ba} ± 0.023	0.4784 ^{ABa} ± 0.038	0.2422 ^{Ba} ± 0.058	0.8050 ^{Aa} ± 0.225
72	0.1436 ^{Cb} ± 0.009	0.2513 ^{BCDa} ± 0.031	0.4235 ^{ABCa} ± 0.143	0.4305 ^{ABCa} ± 0.071	0.2096 ^{CDa} ± 0.061	0.5043 ^{ABa} ± 0.064	0.2593 ^{BCDa} ± 0.026	0.6326 ^{Aa} ± 0.098
Media	0.0984 ^A ± 0.084	0.1267 ^A ± 0.1146	0.1755 ^A ± 0.196	0.2297 ^A ± 0.195	0.1067 ^A ± 0.101	0.2514 ^A ± 0.258	0.1452 ^A ± 0.120	0.3762 ^A ± 0.383

⁽¹⁾Media de 2 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre extractos y las minúsculas dentro de cada extracto)

Anexo 31. Grado de oxidación (TBARS) en pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca almacenadas a 20 y 4°C

20°C

Tiempo (horas)	Orégano seco	Romero fresco	Salvia fresca	Control
0	0.0410 ^{Ad(1)(3)} ± 0.007 ⁽²⁾	0.0410 ^{Ab} ± 0.007	0.0410 ^{Ac} ± 0.007	0.0410 ^{Ad} ± 0.007
24	1.3310 ^{Cc} ± 0.191	1.2748 ^{Cb} ± 0.219	1.8450 ^{Bc} ± 0.272	2.6561 ^{Ac} ± 0.190
48	4.8266 ^{Bb} ± 0.195	3.7199 ^{Ca} ± 0.444	5.5679 ^{Ab} ± 0.213	5.4491 ^{ABb} ± 0.314
72	7.3260 ^{Aa} ± 0.569	5.1973 ^{Aa} ± 1.404	8.2642 ^{Aa} ± 1.788	8.9797 ^{Aa} ± 1.567
Media	3.3811 ^A ± 2.980	2.5582 ^A ± 2.188	3.9295 ^A ± 3.403	4.2815 ^A ± 3.502

4°C

Tiempo (horas)	Orégano seco	Romero fresco	Salvia fresca	Control
0	0.0726 ^{Ab(1)(3)} ± 0.007 ⁽²⁾	0.0726 ^{Ab} ± 0.007	0.0726 ^{Ab} ± 0.007	0.0726 ^{Ab} ± 0.007
24	0.0551 ^{Ab} ± 0.015	0.0421 ^{Ab} ± 0.008	0.0506 ^{Ab} ± 0.018	0.0654 ^{Ab} ± 0.023
48	0.1366 ^{Ab} ± 0.067	0.0817 ^{Ab} ± 0.043	0.1437 ^{Ab} ± 0.063	0.1644 ^{Ab} ± 0.096
72	0.3565 ^{Aa} ± 0.170	0.2688 ^{Aa} ± 0.128	0.3693 ^{Aa} ± 0.1336	0.5592 ^{Aa} ± 0.302
Media	0.1552 ^A ± 0.148	0.1162 ^A ± 0.110	0.1590 ^A ± 0.146	0.2154 ^A ± 0.25

⁽¹⁾Media de 4 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre extractos y las minúsculas dentro de cada extracto)

Anexo 32. Grado de oxidación (TBARS) en pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero seco y salvia fresca y sus compuestos con actividad antioxidante

Orégano seco

Tiempo (horas)	Extracto de orégano seco	Ácido rosmarínico - extracto de orégano seco	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Carnosol - extracto de orégano seco	Carnosol - reactivo analítico	Ácido carnóico - extracto de orégano seco	Ácido carnóico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de orégano seco	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	0.0532 ^{Ad(12)} ± 0.0006 ^{cd}	0.0532 ^{Ad} ± 0.0006	0.0532 ^{Ad} ± 0.0006	0.0532 ^{Ad} ± 0.0006	0.0532 ^{Ad} ± 0.0006	0.0532 ^{Ad} ± 0.0006	0.0532 ^{Ad} ± 0.0006	0.0532 ^{Ad} ± 0.0006	0.0532 ^{Ad} ± 0.0006	0.0532 ^{Ad} ± 0.0006
24	0.1486 ^{bc} ± 0.012	0.2198 ^{bc} ± 0.013	0.4880 ^{bc} ± 0.002	0.1823 ^{bc} ± 0.011	1.1055 ^{bc} ± 0.010	0.5784 ^{bc} ± 0.010	0.5386 ^{bc} ± 0.018	0.8358 ^{bc} ± 0.0007	0.9181 ^{bc} ± 0.0008	0.2385 ^{bc} ± 0.002
48	1.3628 ^{bc} ± 0.0138	3.0850 ^{bc} ± 0.004	3.1616 ^{bc} ± 0.086	1.5780 ^{bc} ± 0.014	4.3789 ^{bc} ± 0.024	2.7778 ^{bc} ± 0.007	3.9028 ^{bc} ± 0.003	4.4281 ^{bc} ± 0.0007	4.4809 ^{bc} ± 0.001	2.7409 ^{bc} ± 0.012
72	2.9850 ^{bc} ± 0.007	4.1555 ^{bc} ± 0.063	5.0400 ^{bc} ± 0.024	3.7812 ^{bc} ± 0.024	5.8880 ^{bc} ± 0.105	4.9380 ^{bc} ± 0.008	5.0881 ^{bc} ± 0.028	4.0425 ^{bc} ± 0	5.2802 ^{bc} ± 0.0007	3.8419 ^{bc} ± 0.037
Media	1.1323 ^A ± 1.202	1.8806 ^A ± 1.823	2.1882 ^A ± 2.078	1.3937 ^A ± 1.524	2.8088 ^A ± 2.3551	2.0850 ^A ± 1.979	2.3884 ^A ± 2.187	2.3393 ^A ± 2.005	2.6854 ^A ± 2.338	1.8886 ^A ± 1.590

Romero seco

Tiempo (horas)	Extracto de romero fresco	Ácido rosmarínico - extracto de romero fresco	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Carnosol - extracto de romero fresco	Carnosol - reactivo analítico	Ácido carnóico - extracto de romero fresco	Ácido carnóico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de romero fresco	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	0.0775 ^{Ad(12)} ± 0.0007 ^{cd}	0.0775 ^{Ad} ± 0.0007	0.0775 ^{Ad} ± 0.0007	0.0775 ^{Ad} ± 0.0007	0.0775 ^{Ad} ± 0.0007	0.0775 ^{Ad} ± 0.0007	0.0775 ^{Ad} ± 0.0007	0.0775 ^{Ad} ± 0.0007	0.0775 ^{Ad} ± 0.0007	0.0775 ^{Ad} ± 0.0007
24	0.1061 ^{bc} ± 0.003	0.2218 ^{bc} ± 0.006	0.1862 ^{bc} ± 0.017	0.2048 ^{bc} ± 0.010	0.1841 ^{bc} ± 0.014	0.2388 ^{bc} ± 0.017	0.2413 ^{bc} ± 0.014	0.2006 ^{bc} ± 0.0004	0.2002 ^{bc} ± 0.0008	0.2487 ^{bc} ± 0.009
48	0.1158 ^{bc} ± 0.001	0.2413 ^{bc} ± 0.035	0.2483 ^{bc} ± 0.009	0.1888 ^{bc} ± 0.020	0.2087 ^{bc} ± 0.008	0.1830 ^{bc} ± 0.010	0.2289 ^{bc} ± 0.007	0.1886 ^{bc} ± 0.0004	0.2189 ^{bc} ± 0.0004	0.2888 ^{bc} ± 0.003
72	0.0805 ^{bc} ± 0.008	0.2808 ^{bc} ± 0.018	0.2945 ^{bc} ± 0.013	0.1725 ^{bc} ± 0.008	0.1783 ^{bc} ± 0.002	0.1655 ^{bc} ± 0.001	0.1870 ^{bc} ± 0.007	0.2288 ^{bc} ± 0.0004	0.2384 ^{bc} ± 0.0004	0.3313 ^{bc} ± 0.022
Media	0.0890 ^C ± 0.017	0.2078 ^{AB} ± 0.085	0.2018 ^{AB} ± 0.082	0.1808 ^B ± 0.051	0.1824 ^B ± 0.052	0.1687 ^B ± 0.060	0.1837 ^{AB} ± 0.071	0.1781 ^B ± 0.056	0.1841 ^{AB} ± 0.084	0.2315 ^A ± 0.098

Salvia fresca

Tiempo (horas)	Extracto de salvia fresca	Ácido rosmarínico - extracto de salvia fresca	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Carnosol - extracto de salvia fresca	Carnosol - reactivo analítico	Ácido carnóico - extracto de salvia fresca	Ácido carnóico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de salvia fresca	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	0.0784 ^{Ad(12)} ± 0.001 ^{cd}	0.0784 ^{Ad} ± 0.001	0.0784 ^{Ad} ± 0.001	0.0784 ^{Ad} ± 0.001	0.0784 ^{Ad} ± 0.001	0.0784 ^{Ad} ± 0.001	0.0784 ^{Ad} ± 0.001	0.0784 ^{Ad} ± 0.001	0.0784 ^{Ad} ± 0.001	0.0784 ^{Ad} ± 0.001
24	0.1813 ^{bc} ± 0.002	0.1832 ^{bc} ± 0.018	0.2081 ^{bc} ± 0.008	0.2048 ^{bc} ± 0.018	0.2525 ^{bc} ± 0.016	0.1646 ^{bc} ± 0.003	0.1877 ^{bc} ± 0.038	0.2258 ^{bc} ± 0.003	0.2438 ^{bc} ± 0.001	0.2858 ^{bc} ± 0.020
48	0.2137 ^{bc} ± 0.015	0.3376 ^{bc} ± 0.008	0.3389 ^{bc} ± 0.007	0.4116 ^{bc} ± 0.010	0.4795 ^{bc} ± 0.076	0.2886 ^{bc} ± 0.017	0.4144 ^{bc} ± 0.046	0.3087 ^{bc} ± 0.001	0.4588 ^{bc} ± 0.0007	0.5708 ^{bc} ± 0.013
72	0.2180 ^{bc} ± 0.002	0.3378 ^{bc} ± 0.023	0.3898 ^{bc} ± 0.007	0.4467 ^{bc} ± 0.005	0.4489 ^{bc} ± 0.081	0.4832 ^{bc} ± 0.012	0.5338 ^{bc} ± 0.007	0.5035 ^{bc} ± 0.0008	0.8045 ^{bc} ± 0.0004	0.8452 ^{bc} ± 0.020
Media	0.1873 ^C ± 0.057	0.2342 ^{BC} ± 0.113	0.2558 ^{ABC} ± 0.128	0.2804 ^{ABC} ± 0.1802	0.3147 ^{ABC} ± 0.174	0.2512 ^{ABC} ± 0.158	0.3038 ^{ABC} ± 0.185	0.2802 ^{ABC} ± 0.158	0.3819 ^{AB} ± 0.189	0.3898 ^A ± 0.234

(1) Media de 2 mediciones; (2) Desviación estándar; (3) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre compuestos con actividad antioxidante y las minúsculas dentro de cada compuesto)

Anexo 33. Grado de oxidación (TBARS) en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico almacenadas a 20 y 4°C

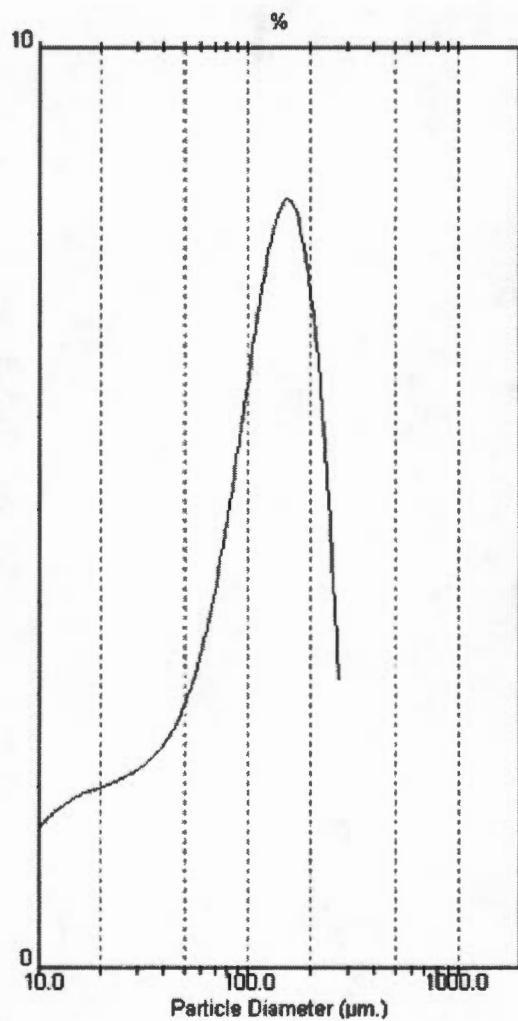
20°C

Tiempo (horas)	Ácido carnósico	Solución de la quinona del ácido carnósico	Control
0	$0.0735^{Ac(1)(3)} \pm 0.0006^{(2)}$	$0.0735^{Ad} \pm 0.0006$	$0.0735^{Ab} \pm 0.0006$
24	$0.6503^{Ba} \pm 0.0232$	$0.5152^{Ca} \pm 0.0979$	$1.4858^{Aa} \pm 0.0237$
48	$0.6323^{Bab} \pm 0.0255$	$0.4100^{Bb} \pm 0.0108$	$1.6766^{Aa} \pm 0.3561$
72	$0.5881^{Bb} \pm 0.0548$	$0.2326^{Bc} \pm 0.0631$	$1.6723^{Aa} \pm 0.6957$
Media	$0.4860^B \pm 0.2462$	$0.3078^B \pm 0.1808$	$1.2270^A \pm 0.7758$

4°C

Tiempo (horas)	Ácido carnósico	Solución de la quinona del ácido carnósico	Control
0	$0.0735^{Ad(1)(3)} \pm 0.0006(2)$	$0.0735^{Ad} \pm 0.0006$	$0.0735^{Ad} \pm 0.0006$
24	$0.1475^{Bc} \pm 0.0060$	$0.1788^{Ac} \pm 0.0223$	$0.1981^{Ac} \pm 0.0033$
48	$0.2800^{Ba} \pm 0.0169$	$0.3112^{Ba} \pm 0.0110$	$0.4575^{Ab} \pm 0.0265$
72	$0.2472^{Cb} \pm 0.0103$	$0.2717^{Bb} \pm 0.0045$	$0.5142^{Aa} \pm 0.0112$
Media	$0.1870^B \pm 0.0840$	$0.2088^B \pm 0.0944$	$0.3108^A \pm 0.1860$

⁽¹⁾Media de 2 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre compuestos y las minúsculas dentro de cada compuesto)

Anexo 34. Distribución de tamaño de partícula (μm) de la emulsión cárnica estudiada

Anexo 35. Diámetro de partícula (μm) en pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca almacenadas a 20 y 4°C

20°C

Tiempo (horas)	Orégano seco	Romero fresco	Salvia fresca	Control
0	16.369 ^{Bc(1)(3)} $\pm$ 0.532 ⁽²⁾	18.445 ^{Ac} $\pm$ 2.980	16.759 ^{ABc} $\pm$ 0.749	16.160 ^{Ba} $\pm$ 0.578
24	17.772 ^{Abc} $\pm$ 1.554	19.255 ^{Abc} $\pm$ 2.150	18.465 ^{Ab} $\pm$ 2.203	17.235 ^{Aa} $\pm$ 2.651
48	18.844 ^{Bb} $\pm$ 2.276	21.050 ^{Ab} $\pm$ 2.379	19.308 ^{ABb} $\pm$ 1.556	16.610 ^{Ca} $\pm$ 0.925
72	20.801 ^{Ba} $\pm$ 2.007	23.616 ^{Aa} $\pm$ 1.108	22.395 ^{Aa} $\pm$ 0.929	17.415 ^{Ca} $\pm$ 0.990
Media	18.446 ^B $\pm$ 2.337	20.592 ^A $\pm$ 2.965	19.232 ^B $\pm$ 2.510	16.855 ^C $\pm$ 1.552

4°C

Tiempo (horas)	Orégano seco	Romero fresco	Salvia fresca	Control
0	17.025 ^{ABb(1)(3)} $\pm$ 0.907 ⁽²⁾	18.502 ^{Ab} $\pm$ 1.674	17.460 ^{ABa} $\pm$ 1.436	16.267 ^{Bb} $\pm$ 1.210
24	17.735 ^{Bab} $\pm$ 1.292	20.102 ^{Aab} $\pm$ 1.120	18.342 ^{Ba} $\pm$ 1.865	17.827 ^{Ba} $\pm$ 1.639
48	18.673 ^{Ba} $\pm$ 0.946	20.915 ^{Aa} $\pm$ 1.111	18.720 ^{Ba} $\pm$ 2.019	18.385 ^{Ba} $\pm$ 0.768
72	17.952 ^{Bab} $\pm$ 0.593	20.380 ^{Aa} $\pm$ 1.793	17.674 ^{Ba} $\pm$ 0.597	17.856 ^{Ba} $\pm$ 1.178
Media	17.846 ^B $\pm$ 1.108	19.975 ^A $\pm$ 1.678	18.049 ^B $\pm$ 1.611	17.584 ^B $\pm$ 1.440

⁽¹⁾Media de 4 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre extractos y las minúsculas dentro de cada extracto)

Anexo 36. Diámetro de partícula (μm) en pastas cárnicas añadidas con extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca, y sus compuestos con actividad antioxidante

Orégano seco y compuestos antioxidantes

Tiempo (horas)	Extracto de orégano seco	Ácido rosmarínico - extracto de orégano seco	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Carnosol - extracto de orégano seco	Carnosol - reactivo analítico	Ácido carnósico - extracto de orégano seco	Ácido carnósico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de orégano seco	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	15.728 ^{BC1E1E} $\pm$ 1.453 ⁽²⁾	13.426 ^{BA} $\pm$ 0.514	12.683 ^B $\pm$ 0.680	13.341 ^{BA} $\pm$ 0.289	14.970 ^{CC} $\pm$ 0.417	13.981 ^{DB} $\pm$ 0.367	17.081 ^{AB} $\pm$ 0.436	16.493 ^{AB} $\pm$ 0.630	16.393 ^{BA} $\pm$ 0.755	12.486 ^{BA} $\pm$ 0.264
24	14.703 ^{BA} $\pm$ 0.416	13.655 ^{CC} $\pm$ 0.386	13.075 ^{CC} $\pm$ 0.219	12.833 ^{BA} $\pm$ 0.655	14.080 ^{CC} $\pm$ 1.031	13.788 ^{CC} $\pm$ 0.382	17.118 ^{AB} $\pm$ 0.571	16.853 ^{AB} $\pm$ 0.794	16.398 ^{BA} $\pm$ 0.454	12.028 ^{BA} $\pm$ 0.460
48	16.245 ^{CA} $\pm$ 0.953	14.475 ^{CC} $\pm$ 1.029	14.226 ^{CC} $\pm$ 0.367	14.373 ^{BA} $\pm$ 0.863	16.208 ^{CC} $\pm$ 0.388	15.308 ^{CC} $\pm$ 0.688	17.948 ^{AB} $\pm$ 0.336	16.580 ^{AB} $\pm$ 0.515	17.858 ^{AB} $\pm$ 1.623	12.981 ^{BA} $\pm$ 1.307
72	15.840 ^{CC} $\pm$ 1.004	14.180 ^{CC} $\pm$ 2.043	14.345 ^{CC} $\pm$ 0.756	13.488 ^{DB} $\pm$ 1.059	15.879 ^{CC} $\pm$ 0.705	15.588 ^{CC} $\pm$ 1.073	16.708 ^{AB} $\pm$ 0.780	17.678 ^{AB} $\pm$ 1.575	17.083 ^{AB} $\pm$ 0.488	12.795 ^{BA} $\pm$ 0.562
Media	15.629 ^B $\pm$ 1.136	13.934 ^D $\pm$ 1.185	13.586 ^D $\pm$ 0.883	13.511 ^D $\pm$ 0.916	15.285 ^B $\pm$ 1.057	14.858 ^{BC} $\pm$ 1.042	17.713 ^A $\pm$ 0.858	16.850 ^A $\pm$ 1.099	16.932 ^A $\pm$ 1.030	12.582 ^C $\pm$ 0.794

Romero fresco y compuestos antioxidantes

Tiempo (horas)	Extracto de romero fresco	Ácido rosmarínico - extracto de romero fresco	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Carnosol - extracto de romero fresco	Carnosol - reactivo analítico	Ácido carnósico - extracto de romero fresco	Ácido carnósico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de romero fresco	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	23.938 ^{BA1E1E} $\pm$ 0.434 ⁽²⁾	18.471 ^{BA} $\pm$ 1.087	15.781 ^{CB} $\pm$ 2.474	24.873 ^{AB} $\pm$ 1.805	18.941 ^{BA} $\pm$ 0.868	25.903 ^{AB} $\pm$ 1.793	28.051 ^{AB} $\pm$ 0.154	16.658 ^{AB} $\pm$ 0.170	16.000 ^{AB} $\pm$ 0.867	13.048 ^{BA} $\pm$ 1.520
24	22.128 ^{BA} $\pm$ 1.046	18.211 ^{BA} $\pm$ 0.875	18.618 ^{CA} $\pm$ 1.380	24.171 ^{BA} $\pm$ 1.401	19.881 ^{CA} $\pm$ 1.892	27.100 ^{AB} $\pm$ 1.636	23.883 ^{BA} $\pm$ 2.567	16.533 ^{BA} $\pm$ 0.368	18.213 ^{BA} $\pm$ 1.913	14.523 ^{BA} $\pm$ 0.881
48	19.780 ^{CA} $\pm$ 1.267	16.641 ^{BA} $\pm$ 1.041	13.383 ^{BA} $\pm$ 0.916	22.148 ^{BA} $\pm$ 0.670	14.980 ^{BA} $\pm$ 0.808	27.440 ^{AB} $\pm$ 0.884	22.488 ^{CA} $\pm$ 1.408	14.056 ^{BA} $\pm$ 0.186	17.900 ^{BA} $\pm$ 0.864	10.273 ^{BA} $\pm$ 1.027
72	20.891 ^{CA} $\pm$ 1.137	17.213 ^{BA} $\pm$ 1.230	15.046 ^{BA} $\pm$ 2.089	23.448 ^{BA} $\pm$ 1.023	16.981 ^{BA} $\pm$ 1.534	31.706 ^{AB} $\pm$ 1.304	23.946 ^{BA} $\pm$ 1.003	15.838 ^{BA} $\pm$ 0.637	17.846 ^{BA} $\pm$ 0.937	12.240 ^{BA} $\pm$ 0.578
Media	21.679 ^C $\pm$ 1.848	16.884 ^{BA} $\pm$ 1.533	15.762 ^{BA} $\pm$ 2.630	23.880 ^B $\pm$ 1.567	17.613 ^D $\pm$ 2.183	28.037 ^A $\pm$ 2.615	24.116 ^B $\pm$ 2.500	15.720 ^{BA} $\pm$ 2.285	17.480 ^B $\pm$ 1.400	12.521 ^D $\pm$ 2.190

Salvia fresca y compuestos antioxidantes

Tiempo (horas)	Extracto de salvia fresca	Ácido rosmarínico - extracto de salvia fresca	Ácido rosmarínico - reactivo analítico	Carnosol - extracto de salvia fresca	Carnosol - reactivo analítico	Ácido carnósico - extracto de salvia fresca	Ácido carnósico - reactivo analítico	Compuesto X - extracto de salvia fresca	Compuesto X - reactivo analítico	Control
0	18.238 ^{BA1E1E} $\pm$ 0.886 ⁽²⁾	18.273 ^{BA} $\pm$ 0.704	17.816 ^{BA} $\pm$ 1.846	18.700 ^{BA} $\pm$ 0.862	19.373 ^{BA} $\pm$ 0.873	18.463 ^{BA} $\pm$ 0.312	20.036 ^{BA} $\pm$ 2.610	18.953 ^{BA} $\pm$ 0.386	18.010 ^{BA} $\pm$ 0.608	17.333 ^{BA} $\pm$ 1.308
24	17.576 ^{BA} $\pm$ 1.589	14.380 ^{BA} $\pm$ 0.795	16.978 ^{BA} $\pm$ 2.141	17.418 ^{BA} $\pm$ 1.441	17.780 ^{BA} $\pm$ 0.882	17.958 ^{BA} $\pm$ 1.700	17.880 ^{BA} $\pm$ 1.305	17.730 ^{BA} $\pm$ 1.515	18.380 ^{BA} $\pm$ 0.205	13.533 ^{BA} $\pm$ 0.583
48	18.210 ^{BA} $\pm$ 1.122	14.851 ^{CA} $\pm$ 1.072	16.483 ^{BA} $\pm$ 0.467	15.428 ^{BA} $\pm$ 0.295	16.748 ^{BA} $\pm$ 0.418	16.513 ^{BA} $\pm$ 0.918	17.183 ^{BA} $\pm$ 0.815	16.473 ^{BA} $\pm$ 0.218	16.733 ^{BA} $\pm$ 0.287	13.410 ^{BA} $\pm$ 0.365
72	16.208 ^{BA} $\pm$ 1.338	14.518 ^{CA} $\pm$ 1.889	15.480 ^{BA} $\pm$ 0.801	15.240 ^{BA} $\pm$ 0.618	16.088 ^{BA} $\pm$ 1.551	16.463 ^{BA} $\pm$ 0.773	17.071 ^{BA} $\pm$ 1.101	16.008 ^{BA} $\pm$ 0.383	15.808 ^{BA} $\pm$ 0.670	13.920 ^{BA} $\pm$ 0.424
Media	17.307 ^A $\pm$ 1.898	15.528 ^B $\pm$ 2.008	16.634 ^{BA} $\pm$ 1.552	16.688 ^{BA} $\pm$ 1.614	17.491 ^A $\pm$ 1.385	17.588 ^A $\pm$ 1.513	18.047 ^A $\pm$ 1.932	17.280 ^B $\pm$ 1.254	17.236 ^B $\pm$ 1.151	14.548 ^D $\pm$ 1.802

(1) Media de 2 mediciones; (2) Desviación estándar; (3) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre compuestos y las minúsculas dentro de cada compuesto)

Anexo 37. Diámetro de partícula (μm) en pastas cárnicas añadidas con ácido carnósico y solución de la quinona del ácido carnósico almacenadas a 20 y 4°C

20°C

Tiempo (horas)	Ácido carnósico	Solución de la quinona del ácido carnósico	Control
0	26.848 ^{Aa(1)(3)} $\pm$ 1.317 ⁽²⁾	22.498 ^{Ba} $\pm$ 0.919	21.581 ^{Ba} $\pm$ 1.127
24	26.293 ^{Aa} $\pm$ 2.184	22.171 ^{Ba} $\pm$ 1.223	21.741 ^{Ba} $\pm$ 0.264
48	25.185 ^{Aa} $\pm$ 3.194	18.841 ^{Bb} $\pm$ 0.764	18.755 ^{Bb} $\pm$ 0.547
72	21.308 ^{Ab} $\pm$ 1.074	15.855 ^{Bc} $\pm$ 0.750	15.033 ^{Bc} $\pm$ 0.723
Media	24.908 ^A $\pm$ 2.961	19.841 ^B $\pm$ 2.902	19.277 ^B $\pm$ 2.865

4°C

Tiempo (horas)	Ácido carnósico	Solución de la quinona del ácido carnósico	Control
0	26.848 ^{Aa(1)(3)} $\pm$ 1.317 ⁽²⁾	22.498 ^{Ba} $\pm$ 0.919	21.581 ^{Ba} $\pm$ 1.127
24	24.546 ^{Ab} $\pm$ 1.161	24.021 ^{Aa} $\pm$ 0.740	21.753 ^{Ba} $\pm$ 0.585
48	24.206 ^{Ab} $\pm$ 1.868	22.128 ^{Aa} $\pm$ 4.838	19.356 ^{Aa} $\pm$ 2.878
72	23.426 ^{Ab} $\pm$ 0.385	20.911 ^{Aa} $\pm$ 3.758	18.835 ^{Aa} $\pm$ 2.855
Media	24.757 ^A $\pm$ 1.776	22.390 ^B $\pm$ 3.122	20.381 ^C $\pm$ 2.385

⁽¹⁾Media de 2 mediciones; ⁽²⁾Desviación estándar; ⁽³⁾Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas indican diferencias entre compuestos y las minúsculas dentro de cada compuesto).

RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN EN EL TEMA

Se recomienda probar otros sistemas de extracción como el dióxido de carbono (CO₂) supercrítico y comparar la concentración de compuestos con actividad antioxidante con los dos sistemas utilizados en este trabajo de investigación, reflujo y maceración utilizando como disolventes cloroformo y etanol, respectivamente.

Para corroborar los resultados sobre la oxidación de lípidos, es necesario cuantificar los volátiles, como productos secundarios de oxidación. Asimismo, es importante analizar la concentración de metamioglobina, oximioglobina y mioglobina por métodos espectrofotométricos con el fin de conocer el cambio preciso del color de las pastas, sin que influya la coloración de los extractos.

Debido a que no se cuenta con información relacionada con la actividad antimicrobiana del extracto de salvia, es recomendable realizar estos estudios a diferentes temperaturas de almacenamiento.

Como resultado de esta tesis se obtuvieron conocimientos acerca del mecanismo antioxidante de los compuestos en forma individual, y formando parte de los extractos. Sin embargo, es necesario estudiar la estabilidad de los compuestos a diferentes valores de pH, el efecto de añadir los compuestos antioxidantes en diferentes concentraciones, y posteriormente estudiar los cambios en las propiedades fisicoquímicas y funcionales en las pastas; de igual forma, es necesario llevar a cabo estudios sobre la influencia de los extractos etanólicos de orégano seco, romero fresco y salvia fresca en la ultraestructura de las pastas.

De principal importancia es la determinación de la estructura del compuesto "X", así como la identificación de los otros compuestos presentes en los extractos de las hierbas estudiadas.

Dado que el hecho de incorporar los extractos a la pasta produciría un alimento funcional, es recomendable elaborar un producto alimenticio real, similar a la pasta estudiada en esta tesis. En este alimento se deberán analizar las características texturales, fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales. Para complementar esta información, es necesario estudiar la posible absorción de los compuestos mayoritarios, presentes en los extractos en el tracto intestinal, con el fin de determinar su efecto en la

salud humana.

Consideraciones del uso de antioxidantes en alimentos

Existen diferencias en el comportamiento de los antioxidantes en diferentes clases de alimentos; sin embargo, algunas consideraciones deben de ser tomadas en cuenta para la aplicación de éstos en los productos alimenticios.

a) Evitar altas temperaturas de oxidación durante el almacenamiento, debido a que los mecanismos y cinéticas de oxidación son diferentes cuando son estudiados en menores temperaturas.

b) El alimento no debe contener altos niveles de productos de oxidación de lípidos, debido a que algunos de ellos, como el hexanal y el 2,4-decadial, pueden actuar como prooxidantes (Decker y col., 2005). Los niveles altos de productos de oxidación preexistentes pueden provocar la rápida descomposición de los antioxidantes, alterando los resultados de su efectividad (Coppen, 1994; Decker, 1998; Decker y col., 2005).

c) Es necesario cuantificar los productos primarios (hidroperóxidos, dienos conjugados) y secundarios (carbonilos, compuestos volátiles) de la oxidación, debido a que, en algunos casos, los antioxidantes pueden incrementar la concentración de productos primarios de oxidación al donar hidrógeno a los radicales peroxilo para formar hidroperóxidos. Simultáneamente disminuyen la formación de productos secundarios de oxidación (volátiles de bajo peso molecular). Del mismo modo, otros antioxidantes pueden disminuir la concentración de hidroperóxidos. Por otro lado, pueden incrementar la cantidad de productos secundarios que causan la rancidez (Ockerman, 1980; Decker y col., 2005). De esta manera, si únicamente se midiera la concentración de hidroperóxidos para evaluar a un antioxidante, como es el caso de un extracto en un sistema con concentración alta en hierro, pudiera parecer que actúa como antioxidante debido a que los hidroperóxidos no se acumulan como resultado de su fraccionamiento a productos volátiles de oxidación. También es posible que los compuestos nucleofílicos formen complejos con aldehídos; es decir, si únicamente se midiera la concentración de aldehídos como un índice de oxidación de lípidos, algunos compuestos pudieran comportarse como antioxidantes, ya que éstos pueden formar complejos con los aldehídos, y no afectar a otros volátiles producidos durante la oxidación (Frankel y col., 1996; Decker y col., 2005).

d) Es recomendable evaluar compuestos puros como fuente de antioxidantes, en lugar de los extractos, para dilucidar el mecanismo de acción de los compuestos por sí mismos y en combinación con otros componentes del alimento. Si los compuestos fenólicos son los principales antioxidantes en un extracto crudo, se deben reportar datos del contenido de fenoles totales y de la composición del extracto.

e) Es importante utilizar como modelo de estudio a un alimento cuyo contenido de antioxidantes y prooxidantes endógenos sea constante, debido a que los antioxidantes que se desean estudiar probablemente interactúen con ellos, pudiendo alterar la cinética de oxidación. Al respecto, las fuentes de las cuales provienen los alimentos pueden tener grandes diferencias en las concentraciones de antioxidantes y prooxidantes debido a factores estacionales, geográficos, genéticos y de edad.

f) El pH puede afectar las reacciones oxidativas al tener influencia en la actividad de los prooxidantes (la solubilidad del hierro se incrementa conforme desciende el pH) (Decker y col., 2005) y de los antioxidantes (el pH puede alterar la carga de los antioxidantes, lo cual puede afectar su solubilidad y capacidad de secuestro); por lo tanto, el pH de los modelos de oxidación deberá ser similar al del alimento de interés (Frankel y col., 1996; Friedman y Jürgens, 2000; Decker y col., 2005).

g) Estandarizar el tiempo y condiciones de estudio para determinar la eficiencia del antioxidante. Los cálculos a realizar deberán ser hechos con datos obtenidos desde los estados iniciales de oxidación debido a que conforme transcurre el tiempo de almacenamiento la concentración de los productos de oxidación puede permanecer constante o disminuir. La evaluación estadística deberá utilizarse para detectar diferencias entre los controles (sin antioxidante) y las muestras.

h) Si el alimento es una emulsión aceite en agua, debe tomarse en cuenta que la membrana interfacial es determinante de la cinética de oxidación. Las gotas cargadas en una emulsión aniónica atraerán a los metales de transición y se incrementará la interacción metal-lípido; como consecuencia, aumentará la velocidad de oxidación. Por otra parte, la carga de las gotas puede atraer antioxidantes de carga opuesta y modificar su distribución en las fases. Otra propiedad de la membrana interfacial que puede afectar la oxidación de lípidos es su grosor; si la membrana es gruesa disminuirán las interacciones metal-lípido.

i) Cuando se trate de alimentos a base de carne se deberá tomar en cuenta que la estabilidad oxidativa del músculo esquelético puede tener amplias variaciones entre un animal y otro, aún dentro de la misma especie. Además que durante el almacenamiento

se puede presentar la disminución de antioxidantes endógenos y la formación de prooxidantes (Decker y col., 2005).

PRODUCTIVIDAD DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

Asistencia a congresos:

2005:

- XXVI Encuentro Nacional AMIDIQ, presentando el trabajo "Efecto antioxidante de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y de salvia de bolita (*Buddleia perfoliata* Kunth) en una pasta de carne cruda de cerdo". Celebrado en Acapulco, Gro. del 3 al 6 de mayo.
- Second International Congress on Antioxidant Methods, presentando el trabajo "Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Mexican sage (*Buddleia perfoliata* Kunth) extracts on a pork meat batter". Celebrado en Orlando, Florida, E. U. A. del 22 al 24 de junio.
- Institute of Food Technologists Annual Meeting, presentando el trabajo "Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Mexican sage (*Buddleia perfoliata* Kunth) extracts on raw pork batters". Celebrado en Nueva Orleans, Luisiana, E. U. A. del 16 al 20 de julio.

2006:

- XXVII Encuentro Nacional AMIDIQ, presentando el trabajo "Efecto antioxidante de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y de orégano mexicano (*Lippia* spp) en una pasta de carne cruda de cerdo". Celebrado en Zihuatanejo, Gro. del 2 al 5 de mayo.
- Institute of Food Technologists Annual Meeting, presentando el trabajo "Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Mexican oregano (*Lippia* spp) extracts in a raw pork batter". Celebrado en Orlando, Florida, E. U. A. del 24 al 28 de junio.

2007:

- XXVIII Encuentro Nacional AMIDIQ, presentando el trabajo "Efecto de la concentración de fenoles totales, ácido rosmarínico y ácido carnósico sobre la actividad antioxidante de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y de orégano mexicano (*Lippia* spp)". Celebrado en Manzanillo, Col. del 1 al 4 de mayo.
- Institute of Food Technologists Annual Meeting, presentando el trabajo "Antioxidant activity of phenol compounds in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), sage (*Buddleia perfoliata* Kunth) and Mexican oregano (*Lippia* spp) extracts on model pork batters". Celebrado en Chicago, Illinois, E. U. A. del 27 de julio al 1 de agosto.
- Tercera Reunión Nacional sobre Orégano, presentando el trabajo "Efecto antioxidante de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), de salvia de bolita (*Buddleia perfoliata* Kunth) y de orégano mexicano (*Lippia* spp)" en pastas cárnicas. Celebrado en Saltillo, Coah. del 22 al 24 de agosto.

- Sexto Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA VI), presentando el trabajo "Efecto antioxidante del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y sus compuestos ácido rosmarínico, carnosol y ácido carnósico en una pasta cárnica". Celebrado en Ambato, Ecuador del 5 al 8 de noviembre.

2008:

- XXIX Encuentro Nacional AMIDIQ, presentando el trabajo "Efecto del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y sus ácidos fenólicos rosmarínico y carnósico sobre las propiedades fisicoquímicas de una pasta cárnica". Celebrado en Puerto Vallarta, Jal. del 13 al 16 de mayo.
- Quinta Reunión Nacional de Investigación en Productos Naturales, presentando el trabajo "Efecto del tiempo de maceración sobre la actividad antioxidante de los extractos de salvia de bolita (*Buddleia perfoliata* Kunth) y de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)". Celebrada en Guadalajara, Jal. del 28 al 31 de mayo.
- Institute of Food Technologists Annual Meeting, presentando el trabajo "Effect of orégano (*Origanum vulgare* L.) extract, rosmarinic and carnosic acids added to raw pork batter on some physicochemical properties". Celebrado en Nueva Orleans, Louisiana, E. U. A. del 28 de junio al 1 de julio.
- XI Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos, presentando el trabajo "Efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de una pasta cárnica cruda del extracto de salvia de bolita (*Buddleia perfoliata* Kunth) y sus ácidos carnósico y rosmarínico". Celebrada en La Habana, Cuba del 12 al 17 de octubre.

Asistencia a cursos y seminarios:

- Cromatografía de gases: principios básicos y manejo de equipo. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Del 18 al 22 de julio de 2005.
- Reología general. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. 8 de septiembre de 2005.
- El papel de la carne de cerdo en la alimentación y la salud humana. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". 27 y 28 de septiembre de 2007.
- Curso teórico-práctico sobre capacidad antioxidante en alimentos. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria de Cuba. 12 y 13 de octubre de 2008.

Colaboración en la escritura del capítulo del libro:

- Emulsions and gelations: Applications. En: Handbook of Poultry Science and Technology. Volume II. Methods in processing poultry products. Isabel Guerrero-Legarreta (Editor en jefe), J. Wiley and Sons, Holbon, 2009. ISBN: 978-0-470-18553-7.

Artículo publicado:

- "Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters", para su publicación en la revista Meat Science. 2009, 81(2):410-417.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Meat Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meatsci

Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters

E. Hernández-Hernández^a, E. Ponce-Alquicira^a, M.E. Jaramillo-Flores^b, I. Guerrero Legarreta^{a,*}

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, Apartado Postal 55-535, México D.F. 09340, Mexico

^b Departamento de Graduados e Investigación de Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Plan de Ayala y Carpio, Apartado Postal 42-186, México D.F. 11340, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 August 2008

Received in revised form 11 September 2008

Accepted 15 September 2008

Keywords:

Antioxidants
Phenol compounds
Rosemary
Oregano
Meat batter

ABSTRACT

Herbs and spices are traditional used as food ingredients as well as for their antioxidant properties. The objective of this work was to study the concentration of carnosol, rosmarinic and carnosic acids in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano leaves (*Origanum vulgare* L.), and their effect on the oxidation and colour of model pork batters. Extracts were obtained by maceration with ethanol and reflux with chloroform. Rosemary extracts showed higher antioxidant activity, even more than the phenol compounds separately. These extracts also showed the highest antioxidant capacity, possibly due to the presence of high concentrations of carnosic acid and carnosol and unidentified active compounds. However, ethanol oregano extracts containing high concentrations of phenols, mainly rosmarinic acid, efficiently prevented colour deterioration. The antioxidant effect of the studied extracts depends, not only on the concentration of phenol compounds (rosmarinic acid, carnosol and carnosic acid), but also on the extraction method and solvent.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Meat batters consist of fat globules – the disperse phase – in a semisolid matrix of water, salts, soluble and insoluble proteins, as well as muscle fibre particles and connective tissue – the continuous phase. Although in a strict sense these are not true emulsions (the fat globules are >20 µm), meat batters are considered oil/water emulsions (Mittal, 2005).

Pork fat contains high concentrations of polyunsaturated fatty acids (0.71 g/100 g) (Rhee, 2000) auto oxidation being the main deteriorative reaction, producing off-flavours as well as colour alteration. In a complex sequence of chemical changes, this promotes the formation of compounds easily reacting with oxygen; production of these highly reactive compounds can be delayed by antioxidant addition. On the other hand, when lipid oxidation takes place, heme-pigments (myoglobin and haemoglobin) also oxidize in a coupled lipid-pigment reaction. The result is a colour change.

Natural antioxidants have been studied and used in foods due to consumers' demand for "natural" or "organic" foods. The interest is also based on restrictions in synthetic antioxidant use, due to possible carcinogenic effects. Herbs and spices have been traditionally used as food ingredients and for their antioxidant properties, among them hyssop (*Hyssopus officinalis* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.)

and clove (*Syzygium aromaticum* L.) (Fernández-López et al., 2003; Wellwood & Cole, 2004). Preliminary studies demonstrated that some herbs extracts are as efficient as synthetic antioxidants. The main compounds responsible for the high antioxidant effect of rosemary extracts are phenol diterpenes, such as carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid. Conversely, information on the antioxidant activity of oregano extracts is scarce. The objective of this work was to quantify the main antioxidant compounds (carnosol, rosmarinic and carnosic acids) in rosemary (*R. officinalis* L.) and oregano leaves (*Origanum vulgare* L.), and to study the extracts effect on colour and oxidation (as TBARS) of model raw pork batters.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Rosmarinic acid and carnosol were obtained from A.G. Scientific (San Diego, CA); carnosic acid and 2-thiobarbituric acid (TBA) from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO). All other reagents were supplied by Baker (Xalostoc, Mexico).

2.2. Raw material

Fresh rosemary leaves were harvested in Central-South Mexico 24 h before solvent extraction, whereas oregano was collected from a location near Mexico City, also 24 h before utilization.

* Corresponding author. Tel.: +52 (55) 5804 4717; fax: +52 (55) 5804 4712.
E-mail address: isabel_guerrero_legarreta@yahoo.com (I. Guerrero Legarreta).

Oregano leaves were oven dried (model HS-41, Rios Rocha Industries, Mexico City) at 30 °C for 18 h. Dried leaves were then stored in amber flasks in the dark at 18 °C until utilization. Solvent extraction was also carried out on oregano leaves in order to compare our results with those published by Wellwood and Cole (2004) who reported possible carnosic acid degradation during drying.

2.3. Extracts

Chloroform rosemary (fresh leaves) and oregano (fresh and dried leaves) extracts were obtained by reflux. Ten grams of finely chopped (3 × 3 mm approximately) fresh rosemary and oregano leaves were placed in 500 mL flasks and refluxed with 40 mL chloroform for 2 h; the leaves were then washed with 40 mL chloroform, both extracts were combined and filtered through cheesecloth and Whatman 4 filter paper. The solvent was then evaporated in a vacuum drier (model 011, Büchi, Flawil, Switzerland) at 55 °C. The solvent-free residue was diluted with a known chloroform volume and stored in amber flasks in the dark at 4 °C until utilization. Oregano dried leaves (2.32 g, equivalent to 10 g fresh leaves) were also extracted with chloroform in a similar manner.

Ethanol extracts from the same raw materials were obtained by leaf maceration. Five grams of finely chopped fresh rosemary and oregano leaves were mixed with 50 mL ethanol; the flasks were tightly closed and the leaves macerated at room temperature (approximately 18 °C) for 10 h in an orbital stirrer (model 3525CC, Lab-line Instruments, Melrose Park, IL) at 75 rpm. The mixture was then filtered through cheesecloth and Whatman 4 filter paper, and washed with 25 mL ethanol; both extracts were combined; the solvent was evaporated in a vacuum drier at 55 °C. The weighed extract was mixed with a known ethanol volume, and stored in amber flasks in the dark at 4 °C until utilization, no more than 24 h later.

To prepare rosemary chloroform/ethanol extract, 30 mg chloroform rosemary extract was mixed with 30 mL ethanol. Maximum solubility of the chloroform rosemary extract in ethanol was previously determined (88.16%).

2.4. Analysis in the extracts of rosmarinic and carnosic acids, carnosol and total phenols

This was carried out according to Wellwood and Cole (2004). Chloroform and ethanol extracts were filtered through 0.2 µm acrodisk (Millex, Ireland); the filtrate was diluted with HPLC-grade ethanol to a known concentration. Five hundred microliters of each extract was injected into a HPLC (Waters, Milford, MA.), fitted with a TM 626 pump (Waters), Rheodyne injector 9125-080, photodiode arrangement detector and Millennium 2010 software. Separation was carried out in a 15 cm × 0.39 mm ID Symmetry C18 reverse phase column (Waters), 5 µm pore size. Analysis conditions were: room temperature (18 °C), 0.6 mL/min flow rate, 284 nm wavelength detection. The mobile phase was solvent A (840 mL deionised water + 8.5 mL acetic acid + 150 mL acetonitrile) and solvent B (methanol). It was programmed in a linear gradient from 90% A–10% B to 100% B in 40 min. The system was stabilized for 3 min between injections. Peak areas were calculated with respect to standards (rosmarinic and carnosic acids, and carnosol).

Total phenol analysis was carried out according to Zheng and Wang (2001). Two hundred microliters of each extract was added to 1 mL Folin-Ciocalteu reagent + 0.8 mL 7.5% (w/v) sodium carbonate solution (Baker, Xalostoc, Mexico), mixed and left standing for 1.5 h at room temperature (approximately 18 °C). Sample absorbance was read at 765 nm in a Beckman DU-650 spectropho-

tometer (Beckman, Fullerton, CA), and interpolated into a gallic acid standard curve.

2.5. Pork batter formulation and analysis

One hundred gram pork batters were formulated with 59 g pork (*Longissimus dorsi* muscle), 14 g lard, 23.4 g cold water, 3 g sodium chloride, 0.498 g potassium phosphate and 0.099 g commercial emulsifier. Pork and frozen lard were separately chopped in approximately 1 cm² cubes, and emulsified in a homogenizer (ESGE, Biospec Products, Bartlesville, Switzerland) for 30 s at maximum speed; the rest of the ingredients were then added until the formation of a homogenous batter. In order to study the extract effect on batters with high and low initial oxidation, half of the batter was stored for 5 days at 4 °C (high initial oxidation), whereas the other half was immediately treated with the extracts. Protein (Kjeldhal), fat and moisture content were analyzed by the methods reported by AOAC (1997).

Particle size and viscosity was carried out in 10 g batters dispersed in 35 mL distilled water and analyzed for emulsion particle size and distribution in a Malvern Mastersizer equipment, Series 2600 (Malvern Instruments, Malvern, England) applying a log normal model (MacClemens, 1999). Apparent viscosity was analyzed in a Brookfield LVDV-1 viscometer (Brookfield Engineering Laboratory, Middleboro, MA) at 8 deformation speeds: 0.3, 0.6, 1.0, 1.5, 12, 39 and 60 rpm; the spindle was chosen according to the deformation speed. Apparent viscosity was calculated considering a torque between 20% and 60%. Analyses were carried out in triplicate.

pH was analyzed using a Beckman potentiometer (Beckman, Fullerton, CA) in 10 g meat batter + 90 mL deionised water. Means of three replicates were reported for each treatment.

Colour analysis was carried out using a Hunter Lab colorimeter (model D25-PC2, Chroma Meter CR-200, Tokyo, Japan) by the method of Kropf (2007); calibration was carried out using a white tile ($L = 94.5$, $a = 1.0$, $b = 1.9$). The sample was rotated 90° after each reading, reporting four reading for each sample. L , a and b coordinates were transformed to polar coordinates: $\text{hue} = \tan^{-1}(b/a)$ and $\text{chroma} = (a^2 + b^2)^{1/2}$. Analysis was carried out in duplicate.

Oxidation degree (2-thiobarbituric acid reacting substances, TBARS) was analyzed as reported by Rossell (1994). A 10 g batter was mixed with 50 L distilled water at 50 °C for 2 min in a domestic blender; the sample was then transferred to a distillation flask, mixed with 47.5 mL distilled water + 2.5 mL HCl + antifoaming. Approximately 50 mL was distilled and transferred to a test tube where 5 mL 2-thiobarbituric acid (TBA) was added (0.2883 g/100 mL 90% acetic acid); the control was 5 mL water. The tubes were tightly closed, stirred and placed in a boiling water bath for 35 min, and cooled in an ice bath for 10 min. Finally, absorbance (D) was read at 530 nm in a spectrophotometer (Beckman DU-650, Beckman, Fullerton, CA). TBARS values were obtained by the following equation:

$$\text{TBARS}(\text{mg malonaldehyde/kg sample}) = 7D$$

2.6. Batter treatments with rosemary and oregano extracts

A one hundred grams pork batter was mixed with 0.02% w/w (extract/lard) of the following leaf extracts: (1) fresh oregano + chloroform; (2) dried oregano + chloroform; (3) fresh rosemary + chloroform; (4) fresh rosemary + chloroform + ethanol; (5) fresh oregano + ethanol; (6) dried oregano + ethanol and (7) fresh rosemary + ethanol. Control samples were batters with no added extract. Samples were placed in closed amber flasks and stored at 4 °C for 72 h. All treatments were analyzed in duplicate. Extract-treated batters were also analyzed for TBARS, colour (L , chroma and hue) and pH.

2.7. Experimental design and statistical analysis

A completely randomized designed was used. The sources of variation were: storage temperature, initial oxidation and storage time. The data were subjected to analysis of variance and Duncan's multiple range test; correlation coefficients (r^2) were also calculated, confounding the time effect (Steel & Torrie, 1988). A SPSS statistical package (version 8.0) adapted to a personal computer was used.

3. Results and discussion

3.1. Extraction and analysis of rosmarinic acid, carnosol and carnosic acid, and total phenols

Macerating oregano and rosemary leaves with ethanol yielded significantly higher rosmarinic acid ($P < 0.001$) than reflux with chloroform (0.0263 and 0.000859 mg/mg extract, respectively) (Table 1) due to the higher solubility of rosmarinic acid in polar solvents (Wellwood & Cole, 2004). Carnosol and carnosic acids showed no significant differences ($P > 0.01$) between extraction by maceration and reflux. Methyl groups in carnosic acid and carnosol decrease polarity, although hydroxyl groups can interact with polar solvents; the net result is similar solubility in polar (ethanol) and non-polar (chloroform) solvents, making extraction efficiency by reflux or maceration statistically non-different, although carnosol concentration showed less variation between extraction methods (0.0448 and 0.0288 mg/mg extract) than carnosic acid (0.0881 and 0.1465 mg/mg).

Rosemary extracts had significantly higher carnosol and carnosic acid concentrations as compared to oregano extracts and lower rosmarinic acid concentration (Fig. 1), although they were not significantly different ($P > 0.01$) to dried oregano (Table 2). The rosmarinic acid peak in the rosemary extract was non-significantly different to the oregano extract ($P > 0.01$) (0.1875 and 0.1472 absorbance units, respectively); conversely, carnosol and carnosic acid peaks were significantly higher in rosemary ($P < 0.001$). This was possibly due to the fact that rosmarinic acid has hydrophilic characteristics; it dissolves in water contained in the plant tissues, where it remains tightly bound (Wellwood & Cole, 2004).

The lowest rosmarinic acid concentrations were obtained in chloroform and chloroform/ethanol extracts, with no significant differences among them ($P > 0.01$). Conversely, its concentration in ethanol extracts was significantly higher ($P < 0.001$) (Table 3),

possibly due to interactions between hydroxyl groups and ethanol. Carnosol concentration was significantly higher ($P < 0.001$) in rosemary extracts. Therefore, neither the extraction method nor the solvent sensibly increased carnosol concentration in oregano extracts. Conversely, chloroform/ethanol extraction significantly increased carnosol concentration in rosemary extracts (0.1239 mg/mg extract), due to the increased solubility of methyl groups in chloroform, and further solubility in ethanol; the presence of ketones and esters in the molecule also increase the molecules solubility in non-polar solvents. Significantly higher concentrations were obtained in chloroform and chloroform/ethanol rosemary extracts due to methyl group solubility in chloroform. Carnosic acids low polarity allows this compound to be efficiently extracted with chloroform. Rosmarinic acid in rosemary extracts was lower when extracted with chloroform and chloroform/ethanol (0.00135 and 0.0013 mg/mg in extracts, respectively). In addition, according to Masuda et al. (2002), carnosic acid in the presence of methanol and ethanol becomes unstable, undergoing oxidation to carnosol.

With respect to total phenol concentration, antioxidant activity is due to the presence of these compounds. The three studied compounds are mainly phenols, their added activity account for the extract antioxidant activity. Extracts obtained with ethanol and chloroform/ethanol had significantly higher ($P < 0.001$) total phenol concentration compared to chloroform extracts (Table 3); the highest concentration was obtained by ethanol reflux of dried oregano leaves (0.2223 mg/mL), possibly due to interactions between phenol hydrophilic groups and hydration water in dried leaves (Wellwood & Cole, 2004), which was later extracted with ethanol. The observed high phenol concentration in dried oregano was in agreement with results reported by Zheng and Wang (2001)

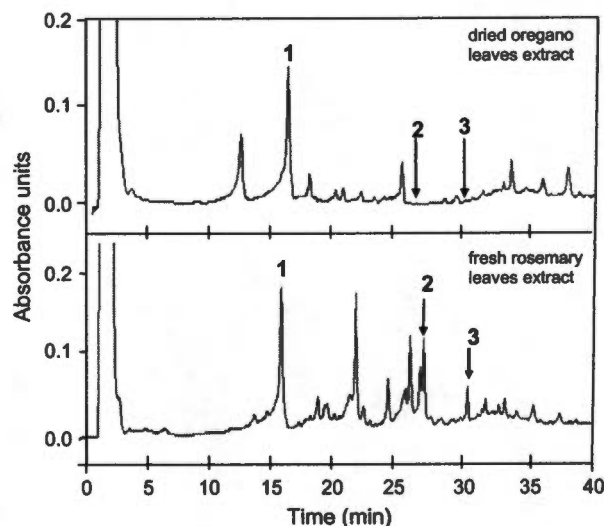


Fig. 1. Chromatograms of dry oregano and fresh rosemary extracts, obtained after 10 day maceration with ethanol: (1) rosmarinic acid, (2) carnosol and (3) carnosic acid.

Table 1

Rosmarinic acid, carnosol and carnosic acid concentration extracted from rosemary and oregano leaves by reflux with chloroform and maceration in ethanol (mg/mg extract)

Extraction method	Rosmarinic acid ^a	Carnosol	Carnosic acid
Maceration with ethanol	0.0263 ^a ± 0.0179	0.0448 ^a ± 0.0526	0.0881 ^a ± 0.1547
Reflux with chloroform	0.000859 ^b ± 0.0006	0.0288 ^a ± 0.0427	0.1465 ^a ± 0.2167

^a Same letter in a column means non-significant difference.

Table 2

Rosmarinic acid, carnosol and carnosic acid (mg/mg extract) obtained from fresh and dried oregano leaves, and fresh rosemary leaves

Herb	Rosmarinic acid ^a	Carnosol	Carnosic acid
Fresh oregano	0.00977 ^a ± 0.010	0.000225 ^b ± 0.000088	0.000225 ^b ± 0.00011
Dried oregano	0.0231 ^a ± 0.023	0.000225 ^b ± 0.000046	0.0005 ^b ± 0.00024
Fresh rosemary	0.0141 ^a ± 0.018	0.0882 ^a ± 0.0305	0.2634 ^a ± 0.196

^a Same letter in a column means non-significant difference.

Table 3

Concentration of carnosol, rosmarinic and carnosic acids (mg/mg extract) and total phenols (mg/mL extract) in rosemary and oregano extracts

Solvent	Herb	Rosmarinic acid ^a	Carnosol	Carnosic acid	Total phenols
Chloroform	Fresh oregano	0.0000518 ^d ± 0.00002	0.000275 ^d ± 0.00009	0.000125 ^c ± 0.00005	0.0228 ^d ± 0.0016
	Dried oregano	0.00117 ^d ± 0.00005	0.0002 ^d ± 4E-21	0.000725 ^c ± 0.00005	0.0393 ^d ± 0.0032
	Fresh rosemary	0.00135 ^e ± 0.00017	0.0860 ^b ± 0.01276	0.4388 ^a ± 0.03875	0.1385 ^b ± 0.0423
Ethanol	Fresh oregano	0.0195 ^c ± 0.00249	0.000175 ^d ± 0.00005	0.000325 ^c ± 0.00005	0.1032 ^c ± 0.0081
	Dried oregano	0.0451 ^a ± 0.00108	0.00025 ^d ± 0.00005	0.000275 ^c ± 0.00005	0.2223 ^a ± 0.0177
	Fresh rosemary	0.0395 ^b ± 0.00317	0.0548 ^c ± 0.00496	0.00485 ^c ± 0.00166	0.1095 ^{b,c} ± 0.0154
Chloroform/ethanol	Fresh rosemary	0.0013 ^d ± 0.00018	0.1239 ^a ± 0.00536	0.3468 ^b ± 0.02615	0.1291 ^{b,c} ± 0.0402

^a Same letter in a column means non-significant difference.

in buffer extracts (pH 7) of European oregano. The high total phenol concentration in ethanol dried oregano extracts (0.2223 mg/mL), chloroform/ethanol rosemary extracts (0.1291 mg/mL) and ethanol rosemary extract (0.1095 mg/L) was also due to the ease of extracting rosmarinic acid, a polar compound, by ethanol. In addition, carnosic acid is present in high concentrations in rosemary (0.2634 mg/mg) (Table 2); being a less polar compound, it is efficiently extracted with chloroform.

3.2. Pork batter characterization and analysis

Batter particle size showed a monodisperse distribution; average particle size was 150 µm, a higher value than found by Ashton and Barbut (1992) for a true emulsion (<20 µm). Apparent viscosity was 63 Pa s at the conditions of analysis, showing pseudoplastic behaviour due to non-spherical particles tending to align to the flow direction or that particle space distribution is altered by the deformation rate (MacClemens, 1999).

pH increased at 24 h of storage (Table 4), with a further decrease, probable due to acid production by contaminated microflora, although no significant difference was observed between storage temperatures.

The lowest TBARS values were observed in samples treated with rosemary extracts (Table 4 and Fig. 2), although storage at 4 °C significantly reduced TBARS (1.831 and 0.452, 20 and 4 °C, respectively) (Table 4). However, the antioxidant effect of chloroform and ethanol rosemary extracts, in terms of TBARS, was not significantly different (0.722 and 0.566). As carnosic acid and carnosol are the most abundant phenol compounds in rosemary extracts (Table 2) they are mainly responsible for free radical inhibitor (Fernández-López et al., 2003), whereas rosmarinic acid could be

the main free radical inhibitor in oregano. In both cases, phenols stabilized hydroperoxides preventing further degradation to more active oxidizing forms, such as malonaldehyde (Wellwood & Cole, 2004). Phenol compounds complex with Fe²⁺ preventing hydroxyl radical formation. According to other authors (Frankel & Huang, 1996; Frankel, Huang, Kanner, & German, 1994) the antioxidant effect of carnosic acid is due to its lipophilic characteristics. Kilic and Richards (2003) reported that lipid oxidation in an oil-in-water emulsion increases with decreasing antioxidant polarity; antioxidant compounds (mainly carnosic acid and carnosol in our study) were located at the interface where hydroperoxides were in contact with prooxidants. Masuda et al. (2002) reported that a very unstable quinone is formed by carnosic acid oxidation; the quinone is later reformed to carnosic acid and oxidized compounds, such as rosmarinol and 7-O-methyl rosmarinol, which act as antioxidants once carnosic acid is depleted (Chaiyasit, McClements, & Decker, 2005).

A rapid increase in TBARS values was observed up to 48 h in samples stored at 20 °C, and up to 24 h in the control. According to Kilic and Richards (2003), this could be due to a reaction between malonaldehyde – its concentration increases with time – and lysine ε-amino and sulfhydryl groups in myosin subfragment 1, and the fact that the protein prevents hydroperoxide interactions with prooxidants (O'Grady, Monahan & Brunton, 2001); therefore increased oxidation as storage proceeds is caused by the degradation of the protein film surrounding fat globules (Chaiyasit et al., 2005).

Oregano extracts had prooxidant activity in batters stored at 20 °C, with mean TBARS values higher than the control. Special prooxidant effect was observed for fresh oregano extracts. Although ethanol dried oregano extracts had the highest total

Table 4

Duncan's multiple range test for of TBARS, colour (L, hue, chroma) and pH with respect to the studied sources of variation

Source of variation	Level	Mean values ^a				
		TBARS	L	Chroma	Hue	pH
Herb extract	Fresh rosemary–chloroform	0.722 ^d	70.49 ^c	15.85 ^{a,b}	78.54 ^d	5.54 ^a
	Fresh rosemary–chloroform/ethanol	1.159 ^{b,c}	71.47 ^b	15.82 ^{a,b}	79.49 ^{c,d}	5.51 ^a
	Fresh oregano–chloroform	1.449 ^a	71.06 ^{b,c}	15.72 ^{a,b}	79.90 ^{b,c,d}	5.56 ^a
	Dried oregano–chloroform	1.393 ^{a,b}	71.35 ^b	15.79 ^{a,b}	79.61 ^{c,d}	5.54 ^a
	Fresh oregano–ethanol	1.211 ^{b,c}	70.63 ^c	15.75 ^a	80.32 ^{a,b,c}	5.51 ^a
	Dried oregano–ethanol	1.197 ^{b,c}	71.12 ^{b,c}	15.55 ^a	80.81 ^{a,b}	5.54 ^a
	Fresh rosemary–ethanol	0.566 ^d	69.46 ^d	15.57 ^b	80.51 ^{a,b,c}	5.75 ^a
	Control	1.086 ^c	73.47 ^a	16.17 ^a	81.41 ^a	5.70 ^a
Temperature (°C)	20	1.831 ^a	67.28 ^b	16.42 ^a	79.42 ^b	5.99 ^a
	4	0.452 ^b	74.61 ^a	14.97 ^b	80.43 ^a	5.64 ^a
Initial oxidation	High	1.459 ^a	72.27 ^a	15.03 ^b	81.44 ^a	6.40 ^a
	Low	0.824 ^b	69.61 ^b	16.36 ^a	78.41 ^b	5.24 ^a
Time (h)	0	0.040 ^d	71.37 ^a	16.21 ^a	77.60 ^d	5.50 ^a
	24	1.117 ^c	69.97 ^b	15.80 ^b	78.56 ^c	6.78 ^a
	48	1.760 ^a	71.15 ^a	15.59 ^b	81.40 ^b	5.50 ^a
	72	1.649 ^b	71.28 ^a	15.17 ^c	82.13 ^a	5.52 ^a

^a Same letter in a column means non-significant difference.

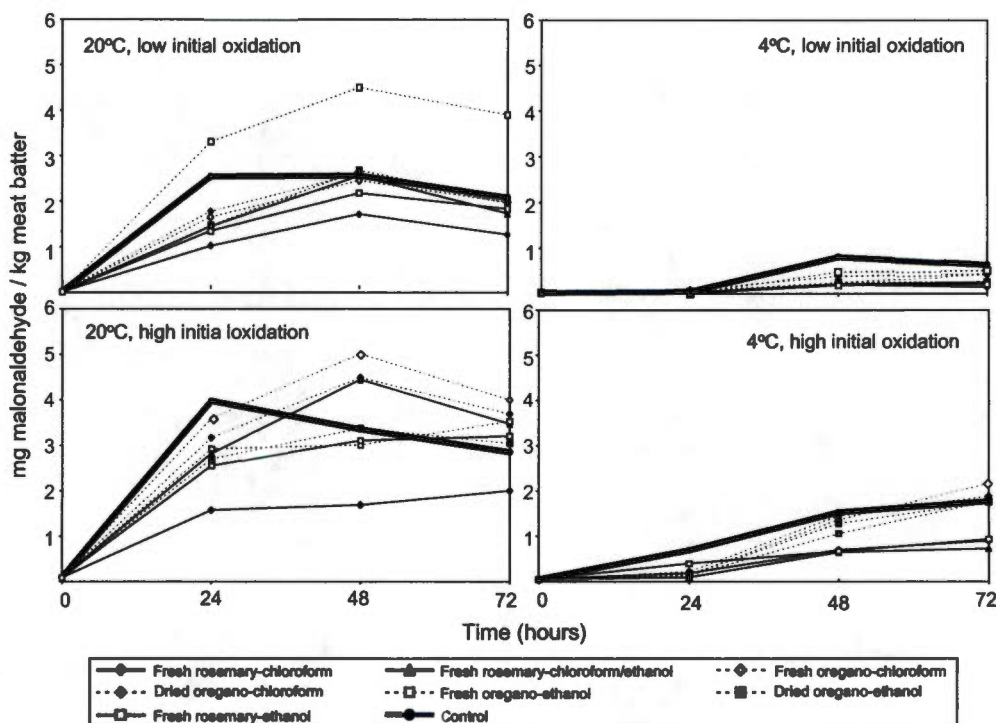


Fig. 2. TBARS of pork batters with oregano and rosemary extracts.

phenol concentration (0.2223 mg/mL) (Table 3), it did not act as an antioxidant. The prooxidant effect was possibly due to the formation of free radicals from fatty acid oxidation. In addition, the presence of rosmarinic acid in high concentrations increases the propagation rate, due to the formation of quinones through hydroxyl group oxidation reactions. Conversely, carnolic acid and carnosol are more stable as they contain an isopropyl radical in the phenol ring. The hydrophilic character of rosmarinic acid results in its solubilization in the batter continuous aqueous phase; therefore interactions between rosmarinic acid and hydroperoxides at the interface rarely occur. Hydroperoxides, on the other hand, can interact with catalysts, such as Fe^{2+} , in the continuous phase (Kulišić, Dragović-Uzelac, & Miloš, 2006).

In spite of having lower phenol concentration than ethanol dried oregano extracts (Table 3), rosemary extracts are more efficient in reducing TBARS values (Table 4). Therefore, antioxidant activity did not depend only on total phenol concentration, but also on their polarity and molecular structure.

Treatments with ethanol rosemary extracts gave the lowest *L*-values (the darkest samples) (mean value = 69.46) (Table 4) (Fig. 3); it was significantly different to other treatments ($P < 0.001$); this effect was more noticeable in samples stored at 20 °C. On average, *L*-values for all samples were significantly higher in those stored at 4 °C than at 20 °C ($L = 74.61$ and 67.28, respectively); no significant differences were observed in samples stored under refrigeration. Sample darkening at 20 °C coincided with higher oxidation values (TBARS = 1.831); whereas low TBARS in refrigerated samples gave higher *L*-values (Figs. 2 and 3). Therefore, lipid oxidation observed as higher TBARS values, was correlated to darker samples (lower *L*-values). The correlation coefficients between TBARS and *L*-values, with respect to temperature, were $r^2 = 0.382$ and 0.707, 4 and 20 °C; with respect to initial oxidation, these coefficients were $r^2 = -0.713$ and -0.871 , high and low initial oxidation, respectively. Therefore, a higher correlation

(negative) was observed for *L* versus TBARS values with respect to initial oxidation conditions; as oxidation increased (as TBARS), lightness decreased (samples became darker). Conversely, storage temperature gave a low positive correlation ($r^2 < 0.40$).

Chroma (colour intensity) showed a significant ($P < 0.001$) decreasing trend with time (Table 4). Non-significant differences ($P > 0.01$) were observed among treatments, except for ethanol rosemary extracts. Chroma values were similar for all treatments throughout time, except for high initial oxidation samples stored at 20 °C (Fig. 4). Correlation coefficients for TBARS versus chroma in samples stored at 4 and 20 °C were $r^2 = -0.922$ and -0.678 , respectively. These results were in agreement with Sánchez-Escalante, Djenane, Torrescano, Beltrán, and Roncales (2003) who reported that myoglobin and oxymyoglobin oxidation to brown metmyoglobin is associated with reduction in reddish colour (higher hue values) and lower chroma. Hue showed an increasing trend in samples stored at 20 °C (Fig. 5), i.e. samples became less red as time increased. At 4 °C, hue varied within a narrow range in low initial oxidation samples; in high initial oxidation samples, hue had a wider variation. Low values (more reddish samples) were observed for batters with added ethanol dried oregano extracts. Red colour in meats is related to reduced iron (Fe^{2+}), resulting from several factors preventing oxidation. According to Kroll and Rawel (2001), phenol acids oxidize to quinones that, in turn, react with lysine, cysteine, methionine and tryptophan in the myoglobin molecule. This reaction promotes myoglobin polymerization, exposing the heme moiety. The more hydroxyl groups, the more reactive the phenol compound; rosmarinic acid has four phenol groups, whereas carnolic acid and carnosol have two; hence, rosmarinic acid is more reactive. As dried oregano had the highest total phenol concentration, this was an efficient antioxidant, preventing red heme-pigments undergoing oxidation to brown metmyoglobin. TBA vs. hue correlation coefficients at 4 and 20 °C were $r^2 = -0.889$ and -0.686 , respectively, meaning that the

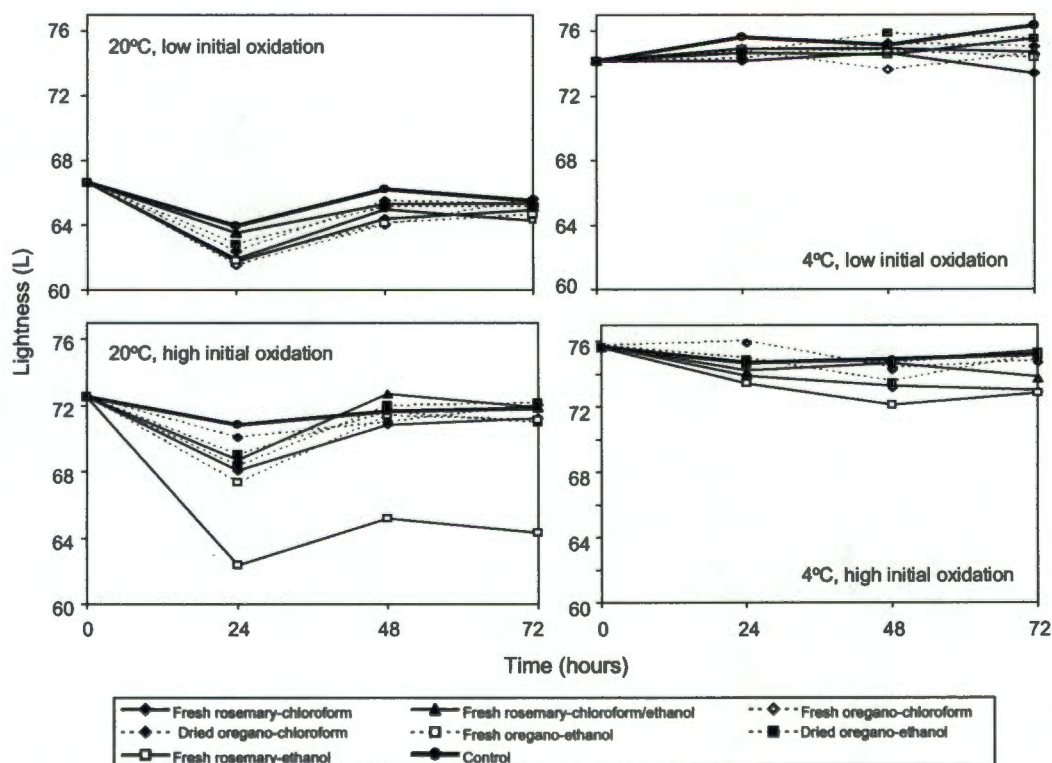


Fig. 3. Lightness (L) of pork batters with oregano and rosemary extracts.

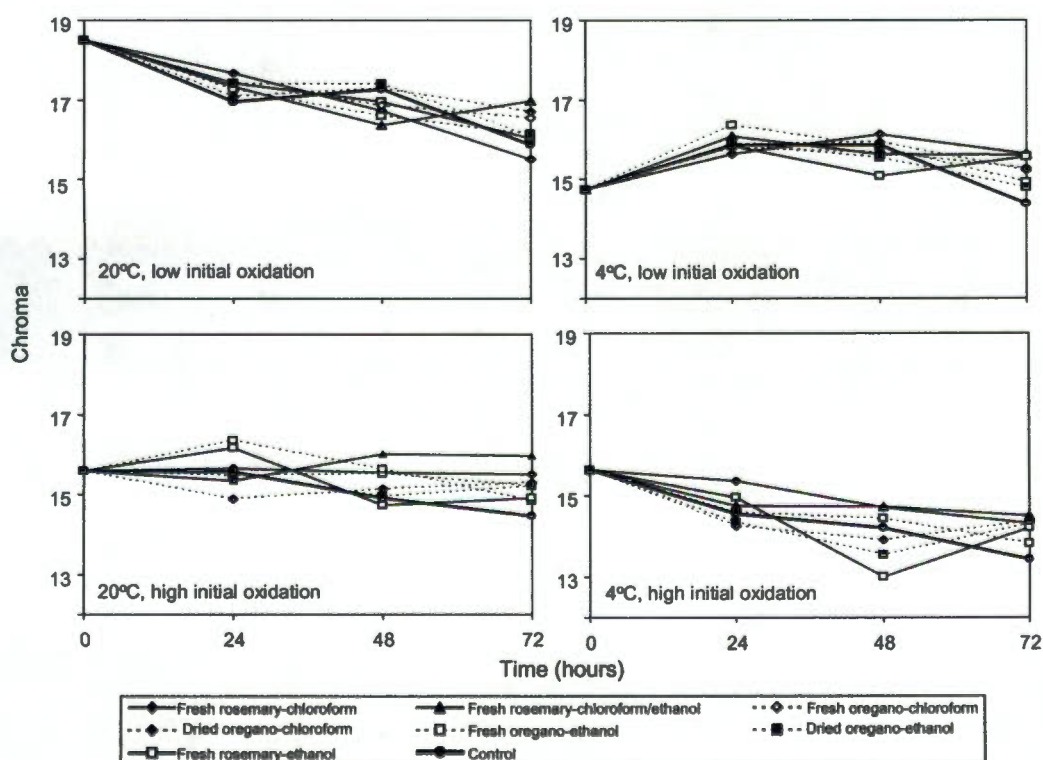


Fig. 4. Chroma of pork batters with oregano and rosemary extracts.

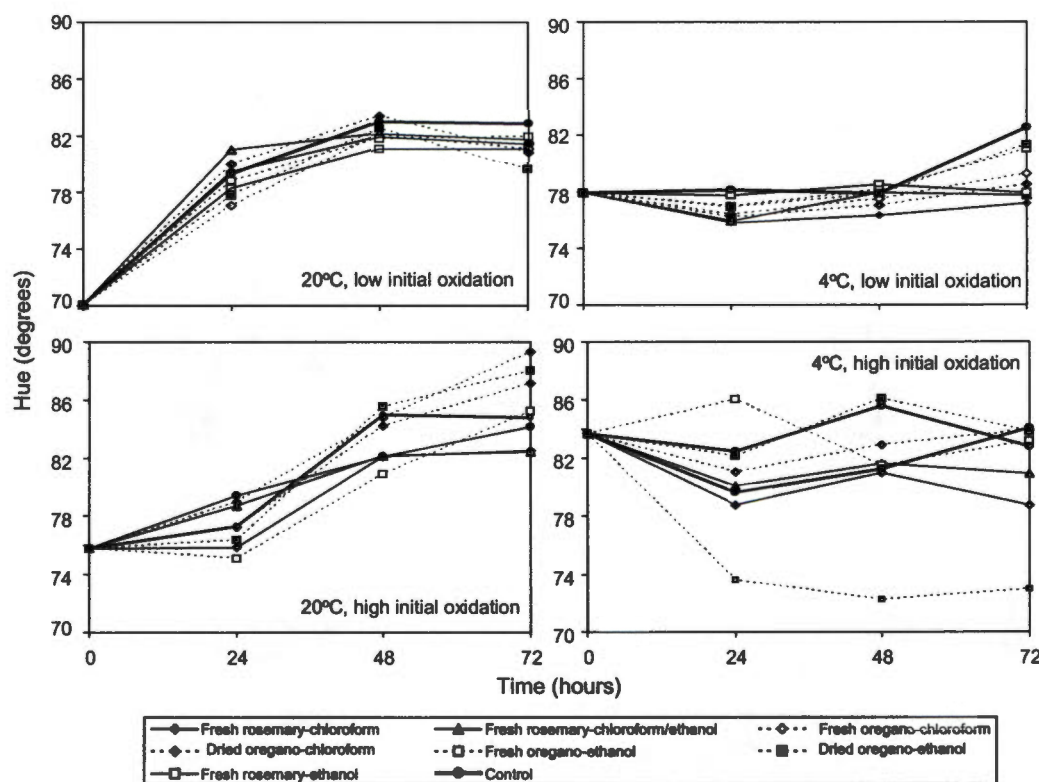


Fig. 5. Hue (degrees) of pork batters with oregano and rosemary extracts.

higher the TBARS values the lower the hue (the more reddish the batter). Significant differences were observed among days ($P < 0.001$), as colour became less red on storage.

4. Conclusions

Ethanol oregano extracts contain high concentrations of phenols, especially rosmarinic acid, although, high phenol concentration did not correlate with high antioxidant activity. Its effect on lipid and myoglobin oxidation is also related to the extraction and solvent used, the structure of the antioxidant compound, storage temperature, and initial oxidation state of the sample. Rosemary extracts showed more efficient antioxidant activity compared to oregano extracts, although ethanol dried oregano extract also showed good antioxidant effects on meat batters. The high antioxidant capacity could also be due to a number of unidentified active compounds that can act as antioxidants; therefore, it is possible that synergism occurs. Phenols are more active when present in mixtures, as those with higher activity easily undergo oxidation, whereas the less reactive phenols regenerate the more active. Rosmarinic acid is more polar than carnosic acid and carnosol, therefore it was mainly located in the continuous aqueous phase; carnosic acid and carnosol, with lower polarity, was located at the water/oil interface where they inactivate free radicals, avoiding hydroperoxide breakdown. Pigment oxidation was mainly due to myoglobin reacting with quinones, formed by hydroxyl oxidation of rosmarinic acid, carnosol and carnosic acid.

Acknowledgments

Author Hernández-Hernández thanks the National Council for Science and Technology (CONACYT), Mexico and Universidad Auto-

noma Metropolitana for a graduate scholarship. The authors thank Dr. Adolfo Espejo-Serna and Ana Rosa López-Ferrari, M.Sc. (Department of Biology, Universidad Autónoma Metropolitana) for the herb taxonomical confirmation.

References

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (1997). In W. Horwitz (Ed.) *Official methods of analysis* (15th ed.). Washington, DC.
- Ashtouk, G., & Barbut, S. (1992). Mechanisms of meat batter stabilization: A review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 299–332.
- Chaiyasit, W., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2005). The relationship between the physicochemical properties of antioxidants and their ability to inhibit lipid oxidation in bulk oil and oil-in-water emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4982–4988.
- Fernández-López, J., Sevilla, L., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., Marín, F., & Pérez-Alvárez, J. A. (2003). Evaluation of the antioxidant potential of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in cooked pork meat. *Journal of Food Science*, 68, 660–664.
- Frankel, E. N., & Huang, S. W. (1996). Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 201–208.
- Frankel, E. N., Huang, S. W., Kanner, J., & German, J. B. (1994). Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils vs. emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 1054–1059.
- Kilic, B., & Richards, M. P. (2003). Lipid oxidation in poultry döner kebab: Pro-oxidative and anti-oxidative factors. *Journal of Food Science*, 68(2), 686–689.
- Kroll, J., & Rawel, H. M. (2001). Reactions of plant phenols with myoglobin: Influence of chemical structure of the phenol compounds. *Journal of Food Science*, 66(1), 48–58.
- Kropf, D. H. (2007). Fresh and frozen pork color. In L. M. L. Nollet, T. Boylston, F. Chen, P. C. Coggin, M. B. Gloria, G. Hyldig, C. R. Kerth, L. H. McKee, & Y. H. Hui (Eds.), *Handbook of meat, poultry and seafood quality* (1st ed., pp. 377–393). Ames: Blackwell Publishing.
- Kulišić, T., Dragović-Uzelac, V., & Miloš, M. (2006). Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technology and Biotechnology*, 44(4), 485–492.
- McClements, D. J. (1999). *Food emulsions: Principles, practice and techniques*. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Masuda, T., Inaba, Y., Maekawa, T., Takeda, Y., Tamura, H., & Yamaguchi, H. (2002). Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 5863–5869.
- Mittal, G. S. (2005). Meat in emulsion type sausages: An overview. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 3, 101–108.
- O'Grady, M. N., Monahan, F. J., & Brunton, N. P. (2001). Oxymyoglobin oxidation and lipid oxidation in bovine muscle: Mechanistic studies. *Journal of Food Science*, 66, 386–392.
- Rhee, K. S. (2000). Fatty acids in meats and meat products. In C. K. Chow (Ed.), *Fatty acids in foods and their health implications* (2nd ed., pp. 83–105). New York: Marcel Dekker.
- Rossell, J. B. (1994). Measurement of rancidity. In J. C. Allen & R. J. Hamilton (Eds.), *Rancidity in foods*. London: Chapman and Hall.
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrecano, G., Beltrán, J. A., & Roncales, P. (2003). Antioxidant action of borage, rosemary, oregano and ascorbic acid in beef patties packaged in modified atmosphere. *Journal of Food Science*, 68, 339–344.
- Steel, R. G., & Torrie, J. H. (1988). *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Bogota, Colombia: McGraw-Hill.
- Wellwood, C. R. L., & Cole, R. A. (2004). Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.) accessions for optimization of antioxidant yield. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 6101–6107.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 5165–5170.