



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
DIVISION CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD
UNIDAD IZTAPALAPA

**EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE ROMERO
(*Rosmarinus officinalis* L.) Y DE SALVIA (*Buddleia perfoliata* Kunth)
EN UNA PASTA DE CARNE CRUDA DE CERDO**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :
Ing. Elvia Hernández Hernández

Directora de tesis: Dra. Isabel Guerrero Legarreta

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE, 2004

Iztapalapa, D. F., a de Septiembre de 2004.

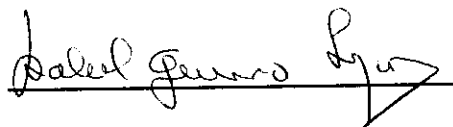
El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

**EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE ROMERO
(*Rosmarinus officinalis* L.) Y DE SALVIA (*Buddleia perfoliata* Kunth)
EN UNA PASTA DE CARNE CRUDA DE CERDO**

que presentó

ELVIA HERNANDEZ HERNANDEZ

Directora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Jurado:

Asesora: Dra. Edith Ponce Alquicira
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



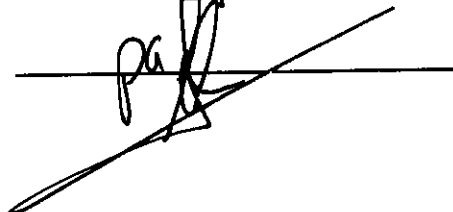
Asesor: Dr. Francisco Cruz Sosa
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Sinodal: Dra. María Eugenia Jaramillo Flores
Instituto Politécnico Nacional



Sinodal: Dr. Tirso Ríos Castillo
Universidad Nacional Autónoma de México



La Maestría en Biotecnología esta incluida en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el convenio **“471-0/ Maestría en Biotecnología”**

Iztapalapa, D. F., a de Septiembre de 2004.

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.) Y DE SALVIA (*Buddleia perfoliata* Kunth)
EN UNA PASTA DE CARNE CRUDA DE CERDO

que presentó

ELVIA HERNANDEZ HERNANDEZ

Directora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Jurado:

Asesora: Dra. Edith Ponce Alquicira
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Francisco Cruz Sosa
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Sinodal: Dra. María Eugenia Jaramillo Flores
Instituto Politécnico Nacional

Sinodal: Dr. Tirso Ríos Castillo
Universidad Nacional Autónoma de México

DEDICATORIA

- ❖ A mi esposo, por animarme a estudiar la Maestría en Biotecnología después de tantos años de haber egresado de la Licenciatura, por dedicarme su tiempo, apoyo y comprensión siempre que lo necesité. Gracias César por tu cariño y por ser una persona tan especial.
- ❖ A mis hijos Gustavo y David, por brindarme su cariño, animarme en momentos difíciles y ser pacientes por el poco tiempo que pude dedicarles durante el desarrollo de esta tesis.
- ❖ A mis padres Margarita y Manuel, porque con su cariño, enseñanzas, apoyo y comprensión he logrado lo que ahora soy.
- ❖ A mi suegra María Luisa, por su apoyo y ánimo siempre que lo necesité.
- ❖ A mis hermanos, cuñadas y sobrinos, gracias por su apoyo.
- ❖ A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta porque con su ejemplo de dedicación al trabajo y comprensión me motivó a finalizar y disfrutar el trabajo realizado. Gracias especialmente por escucharme y apoyarme en todo momento.
- ❖ A los Doctores Edith Ponce Alquicira y Francisco Cruz Sosa por asesorarme durante el desarrollo de este trabajo de investigación.
- ❖ Al Dr. Marcelo Signorini por brindarme su comprensión, tiempo y conocimientos durante el trabajo experimental.
- ❖ A los compañeros de laboratorio Julio, Octavio, Raquelita, Basy, Rosa y Raquel por escucharme siempre que lo necesité, por apoyarme con sus conocimientos, animarme en el desarrollo experimental y escritura de la tesis y, por todos los momentos tan agradables que pasamos juntos.
- ❖ A todos mis compañeros de la Maestría en Biotecnología generación 2001-2003.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, por haberme dado la oportunidad hace algunos años de formarme como profesionista en la Licenciatura en Ingeniería de Alimentos, ahora en la Maestría en Biotecnología y en un futuro cercano el Doctorado en Ciencias Biológicas.
- ❖ A CONACYT por el apoyo económico recibido durante la Maestría en Biotecnología.
- ❖ A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta por haberme brindado la oportunidad de realizar uno de mis grandes deseos y permitirme continuar con otro de ellos que es el Doctorado en Ciencias.
- ❖ Al Dr. Francisco Cruz Sosa por escuchar y resolver mis dudas siempre que acudí a solicitárselo.
- ❖ Al Maestro José Ramón Verde Calvo por brindarme su tiempo en la resolución de dudas acerca del cromatógrafo de gases y por su ayuda en el análisis de ácidos de cadena corta.
- ❖ A los Doctores María Eugenia Jaramillo Flores y Tirso Ríos Castillo por la revisión y sugerencias para mejorar la calidad de esta tesis.

INDICE GENERAL

	Pág.
Indice general	i
Indice de tablas	vi
Indice de figuras	ix
1. INTRODUCCION	1
2. JUSTIFICACION	4
3. OBJETIVOS	5
4. REVISION BIBLIOGRAFICA	6
4.1 <i>Composición química de la carne</i>	6
4.1.1 Proteínas	8
4.1.2 Carbohidratos	9
4.1.3 Lípidos	9
4.2 <i>Acidos de cadena corta</i>	11
4.2.1 Metabolismo anaeróbico	11
4.2.2 Bacterias lácticas	11
4.3 <i>Emulsión</i>	13
4.4 <i>Coeficiente de distribución</i>	15
4.5 <i>Oxidación de lípidos</i>	15
4.5.1 Oxidación enzimática	16

	Pág
4.5.2 Autoxidación	17
4.5.3 Métodos de prevención de la oxidación	22
4.5.4 Antioxidantes	22
4.5.4.1 Clasificación de los antioxidantes por su origen	23
4.5.4.2 Clasificación de los antioxidantes por su mecanismo de acción	27
4.5.4.3 Sinergismo	29
4.5.5 Determinación de la actividad antioxidante	29
4.6 <i>Extracto de romero</i>	31
4.7 <i>Extracto de salvia</i>	40
4.8 <i>Propiedades fisicoquímicas</i>	43
4.8.1 Color	43
4.8.2 Proteínas	47
4.8.3 Humedad	49
4.8.4 Cenizas	50
4.8.5 Grasa	50
4.8.6 Actividad de agua	51
4.8.7 pH	52
4.8.8 Acidos	53
4.8.8.1 Acidos grasos libres de cadena larga	53
4.8.8.2 Acidos de cadena corta	57
4.8.9 <i>Compuestos químicos derivados de la oxidación de ácidos grasos (Valor TBARS)</i>	58

	Pág.
5. MATERIALES Y METODOS	60
<i>5.1 Obtención de los extractos</i>	60
5.1.1 Extracto de romero	60
5.1.1.1 Extracto con cloroformo	60
5.1.1.2 Extracto con metanol	61
5.1.2 Extracto de salvia	61
5.1.2.1 Extracto con cloroformo	61
5.1.2.2 Extracto con etanol	61
<i>5.2 Preparación de la pasta de carne fresca de cerdo</i>	62
<i>5.3 Envasado</i>	63
<i>5.4 Condiciones de almacenamiento</i>	64
5.4.1 Tiempo, temperatura y concentraciones de los extractos	64
5.4.1.1 Almacenamiento por 3 días	64
5.4.1.2 Almacenamiento por 7 días	66
5.4.1.3 Almacenamiento por 24 días	66
<i>5.5 Evaluación fisicoquímica de la pasta cárnica</i>	68
5.5.1 Color	68
5.5.2 Contenido de proteína	68
5.5.3 Contenido de humedad	69
5.5.4 Determinación de cenizas	70
5.5.5 Contenido de grasa	70
5.5.6 Determinación de la actividad de agua	71

	Pág.
5.5.7 Determinación de pH	71
5.5.8 Perfil de ácidos grasos libres de cadena larga	72
5.5.9 Cuantificación de ácidos de cadena corta	73
5.6 Cuantificación de la oxidación de los ácidos grasos (Valor TBARS)	73
5.7 Análisis estadístico	76
5.8 Diagrama general	76
6. RESULTADOS Y DISCUSION	78
6.1 Obtención de los extractos	78
6.1.1 Extracto de romero	78
6.1.2 Extracto de salvia	79
6.2 Preparación de la pasta de carne fresca de cerdo	79
6.3 Envasado	80
6.4 Evaluación fisicoquímica de la pasta cárnica	81
6.4.1 Almacenamiento durante 72 horas y una semana.	81
6.4.1.1 Color	81
6.4.1.2 Proteína	87
6.4.1.3 Humedad	88
6.4.1.4 Cenizas	89
6.4.1.5 Grasa	90
6.4.1.6 Actividad de agua	91
6.4.1.7 pH	92
6.4.1.8 Concentración de ácidos grasos libres de cadena larga	95

	Pág.
6.4.1.9 Análisis de ácidos de cadena corta	104
6.4.2 Oxidación de los ácidos grasos libres (Valor TBARS)	107
6.4.3 Almacenamiento durante 24 días.	118
6.4.3.1 Color	119
6.4.3.2 Proteína	121
6.4.3.3 Humedad	121
6.4.3.4 Cenizas	121
6.4.3.5 Grasa	122
6.4.3.6 Actividad de agua	122
6.4.3.7 pH	122
6.4.3.8 Concentración de ácidos grasos libres de cadena larga	123
6.4.3.9 Análisis de ácidos de cadena corta	124
6.4.4 Oxidación de los ácidos grasos libres (Valor TBARS)	126
7. CONCLUSIONES	129
8. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	131
9. BIBLIOGRAFIA	132
ANEXOS	142

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición media de carnes magras por 28 g de porción comestible	7
Tabla 2. Acidos grasos de carne magra cruda para diferentes especies animales	10
Tabla 3. Energías de disociación para enlaces de hidrógeno	19
Tabla 4. Oxidación de ácidos grasos catalizada por metales	20
Tabla 5. Antioxidantes naturales en algunos alimentos	25
Tabla 6. Actividad antioxidante del rosmaridifenol en lardo	34
Tabla 7. Actividad antioxidante del extracto de romero con diferentes disolventes	35
Tabla 8. Actividad antioxidante del extracto de salvia con diferentes disolventes	42
Tabla 9. Características de los envases	64
Tabla 10. Tratamientos en el almacenamiento por 72 horas	65
Tabla 11. Tratamientos llevados a cabo en cada experimento	67
Tabla 12. Variables de respuesta analizadas en cada experimento	75
Tabla 13. Luminosidad 72 horas (cloroformo como disolvente)	143
Tabla 14. Luminosidad 72 horas (metanol y etanol como disolventes)	144
Tabla 15. Luminosidad 1 semana (cloroformo como disolvente)	145
Tabla 16. Valor TBARS 72 horas (metanol como disolvente)	146
Tabla 17. Valor TBARS 1 semana (cloroformo como disolvente)	147
Tabla 18. Humedad 1 semana (cloroformo como disolvente)	148
Tabla 19. Cromaticidad 72 horas (cloroformo como disolvente)	149
Tabla 20. Cromaticidad 72 horas (metanol y etanol como disolventes)	150
Tabla 21. Cromaticidad 1 semana (cloroformo como disolvente)	151
Tabla 22. Incremento en la tonalidad 72 horas (cloroformo como disolvente)	152
Tabla 23. Incremento en la tonalidad 72 horas (metanol y etanol como disolventes)	153
Tabla 24. Valor TBARS 72 horas (metanol como disolvente)	154
Tabla 25. Valor TBARS 72 horas (etanol como disolvente)	155

	Pág.
Tabla 26. Incremento en la tonalidad 1 semana (cloroformo como disolvente)	156
Tabla 27. Actividad de agua 1 semana (cloroformo como disolvente)	157
Tabla 28. Concentración de proteína 72 horas (cloroformo como disolvente)	158
Tabla 29. Concentración de proteína 72 horas (metanol y etanol como disolventes)	159
Tabla 30. Concentración de proteína 1 semana (cloroformo como disolvente)	159
Tabla 31. Humedad 72 horas (cloroformo como disolvente)	160
Tabla 32. Humedad 72 horas (metanol y etanol como disolventes)	161
Tabla 33. Cenizas (metanol y etanol como disolventes)	161
Tabla 34. Cenizas 1 semana (cloroformo como disolvente)	162
Tabla 35. Grasa 72 horas (cloroformo como disolvente)	163
Tabla 36. Grasa 72 horas (metanol y etanol como disolventes)	164
Tabla 37. Grasa 1 semana (cloroformo como disolvente)	164
Tabla 38. Actividad de agua 72 horas (cloroformo como disolvente)	165
Tabla 39. Actividad de agua 72 horas (metanol y etanol como disolventes)	166
Tabla 40. pH 72 horas (cloroformo como disolvente)	167
Tabla 41. Valor TBARS 72 horas (cloroformo como disolvente)	168
Tabla 42. pH 72 horas (metanol y etanol como disolventes)	169
Tabla 43. Acido acético 72 horas (metanol y etanol como disolventes)	170
Tabla 44. Acido láctico 72 horas (metanol y etanol como disolventes)	171
Tabla 45. pH 72 horas (metanol como disolvente)	172
Tabla 46. pH 1 semana (cloroformo como disolvente)	172
Tabla 47. Areas obtenidas para ácido mirístico	173
Tabla 48. Areas obtenidas para ácido palmitoleico	174
Tabla 49. Areas obtenidas para ácido palmítico	175
Tabla 50. Areas obtenidas para ácido oleico	176
Tabla 51. Areas obtenidas para ácido esteárico	177
Tabla 52. Acido mirístico 72 horas (metanol como disolvente)	179
Tabla 53. Acido palmitoleico 72 horas (metanol como disolvente)	180
Tabla 54. Acido palmítico 72 horas (metanol como disolvente)	181
Tabla 55. Acido oleico 72 horas (metanol como disolvente)	182

	Pág.
Tabla 56. Acido esteárico 72 horas (metanol como disolvente)	183
Tabla 57. Acido palmitoleico 72 horas (etanol como disolvente)	184
Tabla 58. Acido palmítico 72 horas (etanol como disolvente)	185
Tabla 59. Acido oleico 72 horas (etanol como disolvente)	186
Tabla 60. Acido esteárico 72 horas (etanol como disolvente)	187
Tabla 61. Areas obtenidas para ácido láctico	188
Tabla 62. Areas obtenidas para ácido acético	188
Tabla 63. Valor TBARS 72 horas (cloroformo como disolvente)	191
Tabla 64. Luminosidad 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	192
Tabla 65. Valor TBARS 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	193
Tabla 66. Cromaticidad 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	194
Tabla 67. Incremento en la tonalidad 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	195
Tabla 68. Concentración de proteína 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	196
Tabla 69. Humedad 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	196
Tabla 70. Cenizas 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	197
Tabla 71. Grasa 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	197
Tabla 72. Actividad de agua 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	198
Tabla 73. pH 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	199
Tabla 74. Acido acético 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	200
Tabla 75. Acido palmitoleico 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	201
Tabla 76. Acido palmítico 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	202
Tabla 77. Acido oleico 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	203
Tabla 78. Acido esteárico 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	204
Tabla 79. Acido láctico 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)	205

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama de la miosina y sus subfragmentos	9
Figura 2. Ilustración esquemática de una pasta cárnica	14
Figura 3. Estructura química del BHA y BHT	23
Figura 4. Flor y planta del romero	31
Figura 5. Estructura química del ácido carnósico, carnosol	33
Figura 6. Mecanismo antioxidante del ácido carnósico	36
Figura 7. Mecanismo de reacción de los compuestos fenólicos con la mioglobina	39
Figura 8. Salvia de bolita o salvia real	41
Figura 9. Estructura de la mioglobina	43
Figura 10. Diferentes estados de oxidación del hierro en el grupo hemo	44
Figura 11. Sólido de color L, a, b	47
Figura 12. Diagrama general del experimento	77
Figura 13. Incremento en la tonalidad 72 horas (romero en metanol)	84
Figura 14. Incremento en la tonalidad 72 horas (romero y de salvia)	86
Figura 15. Incremento en la tonalidad 1 semana	87
Figura 16. pH 72 horas a temperatura ambiente con aire	93
Figura 17. pH 72 horas a 10°	94
Figura 18. pH 72 horas a 4°	94
Figura 19. Acidos grasos libres 72 horas a temperatura ambiente con incorporación de aire (romero en metanol)	97
Figura 20. Acidos grasos libres 72 horas a 10° (romero en metanol)	99
Figura 21. Acidos grasos libres 72 horas a 4° (romero en metanol)	101
Figura 22. Acidos grasos libres 72 horas a temperatura ambiente con incorporación de aire (salvia en etanol)	102
Figura 23. Acidos grasos libres 72 horas a 10° (salvia en etanol)	103
Figura 24. Acidos grasos libres 72 horas a 4° (salvia en etanol)	104
Figura 25. Acido láctico 72 horas	106
Figura 26. Acido acético 72 horas	107
Figura 27. Valor TBARS 72 horas (romero en cloroformo)	108

	Pág.
Figura 28. Valor TBARS 96 horas (romero seco en cloroformo)	109
Figura 29. Valor TBARS 72 horas (salvia en cloroformo)	111
Figura 30. Valor TBARS 72 horas (romero en metanol)	114
Figura 31. Valor TBARS (romero en metanol actuando como prooxidante)	115
Figura 32. Valor TBARS 72 horas (salvia en etanol)	116
Figura 33. Valor TBARS 1 semana (salvia en cloroformo)	118
Figura 34. Incremento en la tonalidad 24 días	120
Figura 35. pH 24 días	123
Figura 36. Acidos grasos libres 24 días	124
Figura 37. Acido láctico y acético 24 días	125
Figura 38. Valor TBARS 24 días	126
Figura 39. Curva patrón para ácido mirístico	173
Figura 40. Curva patrón para ácido palmitoleico	174
Figura 41. Curva patrón para ácido palmítico	175
Figura 42. Curva patrón para ácido oleico	176
Figura 43. Curva patrón para ácido esteárico	177
Figura 44. Cromatograma de los ácidos grasos libres de cadena larga	178
Figura 45. Curva patrón para ácido láctico	189
Figura 46. Curva patrón para ácido acético	189
Figura 47. Cromatograma de los ácidos de cadena corta	190

RESUMEN

Las pastas cárnicas, debido a su composición que incluye compuestos fácilmente oxidables como los pigmentos (hemoglobina y mioglobina) y los ácidos grasos insaturados, están sujetas a la acción de diversos agentes oxidantes, lo que deteriora la calidad de este tipo de alimentos. Debido a la demanda del mercado en el uso de aditivos de origen natural en oposición a los aditivos sintéticos, en años recientes se han buscado antioxidantes naturales. La presente tesis tuvo como objeto principal estudiar el efecto antioxidante de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y de salvia de bolita (*Buddleia perfoliata* Kunth) en pastas de carne cruda de cerdo.

El extracto de romero se obtuvo por reflujo con cloroformo y metanol a partir de hojas frescas y secas picadas; el de salvia se obtuvo por reflujo con cloroformo y por maceración a temperatura ambiente con etanol a partir de las hojas frescas. La pasta se formuló con carne de cerdo, lardo, agua, cloruro de sodio, fosfato de potasio y un emulsificante comercial.

Los factores que se estudiaron fueron:

- a. Adición de los extractos por separado y en conjunto
- b. Efecto del solvente utilizado en el reflujo
- c. Temperatura de almacenamiento (4°, 10° y temperatura ambiente)
- d. Presencia de aire durante el almacenamiento

La acción antioxidante de los extractos se comparó contra la de una mezcla antioxidante de BHA/BHT. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la incorporación de peróxido de hidrógeno a la pasta como prooxidante. Las variables de respuesta evaluadas fueron cambios en color; contenido de cenizas, proteína y humedad; actividad de agua; pH; perfil de ácidos grasos libres de cadena larga y de cadena corta; y valores de oxidación (TBARS).

El peróxido de hidrógeno provocó un cambio en el color de las pastas, al oxidar a la oximioglobina. No actuó como prooxidante de ácidos grasos libres de cadena larga posiblemente debido a que al agregarlo sin un agente reductor la velocidad de generación de radicales libres disminuyó. Sin embargo, puede actuar como prooxidante dependiendo de la concentración de hierro en la muestra y de la integridad de la matriz proteica que rodea las gotas de grasa.

Las muestras con la mezcla BHA/BHT presentaron mayor oxidación de oximioglobina que el control durante 24 días de almacenamiento debido a que ambos antioxidantes son reductores, lo cual favoreció la separación del oxígeno del pigmento; sin embargo esta mezcla de antioxidantes sí disminuyó la oxidación de los ácidos grasos. Los extractos de romero con cloroformo y con metanol, así como el de salvia con etanol protegieron a la oximioglobina de la oxidación, mientras que el de salvia con cloroformo la aceleró. Los extractos de romero con metanol y de salvia con etanol, así como la mezcla BHA/BHT no tuvieron influencia en la concentración de ácidos grasos libres de cadena larga o corta durante 3 días de almacenamiento a 10°.

Por otra parte, a las dos semanas de almacenamiento refrigerado se presentó un incremento significativo en la concentración de los ácidos grasos libres de cadena larga en muestras con extractos de romero con cloroformo y salvia con etanol agregados por separado y en mezcla, debido posiblemente a que éstos pudieran contener enzimas lipolíticas o a que los extractos contienen compuestos que activan a las enzimas endógenas de la pasta. A pesar del incremento, no se presentó variación significativa en los valores TBARS en estos tratamientos, debido a que los ácidos grasos pudieron permanecer en la membrana y ser protegidos de la oxidación por la vitamina E, antioxidante que se encuentra incluido en la bicapa de la membrana. La concentración de ácidos de cadena corta aumentó significativamente a los 7 días de almacenamiento, con una disminución posterior; este comportamiento parece estar relacionado con la presencia de microorganismos. Los extractos de romero con cloroformo y de salvia con etanol presentaron sinergismo durante los primeros 3 días del almacenamiento a 4°. Ninguno de

Resumen

los tratamientos aplicados a las pastas afectó el contenido de proteína, humedad, cenizas y actividad de agua.

Se observó que el extracto vegetal estudiado con mayor eficiencia como antioxidante fue el de romero obtenido con cloroformo, seguido por el de romero extraído con metanol, el de salvia extraído con etanol y finalmente el de salvia extraído con cloroformo.

ABSTRACT

Meat batters, due to their composition including highly reactive compounds such as pigments (hemoglobin and myoglobin) as well as unsaturated fatty acids, are subjected to oxidation. The result of this type of reaction is overall quality deterioration. Due to the market demand of natural additive utilization, conversely to synthetic ones, search of natural antioxidants in recent years has been intensified. The main objective of this thesis was to study the antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Mexican sage (*Buddleia perfoliata* Kunth) extracts added to pork batters.

Rosemary extract was obtained from fresh and dried, shredded leaves by reflux in chloroform or methanol; Mexican sage extract was obtained from fresh leaves refluxing in chloroform or by leaf maceration in ethanol at room temperature. The meat batter formulation was: pork, lard, water, sodium chloride, potassium phosphate and a commercial emulsifier.

The studied factors were:

- a. Extract addition (rosemary and Mexican sage, separately and together)
- b. Solvent effect during reflux
- c. Storage temperature (4°, 10° and room temperature)
- d. Storage in air

The plant extracts antioxidant effect was compared against a BHA/BHT mixture. Presence of hydrogen peroxide as prooxidant was also studied. The response variables were: color; ash, protein and moisture content; water activity; pH; long and short chain free fatty profile; and degree of oxidation (TBARS).

Hydrogen peroxide promoted color changes due to oxymyoglobin oxidation; however, it did not act as a prooxidant upon long chain free fatty acids possibly because free radical generation rate decrease as no reducing agent was present. Depending on iron

concentration and integrity of the protein matrix surrounding the fat droplets, hydrogen peroxide can also act as a prooxidant.

BHA/BHT promoted oxymyoglobin oxidation after 24 days of storage. This was because both antioxidants are reducing agents, favoring oxygen detach from the pigment molecule. However BHA/BHT considerably reduced fatty acid oxidation. Chloroform- and methanol-extracted rosemary, as well as ethanol-extracted sage protected oxymyoglobin, whereas chloroform-extracted sage favored pigment oxidation. Methanol-extracted rosemary, ethanol-extracted sage and BHA/BHT had no effect on long and short chain free fatty acid concentration after 3 days of storage at 10°.

Refrigerated storage promoted a significant increase in long chain free fatty acid concentration in samples with chloroform-extracted rosemary and ethanol-extracted sage when added both separately or together. This was possible due to the presence of lipolytic enzymes in the extracts or to the action of meat endogenous enzymes in the batter. However, no significant increase in TBARS values was observed in these samples; fatty acids could remain in the membrane, protected from oxidation by vitamin E, usually located in the membrane bi-layer. Short-chain free fatty acids significantly increased after 7 days of storage with a further decrease, behavior probably related to microorganisms present in the system. Chloroform-extracted rosemary and ethanol-extracted sage were synergists during the initial 3 days of storage at 4°. No treatment affected protein, moisture or ash content, nor water activity.

Of the studied plant extracts, the most efficient was chloroform-extracted rosemary, followed by methanol-extracted rosemary, ethanol-extracted Mexican sage, and finally chloroform-extracted sage.

*¿Crees que en el pasado has perdido mucho tiempo,
que has dejado de estudiar desde hace varios años,
que has desaprovechado valiosas oportunidades
y que has cometido errores garrafales?*

*El pasado es valioso sólo como fuente de experiencias;
pero no dejes que te ate con su grillete de lamentaciones,
ni te escondas en él para huir de tu presente.*

El ayer es el ayer y nada lo va a modificar.

*Pero tu presente y futuro te pertenecen,
porque la vida comienza cuando uno define lo que realmente
quiere de ella.*

*Es cierto que el tiempo es eterno;
pero para ti apenas está comenzando,
porque:*

“Hoy es el primer día del resto de tu vida”

1. INTRODUCCION

Son numerosos los derivados de origen animal que se utilizan como alimento. La carne, la leche, los productos lácteos y los huevos son los más importantes, tanto desde el punto de vista económico como en términos cuantitativos.

La importancia de la carne deriva no sólo de su atractivo sensorial, también de su elevado valor nutritivo (Fisher y Bender, 1972; Hultin, 1993).

Los lípidos intramusculares están compuestos de depósitos de lípidos en células adiposas y de lípidos asociados con las membranas. Contienen grandes cantidades de fosfolípidos, cuyos ácidos grasos tienen mayor número de insaturaciones que los correspondientes a los triglicéridos (Nawar, 1993).

En la carne de cerdo los ácidos grasos monoinsaturados son los que se encuentran en mayor cantidad (3.06 g/100g), siguiéndole los saturados (2.34 g/100 g) y finalmente los poliinsaturados (0.71 g/100g) (Rhee, 1992).

Durante el almacenamiento, en el tejido muscular postmortem se producen cambios en los componentes lipídicos, apareciendo malos olores y sabores, lo que se le conoce como rancidez. Los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles a la oxidación que los monoinsaturados.

La oxidación de los ácidos grasos es una de las principales causas de deterioro en la carne de cerdo fresca, en virtud de que da lugar a la aparición de colores, sabores y olores desagradables, lo que la hace inaceptable para el consumidor o que se reduzca su vida de almacenamiento. Por otra parte, las reacciones de oxidación pueden disminuir la calidad nutritiva de los alimentos, y algunos productos de oxidación son potencialmente tóxicos (Nawar, 1993).

La oxidación de los lípidos puede retrasarse de varias formas, una de ellas es la utilización de antioxidantes.

Los antioxidantes son sustancias químicas que retardan el inicio y disminuyen la velocidad de oxidación de los compuestos autooxidables (Shahidi y col., 1992; Nawar, 1993), en este caso el interés de este trabajo de investigación está centrado en los lípidos y en la oximioglobina.

El tema de los antioxidantes naturales se ha desarrollado no sólo por la demanda del

consumidor de alimentos naturales, también por un incremento en las limitaciones sobre la utilización de antioxidantes sintéticos, debido a sus posibles efectos carcinogénicos. En general, los antioxidantes naturales son preferidos por los consumidores a causa de que se consideran como seguros.

Las hierbas y especias se utilizan no sólo como ingredientes tradicionales de los alimentos, también por sus características antioxidantes. Algunos ejemplos de ellas son el orégano (*Poliomintha longiflora* Gray), 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 (*Syzygium aromaticum* L.).

Se han hecho estudios sobre la actividad antioxidante de las especias 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 3-*t*-butil-4-hidroxianisol (BHA, por sus siglas en inglés), 3,5-di-*t*-butil-4-hidroxitolueno (BHT, por sus siglas en inglés) o el producto natural α -tocoferol (Madhavi y col., 1996).

Los extractos tanto de salvia europea como de romero han mostrado tener una excelente actividad antioxidante en concentraciones de 0.02% al utilizarlos en lardo, debido a que disminuyen la cantidad de peróxidos formados, con una efectividad similar a la del antioxidante sintético Tenox VI[®] (mezcla de BHA, BHT, 3,4,5-trihidroxi-*propil*benzoato y ácido cítrico) (Chang y col., 1977). Asimismo, se ha evaluado el efecto antioxidante del extracto de romero en carne molida precocida de cerdo, adicionándolo antes y después de los diferentes métodos de precocido, y encontrándose que la incorporación posterior es más efectiva (Guntensperger y col., 1998). Chen y col. (1999) al estudiar el efecto de los antioxidantes sesamol, quercitina, rutina, oleoresina de romero y BHT en la oxidación de lípidos y cambios en el color en carne de cerdo cruda irradiada observaron que después de 3 días de almacenamiento a 4° todos estos compuestos tienen efecto antioxidante. Con relación al color, el cambio fue mínimo independientemente del antioxidante de que se trate.

Por otra parte, Johns y col. (1989) evaluaron los catalizadores de la oxidación de lípidos en productos cárnicos, una emulsión que contenía agua, clara de huevo, lardo y almidón de maíz a la que se le agregó sulfato ferroso y a otra hemoglobina con el fin de determinar su

efecto oxidante en los lípidos; el otro producto fue músculo de cerdo sin grasa al que se le agregó hemoglobina o hierro inorgánico. En todos los casos se observó que los pigmentos hemo, a los niveles presentes en la carne, son catalizadores más potentes en la oxidación de lípidos que el hierro inorgánico.

Se estudió el extracto de romero debido a que a pesar de que se han realizado varios estudios con este material en muy pocos se ha observado su efecto antioxidante en pasta de carne cruda de cerdo. Por otra parte, no se tiene información sobre la actividad antioxidante del extracto de romero a distintas temperaturas de almacenamiento. En el caso del extracto de salvia de bolita, no se cuenta con algún dato relacionado con su composición y actividad antioxidante. Es de interés tanto científico como práctico comparar el efecto de ambos, utilizando diferentes disolventes para su extracción dado que se ha reportado que el extracto de romero en metanol tiene un poder antioxidante mayor que el obtenido con cloroformo (Chang y col., 1977). Sin embargo, se ha observado que este efecto depende del sustrato utilizado (Madsen y Bertelsen, 1995); es importante también comparar su poder antioxidante contra dos compuestos sintéticos utilizados en la industria alimentaria: BHA y BHT (Macrae y col. 1993a).

Se tiene conocimiento de que al utilizar la oleoresina comercial de romero (mezcla de resina y aceite esencial) se presenta un cambio mínimo en el color de carne cruda de cerdo, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, es importante estudiar si este comportamiento se presenta a diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento, cuando se aplican extractos de romero y salvia tanto juntos como por separado, y el efecto de éstos en la concentración de algunos de los ácidos grasos libres que se encuentran en mayor cantidad en la grasa de cerdo (ácidos mirístico, palmitoleico, palmítico, oleico y esteárico), así como en ácidos de cadena corta (láctico y acético).

2. JUSTIFICACION

Dado que la tendencia de los consumidores es hacia el consumo de alimentos naturales y en virtud de que la oxidación de los ácidos grasos y pigmentos en la carne cruda se inicia inmediatamente después de la matanza en detrimento de la vida útil, es importante retardar y disminuir la oxidación de estos compuestos químicos mediante la utilización de extractos vegetales.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Determinar el efecto antioxidante de los extractos de romero y de salvia de bolita en pastas de carne cruda de cerdo.

3.2 Específicos

- Obtener los extractos de romero y de salvia de bolita con diferentes disolventes.
- Determinar el efecto antioxidante de los extractos de romero y de salvia, solos o combinados en diferentes concentraciones.
- Cuantificar los compuestos derivados de la oxidación de ácidos grasos (valor de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico - TBARS).
- Evaluar el cambio de color en las pastas de carne cruda de cerdo.
- Cuantificar los ácidos grasos libres de cadena larga y de cadena corta en las pastas añadidas con extractos de salvia y de romero durante el almacenamiento.

4. REVISION BIBLIOGRAFICA

El término carne se refiere al músculo, especialmente al de los mamíferos, que ha sufrido cambios físicos y bioquímicos después de la muerte.

El desangrado es el primer paso del sacrificio. La sangre transporta nutrientes esenciales para el músculo y elimina los productos de desecho. Al fallar el aporte sanguíneo, en primer lugar falta el aporte de oxígeno al músculo, quedando solo una pequeña cantidad unida a la mioglobina, sólo lo suficiente para permitir las reacciones oxidativas durante un tiempo muy breve. Cesa el metabolismo aeróbico mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena respiratoria, e inicia el metabolismo anaeróbico, por lo que hay producción y acumulación de ácido láctico, provocando una disminución del pH muscular.

En vivo hay pérdida de calor por la respiración, al cesar ésta, junto con el sistema circulatorio, se presenta un aumento en la temperatura del músculo. Este incremento aunado al bajo pH provoca la desnaturalización de proteínas, por lo que hay una pérdida de la solubilidad de las mismas y, consecuentemente baja la capacidad de retención de agua y la intensidad del color por la desnaturalización de la mioglobina. Los niveles de ATP son bajos y se forma actinmiosina, por lo que aparece la inextensibilidad del músculo.

El músculo se convierte en un medio rico para las bacterias por la presencia de metabolitos de la glucólisis y de aminoácidos. Asimismo hay pérdida del sistema de protección contra la invasión microbiana al cesar la fagocitosis de los glóbulos blancos (Alarcón, 1992).

4.1 Composición química de la carne

En la Tabla 1 se indica la composición del tejido muscular magro, similar entre especies animales.

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

Especie	Proteína (g)	Grasa (g)	Calcio (mg)	Hierro (mg)	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Niacina (mg)
Res	5	3.6	3	0.8	0.03	0.05	1.3
Cordero	4	2.5	3	0.7	0.05	0.06	1.3
Cerdo	4	9	3	0.5	0.2	0.05	1
Aves	5	2	4	0.4	0.03	0.04	2.5

Fuente: AID, 1972.

Basándose en los datos anteriores, se puede concluir que la composición de la carne varía principalmente en concentración lipídica; el cerdo tiene una mayor cantidad, debido a que acumula mayor contenido de grasa.

Dentro de los requerimientos diarios de nutrientes necesarios para mantener una buena salud se encuentra la ingesta de 50 g de proteína, de la cual una tercera parte se recomienda sea de origen animal; 65 g de grasa; 1 g de calcio; 18 mg de hierro; 1.5 mg de tiamina; 1.7 mg de riboflavina y 20 mg de niacina, entre otros (Bourges-Rodríguez, 2000; Medallion Laboratories, 2004). La importancia nutritiva del músculo no sólo deriva de que su contenido en proteína sea elevado sino también de que la calidad de la proteína es alta, pues contiene todos los aminoácidos esenciales en proporciones similares a las requeridas para el mantenimiento y desarrollo de los tejidos humanos (Hultin, 1993).

Asimismo el tejido muscular es una fuente excelente de algunas vitaminas del complejo B, especialmente de tiamina, riboflavina, niacina, B₆ y B₁₂ (Fisher y Bender, 1972; Quintín, 1990; Hultin, 1993). La carne de cerdo es especialmente rica en tiamina (Fisher y Bender, 1972). También contiene, en menor proporción, las vitaminas D, E y K, y muy poco ácido ascórbico. Es una buena fuente de hierro, fósforo, sodio, potasio (Fisher y Bender, 1972; Quintín, 1990; Hultin, 1993) y zinc (Rhee, 1992).

Otros componentes, son las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa (Chen y col., 1999), así como los pigmentos hemoglobina y mioglobina.

4.1.1 Proteínas

Las proteínas que conforman el músculo se clasifican, en función de su solubilidad, en sarcoplásmicas (solubles en agua y en soluciones salinas diluidas); del tejido conectivo (insolubles) y miofibrilares (solubles en soluciones salinas concentradas) (Signorini, 2002).

Las proteínas sarcoplásmicas son aquellas que se encuentran en el sarcoplasma o en el fluido que rodea y baña a las miofibrillas, esta fracción incluye pigmentos, enzimas oxidativas (Gordon y Barbut, 1992), glucolíticas y lisosomales; nucleoproteínas, citocromos y flavoproteínas (Pearson y Tauber, 1984).

Las proteínas del tejido conectivo funcionan como una estructura de soporte para el cuerpo, están conformadas principalmente por el colágeno, la reticulina y la elastina (Pearson y Tauber, 1984; Minor-Pérez, 1998).

Las proteínas miofibrilares o contráctiles intervienen en la contracción del músculo y el movimiento del animal vivo; después de la muerte, participan en el desarrollo del rigor mortis. La actina y la miosina son las más abundantes, encontrándose en menor concentración la tropomiosina, la troponina, las actininas α y β y otras proteínas menores (Pearson y Tauber, 1984).

La miosina contiene dos cabezas globulares responsables de su actividad enzimática (ATPasa) y de su capacidad para interactuar con la actina durante la contracción muscular; a su vez, estas cabezas contienen el extremo amino terminal de las dos cadenas polipeptídicas que conforman la molécula. Asociadas con cada cabeza existen dos cadenas ligeras, de modo que a cada molécula de miosina se asocian cuatro cadenas ligeras. Determinadas enzimas proteolíticas, como la tripsina, escinden la miosina en la proximidad de la cabeza, dando origen a dos fracciones proteicas. Una de ellas se denomina meromiosina ligera (MML) (150 kDa) y la otra, que contiene las estructuras globulares de la cabeza, meromiosina pesada (MMP) (350 kDa). Al ser tratada la meromiosina pesada con papaína origina dos subunidades denominadas subfragmento 1 (S1, fracción globular) y subfragmento 2 (S2, fracción helicoidal) (Figura 1) (Hultin, 1993).

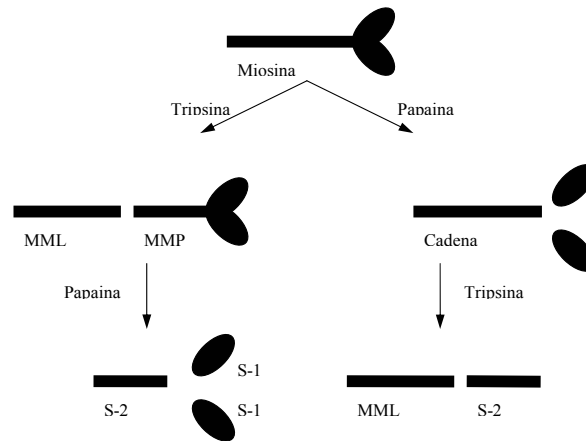


Figura 1. Diagrama de la miosina y sus subfragmentos (Hultin, 1993)

4.1.2 Carbohidratos

Constituyen el 1.2 % en peso de la carne, el ácido láctico proveniente de la degradación del glucógeno aporta el 0.9 %, la glucosa-6-fosfato el 0.15, el glucógeno el 0.1 y la glucosa y trazas de otros intermediarios glucolíticos el 0.05; el glucógeno se encuentra mayormente en el hígado, por lo cual la carne se considera una fuente pobre de carbohidratos (Lawrie, 1985; Alarcón, 1992).

4.1.3 Lípidos

La composición lipídica de la carne se puede dividir en lípidos del tejido adiposo (depósito de grasa) y lípidos del tejido muscular (lípidos intramusculares).

Los depósitos de grasa se encuentran principalmente como capas subcutáneas, pero también pueden estar presentes entre los músculos como depósitos intermusculares y alrededor de los riñones, del corazón y de la región pélvica. Están constituidos, en mayor proporción, de triglicéridos con ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Nawar, 1993).

Los lípidos intramusculares están compuestos de depósitos de lípidos en células adiposas, comúnmente llamado marmoleo, y de lípidos asociados con las membranas. Contienen grandes cantidades de fosfolípidos, los cuales pueden estar asociados con proteínas como las lipoproteínas (Rhee, 1992), los ácidos grasos que constituyen estos

fosfolípidos tienen mayor número de insaturaciones que los correspondientes a los triglicéridos (Nawar, 1993).

Los principales ácidos grasos que se encuentran en la carne de mamíferos son los saturados mirístico (14:0), palmítico (16:0) y esteárico (18:0); y los insaturados palmitoleico (16:1), oleico (18:1), linoleico (18:2), linolénico (18:3) y araquidónico (20:4). El porcentaje de estos ácidos grasos puede variar de acuerdo con la especie, tejido, dieta, raza, sexo, edad y medio ambiente.

En la Tabla 2 se enlista el contenido de ácidos grasos en carne magra cruda de res, cerdo, cordero, ternera y pollo.

Tabla 2. Contenido de ácidos grasos (g/100g muestra) de carne magra cruda para diferentes especies animales

Acidos grasos	Res	Cerdo	Cordero	Ternera	Pollo	
					Pechuga	Pierna
Cáprico (10:0)	0	0.01	0.01	0		
Láurico (12:0)	0	0.01	0.01	0	0	0.02
Mirístico (14:0)	0.17	0.08	0.14	0.04	0.01	0.02
Palmítico (16:0)	1.42	1.49	1.02	0.49	0.21	0.65
Palmitoleico (16:1)	0.24	0.21	0.16	0.09	0.03	0.17
Esteárico (18:0)	0.74	0.73	0.62	0.3	0.1	0.26
Oleico (18:1)	2.4	2.78	1.91	0.82	0.25	0.98
Linoleico (18:2)	0.2	0.59	0.36	0.21	0.17	0.73
Linolénico (18:3)	0.01	0.04	0.07	0.01	0.01	0.03
Araquidónico (20:4)	0.03	0.08	0.05	0.08	0.04	0.09
Otros AGS ^a	0.12	0.33	0.08	0.03	0.01	0.03
Otros AGMI ^b	0.12	0.07	0.04	0.01	0.02	0.03
Otros AGPI ^c	0.02	0	0	0	0.06	0.1
Total AGS	2.45	2.34	1.88	0.86	0.33	0.98
Total AGMI	2.76	3.06	2.11	0.92	0.3	1.18
Total AGPI	0.26	0.71	0.48	0.3	0.28	0.95

^a AGS, ácidos grasos saturados

^b AGMI, ácidos grasos monoinsaturados

^c AGPI, ácidos grasos poliinsaturados

Fuente: Rhee, 1992.

De acuerdo con los datos anteriores se puede observar que, entre las especies de carne roja, la de cerdo contiene una cantidad sustancialmente mayor de ácidos grasos poliinsaturados (0.71 g/100g), principalmente linoleico. Asimismo la concentración de ácido oleico (2.78 g) es la mayor, siguiéndole en orden decreciente los ácidos palmítico (1.49 g), esteárico (0.73 g), linoleico (0.59 g) y palmitoleico (0.21 g), principalmente (Rhee, 1992).

4.2 Ácidos de cadena corta

4.2.1 Metabolismo anaeróbico

Cuando el aporte de oxígeno a los músculos es insuficiente para mantener la resíntesis de ATP por la vía del metabolismo aeróbico éste debe ser resintetizado vía el sistema glucolítico anaeróbico, en donde el producto final es el ácido láctico. La glucosa, almacenada como glucógeno, es convertida en piruvato – un ácido de tres carbonos – y la energía liberada se emplea para fosforilar ADP a ATP (Colby, 1987; Alarcón, 1992).

Por otra parte, la glucólisis anaeróbica irreversible ocurre cuando el oxígeno es eliminado del músculo después de la muerte. La secuencia de pasos químicos por los cuales el glucógeno se convierte en ácido láctico son esencialmente los mismos postmortem que *in vivo* cuando el suministro de oxígeno es insuficiente. Esta conversión continúa hasta que el pH inactiva las enzimas del ciclo glucolítico. El pH que se alcanza ya sea por falta de glucógeno, inactivación de las enzimas o porque el glucógeno es inaccesible, es llamado pH final, y es alrededor de 5.5 (Lawrie, 1985; Alarcón, 1992).

4.2.2 Bacterias lácticas

La composición de la microflora inicial de la carne depende de las fuentes de contaminación, la cual puede provenir del cuero, materia fecal o superficies que han estado en contacto con la carne. Por lo tanto, la incidencia de diferentes géneros en la carne fresca varía grandemente. Sin embargo, se ha observado que no hay diferencia entre la microflora que se encuentra en la grasa y en la carne (Dainty y col., 1983).

Los microorganismos pueden utilizar como fuentes de energía una amplia gama de compuestos orgánicos oxidables. El catabolismo, que implica la oxidación de los compuestos orgánicos, conduce también a la formación de distintos compuestos de dos, tres y cuatro átomos de carbono.

En cuanto al metabolismo productor de energía en los microorganismos quimiorganótrofos, su crecimiento depende de la oxidación o de la fermentación de compuestos orgánicos exógenos. La fermentación se refiere a aquellas reacciones productoras de energía en las que actúan, tanto de donadores como de aceptores de electrones, compuestos orgánicos (Rose, 1969).

El músculo postmortem ofrece un ambiente altamente nutritivo a la microflora contaminante. Las fuentes de energía más importantes en el músculo incluyen a la glucosa, glucosa-6-fosfato, ácido láctico y aminoácidos, los cuales son sustratos de crecimiento bacteriano; mostrando una preferencia inicial por la glucosa, para proseguir con la degradación de aminoácidos. Por ejemplo las *Pseudomonas*, bacterias entéricas y *Alteromonas*, pueden también hidrolizar el ácido láctico cuando los sustratos preferentes han disminuido (Dainty y col., 1983; Greer, 1988).

Por otro lado, el ácido láctico es un producto frecuente de las fermentaciones de los hidratos de carbono, especialmente por las bacterias del ácido láctico. Los microorganismos que producen ácido láctico pueden subdividirse en fermentadores homolácticos, que producen casi exclusivamente láctico, y fermentadores heterolácticos, que producen además de láctico cantidades considerables de etanol, ácido acético y dióxido de carbono (Rose, 1969). Asimismo, bajo condiciones de tensión de oxígeno reducida (vacío, atmósferas modificadas), las bacterias lácticas se tornan dominantes (Greer, 1988). A valores de pH relativamente bajos pueden sobrevivir y desarrollarse (Minor-Pérez, 1998).

Algunas bacterias lácticas no sólo son capaces de formar ácido láctico, también pueden degradarlo a 1,2-propanodiol, ácido acético y trazas de etanol bajo condiciones anaeróbicas, cuando la fermentación de los carbohidratos solubles en agua ha finalizado, lo cual provoca la acidificación del medio ambiente; la conversión se da únicamente cuando se tienen valores de pH menores de 5.8. Por otro lado la producción de ácido láctico también se incrementa con la temperatura, teniéndose un óptimo entre 20 y 30° (Elferink y col., 2001).

Se ha observado que existen algunas bacterias, especialmente miembros de las enterobacteriáceas, que pueden llevar a cabo una fermentación fórmica. En ésta, el metabolismo del ácido pirúvico conduce a cierto número de productos distintos, cuya naturaleza varía con cada organismo. Sin embargo, todos ellos producen ácido fórmico que, o bien se acumula o en ambiente ácido se convierte en hidrógeno molecular y dióxido de carbono. Dentro de estas bacterias se encuentran las del tipo ácido mixto, como *Escherichia coli*; en este organismo, por cada cuatro moléculas de ácido pirúvico formadas, se reducen dos a ácido láctico y las otras dos son metabolizadas para dar ácidos acético y fórmico. A su vez el ácido acético se reduce a etanol (Rose, 1969).

4.3 Emulsión

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 (Gordon y Barbut, 1992; Hultin, 1993). En algunos casos como las pastas cárnicas los glóbulos de grasa son más grandes del tamaño requerido para formar una emulsión verdadera ($< 20 \mu\text{m}$) (Gordon y Barbut, 1992). Sin embargo, este sistema de dispersión es lo más cercano a una emulsión, por ello se le denomina una emulsión aceite en agua (Flores y Bermell, 1985).

Con base en lo anterior, una pasta cárnica se describe como una mezcla finamente molida de proteínas musculares, partículas de grasa, agua, sal y otros ingredientes que dan como resultado un producto cárnico homogéneo con una estructura compleja (Figura 2).



Figura 2. Ilustración esquemática de una pasta cárnica (Gordon y Barbut, 1992)

Para obtener emulsiones estables debe contrarrestarse la tendencia espontánea a minimizar el área interfacial a través de la coalescencia (unión de dos o más gotas para formar grandes gotas esféricas), lo que se consigue añadiendo un emulsificante, compuestos que contienen grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, los cuales se adsorben en la interfase aceite-agua disminuyendo la tensión interfacial y como consecuencia, la coalescencia (Flores y Bermell, 1985; Dickinson, 1993; Hultin, 1993).

Una pasta cárnica se forma añadiendo sal a la carne magra y proporcionando energía a través de masajeo o molienda para extraer las proteínas miofibrilares. El agua se añade para crear un medio rico en proteína capaz de ligar humedad y grasa (Gordon y Barbut 1992). Los fosfatos, así como el cloruro de sodio provocan el aumento de la viscosidad de las proteínas miofibrilares, mejorando la estabilidad de la emulsión así como favoreciendo la solubilización de las mismas al formar una solución salina y por tanto aumentando la capacidad de emulsión (cantidad de aceite que puede emulsionar un gramo de proteína antes de que se destruya o invierta la emulsión) (Flores y Bermell, 1985; Guerrero y col., 2002).

Las proteínas miofibrilares actúan como emulsificantes en virtud de que contienen grupos eléctricamente neutros que por su carácter lipofílico se orientan hacia las moléculas de grasa, y grupos cargados negativamente o hidrofílicos que tienen afinidad por las moléculas de agua. Cuando se forma la emulsión, la grasa se encuentra dispersa en pequeñas gotas que se rodean de una película proteica cuyos grupos negativos se orientan

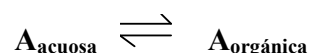
hacia la fase exterior o continua, repeliéndose unos a otros por lo que proporcionan estabilidad a la emulsión (Flores y Bermell, 1985; Dickinson, 1993). Junto con las proteínas miofibrilares, las sarcoplásmicas y el colágeno pueden interactuar con otros componentes de la pasta para darle estabilidad (Gordon y Barbut 1992).

4.4 Coeficiente de distribución

Cuando se agitan durante algún tiempo volúmenes conocidos de solución diluida y de dos disolventes inmiscibles, el soluto se distribuye entre ambos.

La distribución del soluto entre las dos fases es un proceso de equilibrio que sigue la Ley de acción de masas. Las constantes de equilibrio para estos procesos varían con los diferentes solutos; sin embargo es constante para soluciones diluidas a una temperatura constante.

Para un soluto **A** en el equilibrio que se distribuye entre una fase acuosa y una fase orgánica:



Por lo tanto, a una temperatura dada la constante de equilibrio K está dada por la Ley de distribución de Nernst.

$$K = [\mathbf{A}_{orgánica}] / [\mathbf{A}_{acuosa}]$$

K es el coeficiente de distribución, $\mathbf{A}_{orgánica}$ y \mathbf{A}_{acuosa} representan las concentraciones del soluto en la fase orgánica y en la fase acuosa. Esta ecuación también describe la solubilidad relativa del soluto en las dos fases; en el equilibrio, cuanto mayor es el valor de K , menos soluble es el compuesto en el agua (Ander y Sonnessa, 1979).

4.5 Oxidación de lípidos

La rancidez puede ser causada por la reacción del oxígeno atmosférico con las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados, también llamada rancidez oxidativa (Ockerman,

1980; Hamilton, 1994). En esta reacción únicamente participan los ácidos grasos como especie reactiva, o por enzimas (Hamilton, 1994).

Las bajas temperaturas estimulan la oxidación lipídica, debido a que por una parte, el agua se congela y aquella que queda en estado líquido forma una solución concentrada de los reactivos. Por otra parte se evitan las reacciones de oxidación de origen microbiano o rancidez cetónica, pero pueden continuar las reacciones originadas por lipasas, estererasas y fosfolipasas que hidrolizan los enlaces éster de los lípidos (lipólisis) liberando ácidos grasos libres (rancidez hidrolítica), los cuales además de no congelarse, son más susceptibles a la oxidación que aquellos que se encuentran esterificando al glicerol (Nawar, 1993; Ranken, 1994). Por otra parte, se ha observado que la hidrólisis de los fosfolípidos ocurre más rápidamente que la de los triglicéridos (Nawar, 1993; Alasnier y col., 2000).

Entre la carne cruda y la cocida, esta última es más susceptible a la oxidación lipídica debido, en parte, a los cambios cualitativos y cuantitativos en los catalizadores que se forman durante el cocimiento, y a que existe una desnaturalización de las lipoproteínas de las membranas, liberando fosfolípidos que son la fuente principal de ácidos grasos poliinsaturados los cuales, debido a un mayor número de dobles ligaduras en las cadenas, son más susceptibles a oxidarse.

La oxidación de los lípidos en carne cruda se incrementa por incorporación de aire y, en consecuencia, de oxígeno si ésta se somete a una reducción del tamaño (molido, picado) (Brewer, 1998), congelado y descongelado repetido, abuso de la temperatura en el manejo y tiempo de distribución y almacenamiento prolongado. Es importante mencionar que cualquier grado de oxidación de lípidos en la carne cruda puede acelerar la oxidación en carne cocida o procesada (Rhee, 1992).

4.5.1 Oxidación enzimática

Se lleva a cabo por lipoxigenasas, las cuales catalizan la reacción de los ácidos grasos poliinsaturados con el oxígeno, con la consecuente formación de hidroperóxidos. Las enzimas oxidan específicamente ácidos que contienen dobles ligaduras con un metilo intermedio como los ácidos linoleico, linolénico y araquidónico (Jadhav y col., 1996); además son regio y estereoespecíficas, es decir, catalizan la oxigenación de carbonos

específicos y dan lugar a hidroperóxidos enantiómeros (Nawar, 1993). Estas enzimas están presentes en las especias, la harina de trigo y harinas vegetales (Jadhav y col., 1996) y peces (Nawar, 1993).

4.5.2 Autoxidación

La autoxidación de lípidos es un término que se utiliza para describir una secuencia compleja de cambios químicos resultado de la reacción espontánea de especies reactivas de oxígeno con los lípidos (Nawar, 1993; Macrae y col., 1993a). Una de las características de este proceso es un período de inducción, durante el cual no es detectable el desarrollo de ningún mal olor o sabor (Hamilton, 1994). Al final de este período la grasa inicia su deterioro rápidamente, liberando compuestos volátiles. La duración de este período depende de componentes menores que pueden alargarlo, los cuales se denominan antioxidantes, o lo pueden acortar, en cuyo caso se conocen como prooxidantes (Macrae y col., 1993a). Se lleva a cabo por mecanismos de radicales libres, 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, 1970).

El mecanismo preciso de oxidación depende de la naturaleza de las especies reactivas presentes y su medio ambiente fisicoquímico, teniéndose tres etapas:

1) En la etapa de iniciación se forman los radicales libres a partir de los ácidos grasos (RH), 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), éste puede ser oxígeno singulete, alguna sal metálica, luz o calor (Ockerman, 1980).

2) Durante la propagación, también se forman radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) y hay una subsecuente reacción de éstos con los ácidos grasos que se encuentran en su vecindad, para formar hidroperóxidos (ROOH); los nuevos radicales ($\text{R}\cdot$) que se forman quedan disponibles para futuras reacciones con oxígeno molecular (O_2). Un radical peroxilo puede extraer un hidrógeno del grupo CH_2 de los residuos de los ácidos linoleico o linoléico, esto se debe a que, de acuerdo con la Tabla 3 la energía de disociación de este hidrógeno,

llamado doblemente alílico porque está conectado a un carbono que se encuentra entre dos dobles enlaces, es inferior a la de la unión C – H en la posición alílica (hidrógeno unido a un carbono adyacente al doble enlace) (Morrison y Boyd, 1970), a la del O - H de los hidroperóxidos y a la del C – H de la cadena alifática (Jadhav y col. 1996) (Tabla 3).

3) Finalmente, cuando todo el oxígeno o los compuestos que pueden donar hidrógeno como los ácidos grasos han reaccionado, se inicia la fase de terminación. En ésta, al haber un incremento en la concentración de radicales la frecuencia de un encuentro entre ellos también aumenta, dando como resultado un acoplamiento para formar compuestos más estables e inactivos (Larson, 1988; Jadhav y col., 1996).

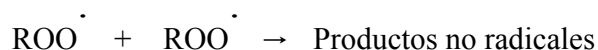
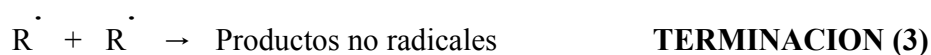
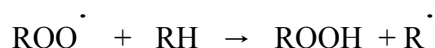
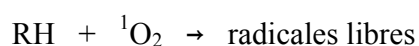
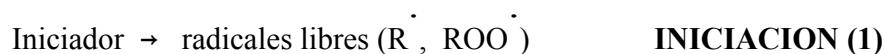
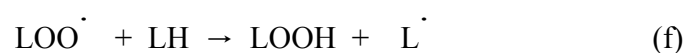
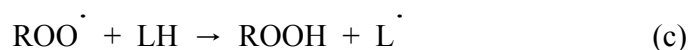
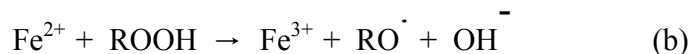
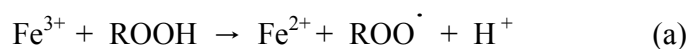


Tabla 3. Energías de disociación para enlaces de hidrógeno

Unión	Energía de disociación (kcal/mol)
H - H	104.2
CH ₃ - H	104.3
$\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{CH} - \text{H} \\ \diagup \\ \text{R} \end{array}$	96.3
$\begin{array}{c} \text{RCH} = \text{CH} \\ \diagdown \\ \text{CH} - \text{H} \\ \diagup \\ \text{R} \end{array}$	85
$\begin{array}{c} \text{RCH} = \text{CH} \\ \diagdown \\ \text{CH} - \text{H} \\ \diagup \\ \text{RCH} = \text{CH} \end{array}$	76
HO - H	119.3
ROO - H	88

Fuente: *Jadhav, 1996*

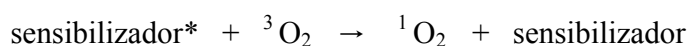
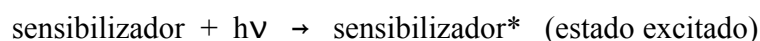
En algunos casos la etapa de iniciación se establece por descomposición de hidroperóxidos (ROOH) a radicales peroxilo (ROO \cdot) y alcoxilo (RO \cdot) que son altamente reactivos, mediante un catalizador metálico (Fe²⁺, Fe³⁺) (Mc Clements y Decker, 2000) al cual se le denomina prooxidante (metales de transición, particularmente aquellos que poseen dos o más valencias; por ejemplo cobalto, cobre, hierro, manganeso o níquel) (Nawar, 1993), o por exposición a la luz (Tabla 4, a y b). Estos radicales reaccionan con ácidos grasos insaturados (LH) dentro de las gotas de grasa o en la interfase, lo cual provoca la formación de radicales (L \cdot y LOO \cdot) (Tabla 4, c, d y e). La oxidación se propaga como una reacción en cadena en donde estos radicales reaccionan con otros ácidos grasos que están en su vecindad inmediata (Tabla 4f). Algunos de los radicales formados pueden reaccionar con otros radicales, terminando la reacción (Tabla 4g) (Mc Clements y Decker, 2000).

Tabla 4. Oxidación de ácidos grasos catalizada por metales

En ocasiones, el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) es la especie activa responsable de formar los primeros radicales libres que inician el proceso de autooxidación.

En el estado singlete, los dos electrones de los orbitales $2p\pi$ tienen espines opuestos y por tanto una gran repulsión electrostática, dando lugar a un estado excitado. Es más electrofílico que en el estado triplete ($^3\text{O}_2$) (estado de baja energía electrostática repulsiva) y por tanto puede reaccionar más rápidamente con zonas de densidad electrónica alta, tales como los enlaces $\text{C}=\text{C}$. Los hidroperóxidos resultantes pueden romperse para iniciar una reacción en cadena por radicales libres (Nawar, 1993).

El oxígeno singlete se puede generar por compuestos fotosensibilizadores (sensibilizadores), los cuales pueden ser pigmentos naturales de la carne como la hemoglobina y la mioglobina. Cuando los sensibilizadores son expuestos a la luz, pasan al estado excitado y esta energía la transfieren al oxígeno, el cual pasa del estado triplete al singlete (Bhagavan y Nair, 1992).

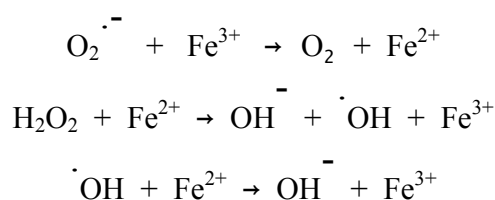


Otras especies reactivas del oxígeno son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (OH^\cdot). Todas ellas pueden atacar directamente

a través de un átomo de hidrógeno metilénico (hidrógeno unido a carbonos adyacentes a un doble enlace) del ácido graso, con la formación de un radical alquilo (R \cdot). 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).

Cada hidroperóxido formado durante la autooxidación origina una serie de productos de ruptura que dependen de su posición en la molécula originaria; estos compuestos pueden experimentar oxidaciones y descomposiciones posteriores, contribuyendo así a la formación de una gran cantidad de radicales libres de distinto tipo. Los aldehídos son los compuestos típicos mayoritarios que se producen, encontrándose en menores cantidades alcoholes, ácidos carboxílicos, cetonas, furanos e hidrocarburos, entre otros. Con relación a los aldehídos, la formación del malonaldehído (dialdehído) es el fundamento del método que utiliza ácido tiobarbitúrico para medir la oxidación de las grasas (Nawar, 1993).

Una forma de inducir la oxidación de los ácidos grasos es mediante la formación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), la cual se lleva a cabo mediante la reacción de Fenton, en donde el ión ferroso cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno para formar al ión (OH^-) y al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), con la producción del ión férrico. En esta reacción se oxida el hierro, por lo tanto, para que ésta sea continua, deben estar presentes agentes reductores, como el ascorbato, que ayuden a que el ciclo redox del hierro se lleve a cabo y de esta manera se mantenga el suministro de Fe^{2+} (Decker y Hultin, 1991; Aruoma y col., 1992; Macrae y col., 1993a; Lin y Liang, 2002).



Por lo tanto, la velocidad de oxidación catalizada por hierro en el músculo depende de la concentración y actividad de éste y de los sistemas reductores (Decker y Hultin, 1991). Al respecto, se ha observado que cuando no se adiciona ascorbato, la velocidad de generación de los radicales es lenta, debido a que esta reacción es inhibida por la superóxido dismutasa y la catalasa (Aruoma y col., 1992).

4.5.3 Métodos de prevención de la oxidación

La oxidación de los lípidos puede retrasarse de varias formas, algunas de las cuales se mencionan a continuación (Decker, 1998; Mc Clements y Decker, 2000):

- Protección de los hidroperóxidos adicionando a la fase continua de la emulsión cárnica quelantes que inactiven a los metales de transición; tales como el EDTA (etilendiamino tetracetato), proteínas o polisacáridos.
- Prevenir que los metales de transición entren en contacto con los hidroperóxidos en la interfase, utilizando emulsificantes que cambien la carga de las gotas de grasa de negativa a positiva para que, de esta manera, los metales de transición sean electrostáticamente repelidos.
- Utilizar ingredientes que puedan reducir los metales de transición a su forma menos activa.
- Separar los hidroperóxidos de los prooxidantes utilizando emulsificantes que formen una capa interfacial, la cual permita que los hidroperóxidos permanezcan de un lado y los prooxidantes del otro.
- Desnaturalización de las enzimas prooxidantes ya sea por calor, adicionando desnaturalizantes o ajustando el pH.
- Utilizando antioxidantes.
- Combinación de los procedimientos antes mencionados.

4.5.4 Antioxidantes

Los principales antioxidantes utilizados en los alimentos 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). Se ha observado que éstos no previenen la formación de ácidos grasos libres causado por la hidrólisis de la grasa, dando como resultado la rancidez de origen hidrolítica (Coppen, 1994).

4.5.4.1 Clasificación de los antioxidantes por su origen

De acuerdo con esta característica se dividen en sintéticos y naturales.

a) Antioxidantes sintéticos

Son los que comúnmente se adicionan a los alimentos, algunos de ellos son 3,5-di-*t*-butil-4-hidroxitolueno (BHT), 3-*t*-butil-4-hidroxianisol (BHA), *t*-butilhidroquinona (TBHQ, por sus siglas en inglés) y 3,4,5-trihidroxipropilbenzoato (PG, por sus siglas en inglés) (Shahidi y col., 1992; Nawar, 1993; Madhavi y col., 1996).

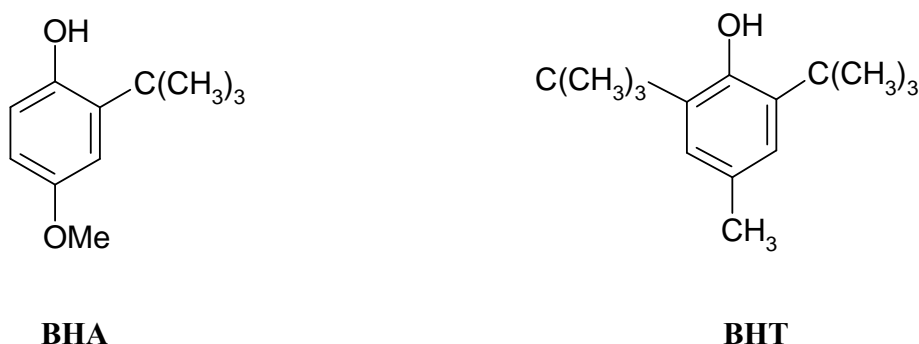


Figura 3. Estructura química del BHA y BHT (Shahidi y col., 1992)

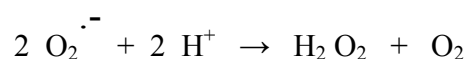
El BHA y el BHT son antioxidantes fenólicos monoxihídricos, muy solubles en grasa e insolubles en agua, tienen un excelente poder antioxidante en grasas animales (Shahidi y col., 1992; Macrae y col., 1993a; Nawar, 1993). Por su naturaleza volátil, se utilizan como aditivos en materiales de empaque debido a que pueden migrar a los alimentos. Asimismo, cuando se agregan en combinación presentan efecto sinérgico (Shahidi y col., 1992).

La toxicología de estos antioxidantes ha sido controversial, especialmente después de estudios a largo plazo que indican que el BHA y el BHT en dosis altas pueden producir tumores en animales (Madhavi y col., 1996). Por otra parte se ha observado que el BHA, estimula la formación del radical anión superóxido en los microsomas de hígado de rata (Kahl y col., 1989). Sin embargo, ambos antioxidantes presentan actividad antimicrobiana, el BHA contra *Aspergillus parasiticus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, hongos y bacterias Gram-positivas; y el BHT contra *Salmonella senftenberg* (Coppen, 1994).

b) Antioxidantes naturales

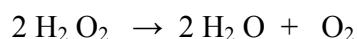
Dentro de éstos se consideran algunos compuestos presentes naturalmente en la carne como los fosfolípidos, la vitamina E, enzimas como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, entre otras.

La superóxido dismutasa cataliza la reducción del radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno ($H_2 O_2$):

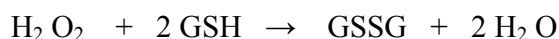


La dismutación es más rápida a pH ácido y disminuye conforme éste se incrementa. La biosíntesis de la enzima parece estar bajo un riguroso control biológico, en virtud de que una exposición a altas concentraciones de $O_2^{\cdot-}$ incrementa su producción.

La catalasa ayuda a prevenir la acumulación del peróxido de hidrógeno, como consecuencia de su alta velocidad para la destrucción del $H_2 O_2$, esta enzima raramente presenta inhibición por sustrato. El mecanismo de la reacción es el siguiente:



La glutatión peroxidasa (GSH-Px) cataliza la oxidación de la glutatión peroxidasa reducida (GSH) a su forma oxidada (GSSG) a expensas del peróxido de hidrógeno, mediante la siguiente reacción:



Esta enzima, al igual que la anterior, no se satura con el sustrato (Deshpande y col., 1996).

Un gran número de antioxidantes naturales se encuentra en plantas y animales. En años recientes se ha incrementado la promoción del uso de antioxidantes naturales sobre los antioxidantes sintéticos como BHA y BHT, en virtud de que se han reportado datos toxicológicos sobre la precaución que se debe tener en su utilización.

Muchos ingredientes comunes de los alimentos contienen compuestos antioxidantes, algunos ejemplos de ellos son los que se enlistan en la Tabla 5.

Tabla 5. Antioxidantes naturales en algunos alimentos

Fuente	Antioxidante
Aceites y semillas oleaginosas	Tocoferoles y tocotrienoles; sesamol y sustancias relacionadas; residuos de aceite de olivo; fosfolípidos
Avena y salvado de arroz	Compuestos derivados de la lignina
Frutas y vegetales	Acido ascórbico; ácidos hidroxicarboxílicos; flavonoides; carotenoides
Espicias, hierbas, té, cocoa	Compuestos fenólicos
Proteínas e hidrolizados de proteínas	Aminoácidos; dihidropiridinas; compuestos derivados de la reacción de Maillard

Fuente: Rajalakshmi y Narasimhan, 1996

Los tocoferoles y el ácido ascórbico son los más utilizados. El ácido cítrico, el ácido tartárico y la lecitina son otros componentes comunes en los alimentos y son utilizados como sinergistas. El ácido fítico, que es uno de los principales componentes de todas las semillas, es un potente agente secuestrante de metales. Las proantocianidinas de las 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, cuyo poder está determinado por el número de grupos hidroxilo en la molécula (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996).

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

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 que es uno de los saborizantes que más se utiliza, tiene propiedades antioxidantes, debidas a la vainillina y al ácido vainílico (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996).

Por otra parte, las hierbas y especias también presentan propiedades antioxidantes. En el caso de las hierbas se utilizan las hojas, troncos, flores y raíces de la planta; mientras que las especias incluyen las hierbas así como las semillas aromáticas. Algunos ejemplos de ellas son el orégano, la albahaca, el ajo, el cilantro, el romero, la salvia, el tomillo, la mejorana, el jengibre, la pimienta y el clavo (Leung y Foster, 1996).

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 y el eugenol (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996).

Los extractos de los oréganos mexicano, italiano y griego de montaña, 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 al del α -tocoferol. En el caso del aceite esencial del tomillo, el timol y el carvacrol son los compuestos que muestran una alta actividad antioxidante y antimicrobiana (Zheng y Wang, 2001).

Los extractos de romero y de salvia también tienen excelentes propiedades antioxidantes. El ácido carnósico junto con el carnosol y el ácido rosamarínico son los principales compuestos que les confieren esta actividad (Leung y Foster, 1996; Rajalakshmi y Narasimhan, 1996; Zheng y Wang, 2001).

Algunas de las ventajas y desventajas que se han encontrado al comparar los antioxidantes naturales con los sintéticos son las siguientes (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996)

Ventajas:

- Rápida aceptación de los consumidores, considerados como seguros y no químicos
- No se requieren pruebas de seguridad toxicológica por su legislación, en virtud de que son conocidos como seguros (GRAS)

Desventajas:

- Generalmente son más caros si se purifican y son menos eficientes si no se purifican
- Las propiedades de diferentes preparaciones varían si no se purifican
- Su seguridad casi siempre se desconoce
- Pueden impartir color y/o sabor al producto

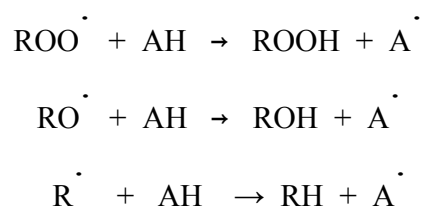
4.5.4.2 Clasificación de los antioxidantes por su mecanismo de acción

De acuerdo con esta característica se clasifican en primarios y secundarios.

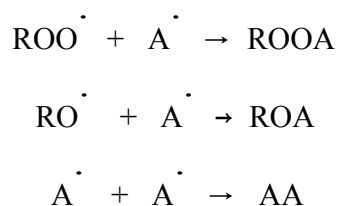
a) Antioxidantes primarios

Un antioxidante primario (AH) es aquella sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno a los radicales libres (ROO·, RO· y R·) y con esto retardar el paso de iniciación o interrumpir el paso de propagación de la autooxidación. Es decir, reaccionan con radicales libres de lípidos de alta energía para convertirlos a productos termodinámicamente más estables (Shahidi y col., 1992; Macrae y col., 1993a; Mc Clements y Decker, 2000).

Los radicales libres provenientes del antioxidante (A·) en este proceso son mucho menos reactivos que los radicales peroxilo y, por lo tanto, menos efectivos en promover la oxidación.



También pueden terminar la oxidación de los lípidos reaccionando con radicales peroxilo, alcoxilo u otros antioxidantes (Nawar, 1993).



Su efectividad varía dependiendo de sus características químicas. Por ejemplo los antioxidantes no polares como el α -tocoferol, palmitato de ascorbilo y carnosol, son más efectivos en las emulsiones aceite en agua, porque son retenidos en las gotas de aceite y/o acumulados en la interfase grasa-agua, en este último sitio es en donde ocurre la reacción de los hidroperóxidos con los prooxidantes.

Los antioxidantes polares como el Trolox® (análogo de la vitamina E, soluble en agua), ácido carnósico y ácido rosmarínico son más efectivos en el seno de la emulsión, debido a

que se acumulan en la interfase aire-grasa. En la superficie de la grasa existe una concentración relativamente alta de oxígeno y los hidroperóxidos que son relativamente polares se acumulan en la interfase grasa-aire, por lo cual la oxidación ocurre más rápidamente en esta zona que en el seno de la emulsión; en consecuencia los antioxidantes que se encuentran en la interfase son más efectivos en el retraso de la oxidación (Mc Clements y Decker, 2000).

Se ha observado que sólo son efectivos si se agregan antes de que finalice el período de inducción, en el cual hay poco cambio en el estado oxidativo de la grasa (Macrae y col., 1993a).

Los antioxidantes primarios sintéticos más utilizados en alimentos son BHA y BHT, entre otros. Estos antioxidantes son altamente efectivos en el control de la oxidación de lípidos. Dentro de los antioxidantes primarios naturales se encuentran los tocoferoles, el ácido gálico y sus derivados, flavonoides (incluyendo la ramnetina, kampferol, rutina, ácido cafeico, carnosina, carnosol, ácido rosmarínico y ácido carnósico) (Macrae y col., 1993a; Mc Clements y Decker, 2000).

b) Antioxidantes secundarios

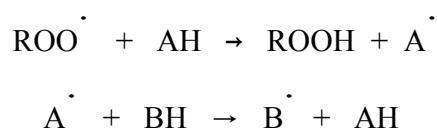
Los antioxidantes secundarios o preventivos pueden retardar la oxidación de lípidos a través de una variedad de mecanismos los cuales incluyen quelación de metales de transición, donación de electrones, eliminación de oxígeno (Nawar, 1993), formación de productos de oscurecimiento con actividad antioxidante (melanoides, productos de la reacción histidina-glucosa) (Brewer, 1998), estabilización de hidroperóxidos con lo que retardan la iniciación de la cadena (Shahidi y col., 1992) y desactivación de especies reactivas de oxígeno. Algunos ejemplos de éste tipo de antioxidantes sintéticos utilizados en alimentos son el EDTA, fitatos, ácido fosfórico y polifosfatos; dentro de los naturales se utilizan los ácidos cítrico (Mc Clements y Decker, 2000) y ascórbico (Nawar, 1993), proteínas, hidrolizados de proteínas, polisacáridos (Mc Clements y Decker, 2000) y fosfolípidos (Macrae y col., 1993a).

4.5.4.3 Sinergismo

Los antioxidantes primarios y secundarios, cuando se utilizan de manera conjunta presentan sinergismo, es decir, la mezcla tiene una actividad más pronunciada que la suma de las actividades de los antioxidantes utilizados separadamente.

Se conocen dos tipos de sinergismo, uno que implica la acción de aceptores de radicales libres mezclados y otro que implica la acción combinada de un aceptor de radical libre y un acomplejante de metales.

a) La acción de dos aceptores de radicales libres mezclados, AH y BH, supone que la energía de disociación del enlace B-H es menor que la de A-H, además de que BH reacciona lentamente con el radical ROO \cdot por impedimento estérico. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



De esta manera, la presencia de BH permite la regeneración del antioxidante primario.

b) Los agentes acomplejantes de metales desactivan parcialmente las trazas de metales, los cuales se encuentran presentes con frecuencia en forma de sales de ácidos grasos. Las propiedades antioxidantes de un aceptor de radicales libres pueden intensificarse sustancialmente por la acción de un agente acomplejante de metales (Nawar, 1993).

Los fosfolípidos como la fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilserina, así como los aminoácidos glicina y metionina funcionan como sinergistas (Madhavi y col., 1996).

4.5.5 Determinación de la actividad antioxidante

Para determinar la actividad de un antioxidante es necesario medir el período de inducción de una grasa con y sin antioxidante, lo que se realiza almacenando la muestra en un horno llevándose a cabo mediciones periódicas del estado oxidativo (Macrae y col., 1993a). Las determinaciones cuantifican intermediarios o productos finales de la oxidación

(Ockerman, 1980), algunos de los métodos utilizados son el valor de peróxido, evaluación sensorial, valor TBARS (sustancias reactivas de ácido 2-tiobarbitúrico, por sus siglas en inglés) (Macrae y col., 1993a), valor de anisidina (Rossell, 1994), análisis por cromatografía de gases del espacio vacío (Jadhav y col., 1996). Otro método de uso reciente es la ORAC (capacidad de absorbanza de radicales con oxígeno, por sus siglas en inglés) (Products and Technologies, 2003).

El valor de peróxido se basa en la determinación de la concentración de éstos en la grasa formados en el período de inducción, a través de la medición del oxígeno absorbido como una función del tiempo (Kirk y col., 1999). Es una determinación poco utilizada debido a que los peróxidos inicialmente formados al tener varias insaturaciones, son inestables y reaccionan rápidamente para formar productos de oxidación secundarios. Debido a esto la cantidad de peróxidos permanece relativamente baja, aún después de una extensa oxidación. En este caso el valor de anisidina o el de TBARS son a menudo los más recomendados.

El valor TBARS está relacionado con el nivel de aldehídos presentes en la grasa, el ácido 2-tiobarbitúrico reacciona específicamente con el malonaldehído para dar un cromógeno rojo. Esta prueba es útil en la determinación de los estados iniciales de rancidez en aceites vegetales líquidos, lardo, grasas y alimentos que contengan carne (Rossell, 1994).

La prueba ORAC es un método utilizado para medir la capacidad antioxidante de un compuesto que se encuentra en un material de prueba al inhibir la disminución de la fluorescencia, que es inducida por un generador de radicales peroxilo. Es decir, la intensidad de la fluorescencia es menor conforme la muestra es dañada por los radicales libres. En presencia de un antioxidante la fluorescencia disminuye más lentamente, debido a que el primero reacciona con los radicales; conforme se consume, la fluorescencia cae a cero (Zheng y Wang, 2001; Products and Technologies, 2003).

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

El romero pertenece a la familia Labiatae, la cual esta compuesta por 3500 especies aproximadamente, algunas de ellas son el toronjil, la albahaca, la mejorana, la menta, el orégano, el romero, la salvia, la ajedrea y el tomillo (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 como agujas, color verde en el haz y blanquecinas en el envés. Tiene pocas flores de color azul que se encuentran en la unión del tallo y la hoja, parecidas a unos labios (Figura 4). Los frutos tienen cuatro semillas pequeñas, como nueces.



Figura 4. Flor y rama del romero

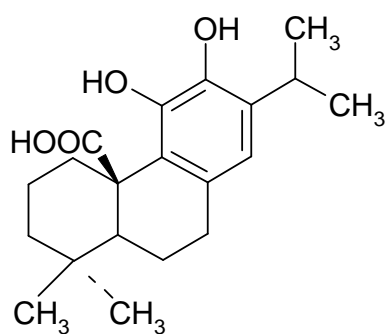
Es originaria de la Región Mediterránea y crece en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados. En México se tiene conocimiento de que se utiliza como planta medicinal en los estados de Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, México, Morelos, Oaxaca, Puebla, Sonora, Tlaxcala, Veracruz y Distrito Federal (Argueta, 1994). Algunos trastornos que cura son los del aparato digestivo, várices, hemoroides, dolor de corazón, cicatrización de heridas y parásitos intestinales, entre otros (Argueta, 1994; Betancourt y col., 2003).

Con relación al extracto, contiene diosmetina, diosmina, luteolina, hispidulina, apigenina, circimaritina, naringina; los ácidos vainílico, rosmarínico, labiático, clorogénico, neoclorogénico, cafeico, carnósico, ursólico, oleanílico; rosmaricina, isorosmaricina, carnosol, rosmanol, epirosmanol, 7-metil-epirosmanol (Madsen y

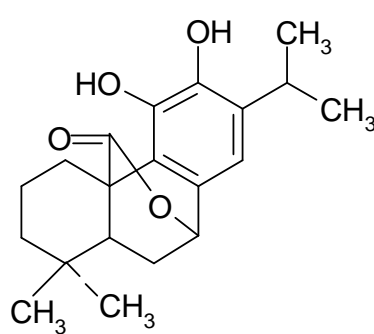
Bertelsen, 1995; Leung y Foster, 1996; Masuda y col., 2001; Zheng y Wang, 2001), rosmadial, metilcarnosato y rosmariquinona, entre otros (Hopia y col., 1996).

En las hojas en estado fresco el ácido carnósico es el que se encuentra en mayor proporción; en los troncos en menor cantidad y prácticamente nada en raíces (Okamura y col., 1994); es el principal compuesto que le confiere actividad antioxidante al extracto, otros diterpenos que actúan como antioxidantes son el carnosol (Aruoma y col., 1992; Hopia y col., 1996), rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, rosmaridifenol y rosmariquinona (Jadhav y col., 1996; Rajalakshmi y Narasimhan, 1996) (Figura 5). También se ha reportado que los ácidos vainílic, cafeico (Rajalakshmi y Narasimhan, 1996) y labiático (Leung y Foster, 1996) contribuyen a esta actividad.

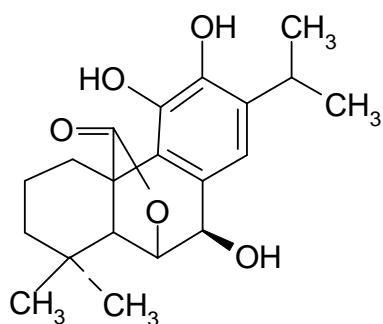
El ácido carnósico es inestable, su degradación se promueve incrementando la temperatura y su exposición a la luz (Okamura y col., 1994); asimismo, en presencia de oxígeno puede oxidarse para formar carnosol, rosmanol, epirosmanol, 7-metil-epirosmanol (Madsen y Bertelsen, 1995; Masuda y col., 2001).



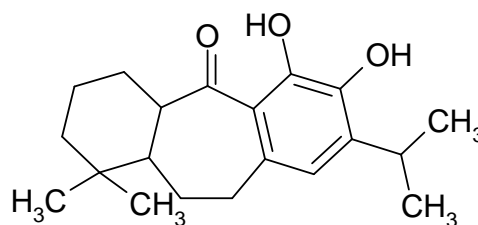
Acido carnósico



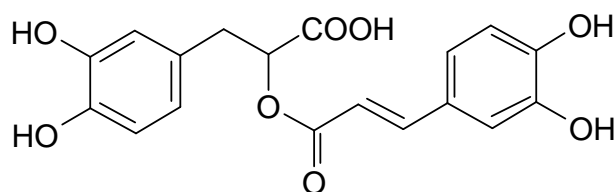
Carnosol



Epirosmanol



Rosmaridifenol



Ácido rosmarínico

Figura 5. Estructura química del ácido carnósico, carnosol, epirosmanol, rosmaridifenol y ácido rosmarínico (Shahidi y col., 1992; Cuvelier y col., 1994; Zheng y Wang, 2001)

En estudios realizados por Chang y col. (1977), se observó que los extractos de salvia europea y de romero presentan una excelente actividad antioxidante en concentraciones de 0.02% al utilizarlo en lardo; sin embargo, su poder antioxidante depende del sustrato utilizado en la evaluación (Madsen y Bertelsen, 1995; Madhavi y col., 1996) y de su concentración (Aruoma y col., 1992).

Por otra parte, Inatani y col. (1983) encontraron que el rosmanol tiene una actividad antioxidante cuatro veces mayor que el BHA y BHT, al aplicarlo en lardo.

Jadhav y col. (1996) reportan que el rosmaridifenol actúa como antioxidante en lardo fresco, evaluaron su eficiencia comparándolo con los antioxidantes sintéticos BHA y BHT, teniéndose los resultados que aparecen en la Tabla 6.

Tabla 6. Actividad antioxidante del rosmaridifenol en lardo

	Valor de peróxido (meq/kg) después de almacenamiento a 60°			
	7 días	14 días	21 días	28 días
Rosmaridifenol	1.6	2.3	3.1	4.1
BHT	1.3	1.9	2.7	3.4
BHA	2.7	6.5	12.1	17
Control	4.7	10	30	12

Chang y col. (1977) obtuvieron el extracto de romero puro con disolventes de diferente polaridad y probaron su actividad antioxidante al aplicarlos en 0.02% en lardo fresco almacenado a 60°, teniendo una excelente actividad con todos ellos, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Actividad antioxidante del extracto de romero con diferentes disolventes^a

Disolvente	Valor de peróxido (meq/kg)		
	Lardo fresco almacenado a 60°		
	0 días	7 días	11 días
Hexano	0.2	1.1	2.6
Benceno	0.2	1.2	2.2
Eter etílico	0.2	1	1.6
Cloroformo	0.2	1.4	2.9
Dicloruro de etileno	0.2	1.2	1.4
Dioxano	0.2	1.7	2
Metanol	0.2	1.6	1.8
Sin antioxidante	0.2	4.6	38.8

^a0.02% de antioxidante en lardo

Zheng y Wang (2001) observaron que hay una correlación lineal positiva entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante de extractos provenientes de diferentes hierbas. Al respecto, el extracto de romero obtenido con una solución amortiguadora de fosfato, contiene 2.19 mg de GAE (equivalentes de ácido gálico)/ g de peso fresco, presentando un menor contenido que el orégano mexicano (*Poliomintha longiflora* Gray) (17.51 mg), la menta (*Mentha x piperita* L.) (2.26 mg), la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) (2.23 mg) y superior al del tomillo (*Thymus vulgaris* L.) (2.13 mg) y a la salvia europea (*Salvia officinalis* L.) (1.34 mg), entre otros. Mientras que en un extracto obtenido con acetona, de los compuestos fenólicos presentes el ácido carnósico es el que se encuentra en mayor concentración (126.6 mg/100 g de peso fresco) y la apigenina en menor cantidad (1.1 mg/100 g).

Por otra parte, se ha demostrado 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), es decir son antioxidantes primarios. Aunado a esto, se ha observado que no sólo inhiben la formación de hidroperóxidos sino también previenen su descomposición (Frankel y Huang, 1996).

En la Figura 6 se describe el mecanismo propuesto por Masuda y col. (2001), por medio del cual el ácido carnósico lleva a cabo la inactivación de los radicales libres.

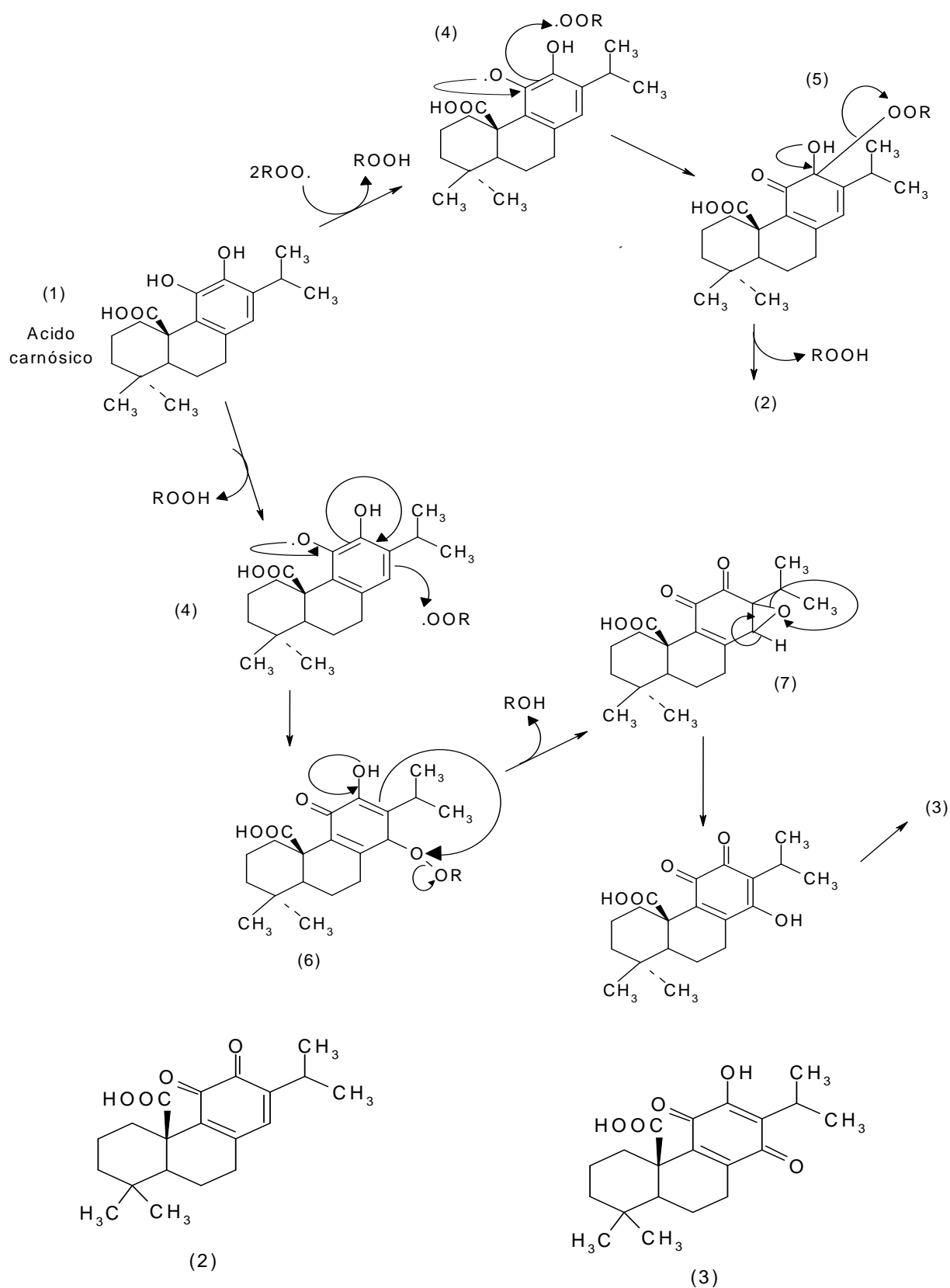


Figura 6. Mecanismo antioxidante del ácido carnósico (Masuda y col., 2001)

El ácido carnósico (**1**) tiene dos grupos hidroxilo (reactivos) en su parte aromática. El que se encuentra en la posición 11 es el más reactivo, por ello se considera que es el primero en donar su hidrógeno a un radical libre (peroxilo) para formar un radical carnosato (**4**); posteriormente éste reacciona con un segundo radical peroxilo, para tener una reacción acoplada radical-radical. Este acoplamiento ocurre en las posiciones 12 ó 14, a causa de que están en la posición orto y para, respectivamente, con relación al radical oxígeno y son las que lo estabilizan por la deslocalización de carga.

Cuando el acoplamiento se lleva a cabo en la posición 12 (orto) se forma un hemiacetal peroxilo (**5**). Este acetal es inestable y provoca la formación del compuesto **2**, por eliminación de un hidroperóxido.

Si el acoplamiento es en la posición 14 (para) se forma un peróxido (**6**), éste también es inestable a causa de un enol reactivo en la posición 13, este enol ataca a un oxígeno del peróxido para unirse a él y formar un epóxido intermediario (**7**). Este no es estable a causa de un hidrógeno migratorio que se encuentra adyacente al epóxido. Finalmente, en una isomerización de dos pasos se forma el compuesto **3**. El análisis cuantitativo muestra que la proporción de los productos **2** y **3** es de 4:1, lo cual depende de la selectividad del radical en la posición de acoplamiento (Masuda y col., 2001).

Al comparar los extractos tanto de romero como de salvia europea obtenidos con los disolventes hexano, benceno, éter etílico, cloroformo, dicloruro de etileno, dioxano o metanol con el antioxidante comercial Tenox VI[®], se observó que son tan efectivos como el comercial al utilizarse en grasa animal. Por otro lado, con los ácidos ascórbico (Chang y col., 1977) y cítrico se presenta un efecto sinérgico (Jaswir y col., 2000). Asimismo, son menos volátiles y tienen mayor estabilidad a altas temperaturas que el BHA y BHT (Chang y col., 1977; Hopia y col., 1996; Jaswir y col., 2000).

Otra característica importante del extracto de romero es que su actividad antioxidante se incrementa conforme el pH disminuye, posiblemente debido a que tanto el ácido carnósico como el carnosol son más estables y su efecto protector puede durar más tiempo durante la oxidación, o a que tienen una capacidad reductora mayor bajo estas condiciones (Frankel y col., 1996).

Al estudiar las reacciones de la mioglobina con compuestos fenólicos provenientes de plantas, Kroll y col. (2001) observaron que las quinonas (formadas por la oxidación de los compuestos antes mencionados) pueden reaccionar con residuos de lisina, cisteína, metionina y triptofano presentes en la mioglobina formando enlaces covalentes. La reactividad de los compuestos fenólicos esta en función del número y la posición de los grupos hidroxilo, en las posiciones orto y para, así como a mayor número de ellos se incrementa la reactividad. La reacción entre los residuos de los aminoácidos mencionados y una quinona da como resultado una polimerización de proteínas, provocando la formación de productos complejos (polímeros de proteínas entrecruzadas).

El mecanismo de reacción propuesto (Figura 7) es el siguiente: a partir de la quinona se produce un ión fenolato necesario para la formación de una semiquinona intermediaria; ésta reaccionará posteriormente con lisina, metionina, cisteína y/o triptofano. Después de la primera adición nucleofílica hay una oxidación del producto para formar su correspondiente quinona; entonces ocurre una segunda adición la cual permitirá la formación de polímeros de proteína entrecruzada.

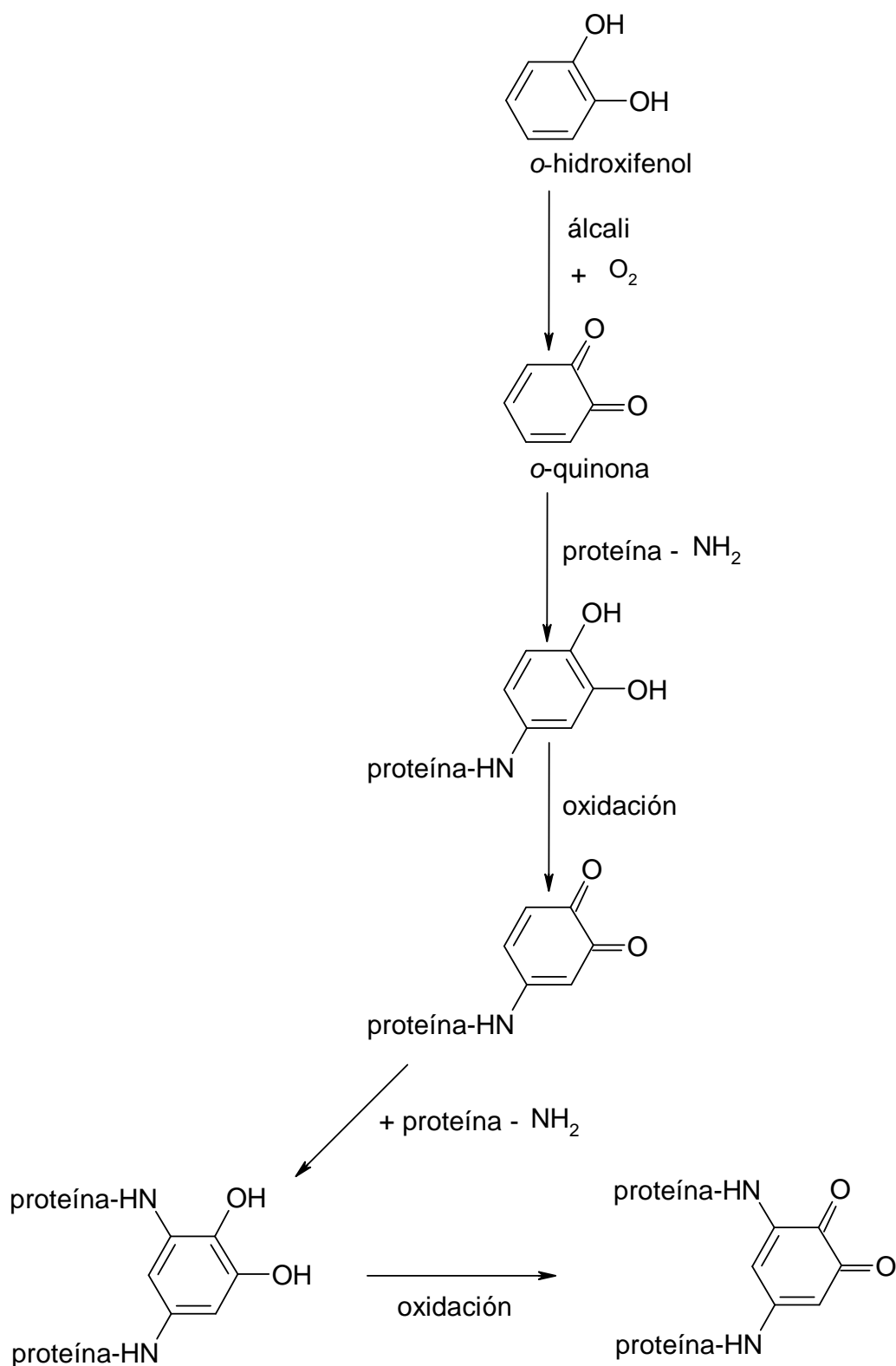


Figura 7. Mecanismo de reacción de los compuestos fenólicos con la mioglobina (Kroll y Rawel, 2001)

Generalmente los extractos de romero tienen un fuerte olor y sabor amargo, lo que restringe su uso en productos alimenticios. Sin embargo, mediante la extracción con un disolvente orgánico (hexano, benceno, etiléter, cloroformo, entre otros) seguido por una destilación con vapor al vacío del extracto suspendido en un aceite o grasa comestible, se obtienen los antioxidantes sin olor ni sabor (Chang y col., 1977).

El extracto de romero que se encuentra disponible comercialmente puede ser insoluble en agua (contiene más de 20% de ácido carnósico) y utilizarse en grasas y lípidos, especias, comidas preparadas, carne y pescado, salsas y en composiciones aromáticas y cosméticas. También está en el mercado el extracto soluble en agua y propilenglicol (contiene más de 6% de ácido rosmarínico y muy poco ácido carnósico) y puede utilizarse en jugos de frutas o bebidas suaves, caramelos, chicles y cosméticos acuosos como champúes o acondicionadores de pelo (Furesa, 2002).

4.7 Extracto de salvia (*Buddleia perfoliata* Kunth)

Se le conoce como salvia real o salvia de bolita, pertenece a la familia Buddleiaceae. Es un arbusto de un metro 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, tienen forma de cabezuelas y un olor agradable (Figura 8). Los frutos son ligeramente alargados y contienen varias semillas. Es una planta originaria de México. Se ha observado que presenta propiedades curativas, por ejemplo en el tratamiento contra el dolor de cabeza, el catarro, la tuberculosis (Argueta, 1994; Betancourt y col., 2003). Los estados en los que se utiliza 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 8. Salvia de bolita o salvia real

De acuerdo con estudios realizados por Gutiérrez y Betancourt (2003), acerca de la comercialización de los recursos herbolarios y de sus productos derivados en México, la *Salvia officinalis* L. que se consume o exporta de México, es frecuentemente adulterada con *Buddleia perfoliata* Kunth. Por otro lado, se tiene conocimiento de que de toda la planta de salvia de bolita se obtiene aceite esencial, resina, ácidos tánico, gálico y oxálico (Argueta, 1994). No se cuenta con datos acerca de la composición del extracto de *Buddleia perfoliata* Kunth, así como de su efecto antioxidante. Sin embargo, debido a la similitud que tiene con la salvia europea (*Salvia officinalis* L.), a continuación se presenta información relacionada con el extracto de esta última.

El extracto de salvia europea contiene picrosalvina y carnosol (principios amargos), rosmadial, rosmanol, epirosmanol, salvina, salvina monometil éter, metil carnosato, genkguanina, luteolina, apigenina, hispidulina, cirsimarina, cirsimaritina y salvigenina; ácidos carnósico, rosmarínico, labiático, cafeico, vainíllico, ferúlico y trazas de clorogénico, entre otros (Leung y Foster, 1996; Zheng y Wang, 2001). Se ha reportado que el ácido labiático (Leung y Foster, 1996), el ácido carnósico, el carnosol y el ácido rosmarínico son los principales compuestos que le dan esta actividad antioxidante, siguiéndole el ácido cafeico y la cirsimaritina (Zheng y Wang, 2001).

Zheng y Wang (2001) observaron una correlación lineal positiva entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante de los extractos, el de salvia europea (obtenido con una

solución amortiguadora de fosfato) contiene 1.34 mg de GAE (equivalentes de ácido gálico)/ g de peso fresco, que es superior al del toronjil (*Melissa officinalis* L.) (1.26 mg). Por otra parte, en el extracto obtenido con acetona, el ácido rosmarínico es el más abundante (117.8 mg/100 g de peso fresco).

Sin embargo, la eficacia antioxidante de la oleoresina cruda parece ser menor de lo que se publica, 3.5 veces menor que la de BHT cuando se midió la actividad antioxidante con base en la desaparición del metil linoleato en un disolvente lipofílico bajo fuertes condiciones oxidativas (110° y oxigenación intensa) (Cuvelier y col., 1994).

Chang y col. (1977), al igual que con el romero, obtuvieron extractos de salvia europea utilizando disolventes de diferente polaridad para posteriormente medir su actividad antioxidante en lardo fresco en una concentración de 0.02%, observando (Tabla 8) que después de 12 días de almacenamiento a 60° los valores menores de peróxido se tienen con el extracto de cloroformo, mientras que los mayores se tienen con el extracto de hexano.

Tabla 8. Actividad antioxidante del extracto de salvia con diferentes disolventes

Aditivos (0.02%)	Valor de peróxido (meq/kg)			
	Lardo fresco almacenado a 60°			
	0 días	4 días	8 días	12 días
Control, sin aditivo	2.25	8.02	23.09	56.41
Extracto metanólico	2.25	2.94	3.53	4.39
Ext. con cloroformo	2.25	3.43	4.06	4.38
Extracto con acetona	2.25	3.31	4.61	6.16
Ext. con éter etílico	2.25	3.16	4.24	5.23
Extracto con benceno	2.25	3.95	7.46	13.68
Extracto con hexano	2.25	7.55	21.48	61.87

4.8 Propiedades fisicoquímicas

4.8.1 Color

El color es probablemente el atributo que determina en mayor medida la aceptación de la carne por el consumidor (Guerrero y col., 2002). Se debe básicamente a la presencia de mioglobina y en menor grado a la hemoglobina. La mioglobina es una proteína conjugada, que además de la parte proteica llamada globina, contiene un grupo prostético de naturaleza no peptídica denominado hemo (Figura 9). 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. La mioglobina contiene aproximadamente 90% del hierro de la carne, lo que equivale a un 10% del hierro total del animal vivo. El átomo de hierro puede existir en forma reducida (ferrosa) u oxidada (férrica); en la forma ferrosa puede combinarse fácilmente con agua, oxígeno, óxido nítrico y bióxido de carbono (Livingston y Brown, 1981), y en la forma férrica puede unirse con el agua o el ión hidroxilo pero no con oxígeno (Shikama, 1998).

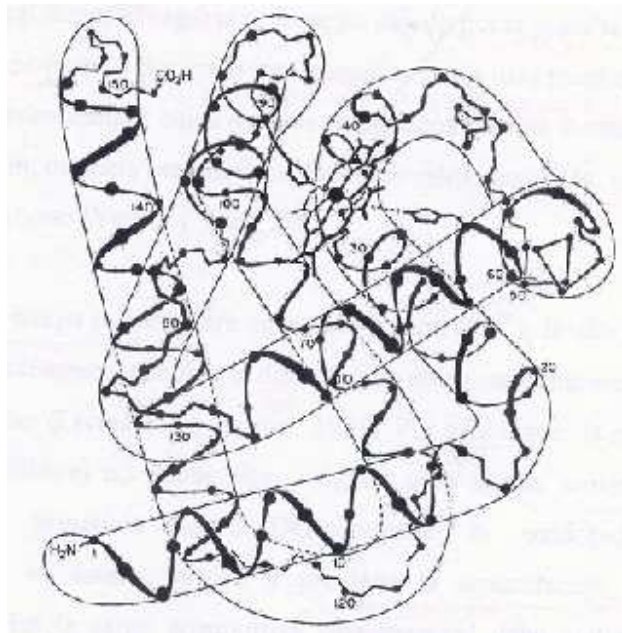


Figura 9. Estructura de la mioglobina (Colby, 1987)

Cuando la carne fresca es expuesta al aire, los gases se disuelven en los fluidos fisiológicos de la carne y el oxígeno se une a la mioglobina para formar un color rojo brillante que se conoce como oximioglobina. Un almacenamiento prolongado de la carne expuesta al aire o bajo condiciones de baja concentración de oxígeno producen un color café conocido como metamioglobina (Alarcón, 1992; Guerrero y col., 2002), en el cual el hierro del grupo hemo es convertido al estado férrico y la proteína esta menos oxigenada (Yin y Faustman, 1993). Por lo tanto el color de la carne depende en gran parte de la proporción relativa y de la distribución de los tres pigmentos musculares: mioglobina de color rojo púrpura, oximioglobina roja y metamioglobina café (Alarcón, 1992) (Figura 10).

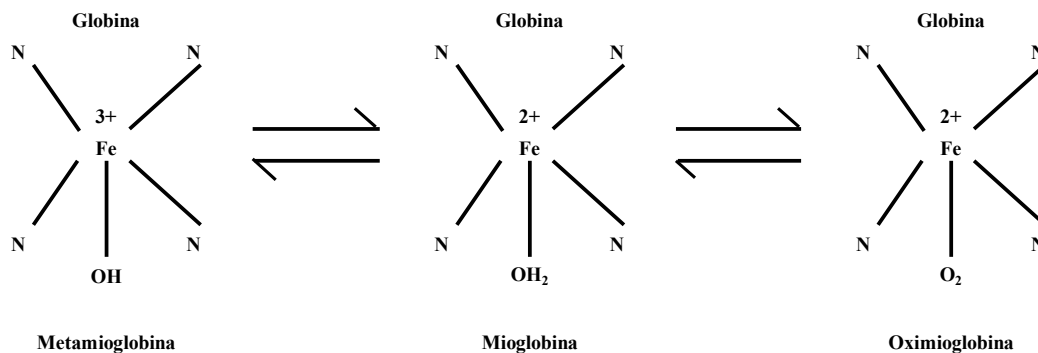


Figura 10. Diferentes estados de oxidación del hierro en el grupo hemo (Guerrero y col., 2002)

O'Grady y col. (2001) observaron que la oxidación de la oximioglobina es afectada por el nivel de oxígeno debido a que esta reacción se acelera significativamente cuando el nivel de oxidación de los lípidos es elevado atribuyendo esto a la reducción en el contenido de oxígeno disuelto, como resultado del consumo del mismo durante la oxidación.

Desde el punto de vista microbiológico, *Pseudomonas* acelera la aparición del color café debido a la formación de metamioglobina en el músculo. Esto pudiera deberse a que se segregan enzimas con la capacidad de degradar la mioglobina, o a que estas bacterias de metabolismo aerobio consumen oxígeno a una tasa tal, que desarrollan condiciones de limitación de este gas en la superficie muscular (Dainty y col., 1983).

También puede presentarse la desnaturalización de la globina y la reducción del núcleo hemo cuando la mioglobina se expone simultáneamente a sulfuro de hidrógeno y oxígeno,

formando sulfomioglobina o bien a peróxido de hidrógeno, ácido ascórbico u otros agentes reductores, en cuyo caso la colemioglobina es la especie producida, en ambos casos la coloración es verde (Alarcón, 1992).

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 muchos ángulos, creando una reflectancia difusa de varias longitudes de onda, que son función del color de la carne (Guerrero y col., 2002). Basándose en este fenómeno de la luz incidente, existen dos métodos para describir el color:

a) Con la reflectancia y transmisión espectrofotométrica se puede cuantificar la mioglobina extraíble y dar información relacionada de como el tratamiento afecta la estabilidad del pigmento. La medición del color por esta técnica involucra la manipulación matemática de los datos provenientes de longitudes de onda seleccionadas. Las curvas de reflectancia para la mioglobina, oximioglobina y metamioglobina a través de varias longitudes de onda, muestran que existen puntos en donde las tres formas presentan el mismo coeficiente de extinción. Estos puntos, referidos como longitudes de onda isobélicas, son los seleccionados para cuantificar las diferentes formas de mioglobina, un ejemplo de éstos es 525 nm (Hunt, 1980).

b) A través de una descripción física del color real de la carne, utilizando métodos colorimétricos. Un colorímetro es un instrumento que reproduce óptica y electrónicamente la sensación percibida por el ojo humano. A fin de tener una reproducción de esta percepción del color se definen varios sistemas, entre los más importantes está el sistema CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*, Comisión Internacional de la Iluminación), el Munsell y el Hunter (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, 1992; Quijano, 2003). La luminosidad y la tonalidad o tono son los mejores predictores del color; la tonalidad, que es una relación entre los colores rojo, amarillo, azul y verde, se relaciona con la estabilidad del color (Alberti y col., 2002).

El sistema CIE se basa en la suposición de que en el ojo humano hay tres mecanismos de respuesta al color (rojo, verde y azul). Cualquier color puede ser una mezcla de estos tres colores primarios. La cantidad necesaria de cada uno de ellos para obtener un color determinado se obtiene integrando cada uno de los valores del triestímulo en el intervalo de longitud de onda visible de 380 a 780 nm (Guerrero y col., 2002).

El Sistema Munsell utiliza una serie de coordenadas cilíndricas para la determinación del color las cuales funcionan de la siguiente manera:

- En el centro del cilindro se encuentra un eje en el cual el color varía del negro hacia el blanco (valor o luminosidad).
- La superficie del cilindro está formada por los colores que resultan de todas las combinaciones posibles del círculo de colores formado por azul, verde y rojo con el mayor nivel de pureza (croma o saturación) y variando de acuerdo al valor correspondiente del eje central sobre toda la superficie del cilindro (tono).
- Finalmente, el interior del cilindro va variando el croma de acuerdo a la distancia respecto al eje central del mismo.

Cada uno de los planos que contiene el eje del cilindro representa una carta de color variando en valor (luminosidad) y croma (saturación). La variación de este valor pasa de muy oscura en la parte inferior a muy clara en la superior. La croma o saturación aumenta con la distancia desde el eje a partir de cero hasta la mayor saturación posible en el límite exterior de la carta (Quijano, 2003).

En el sistema Hunter *Lab* se utilizan escalas opuestas del color, que se basan en la teoría de Hering acerca de la visión en color. Dicha teoría propone que en el ojo se comparan el color rojo con el verde y el amarillo con el azul, para definir la tonalidad percibida. Esta teoría se transforma a dos dimensiones del color: a que va de rojo (si es positiva) a verde (si es negativa) y b de amarillo (si es positiva) a azul (si es negativa). Asimismo se define una tercera coordenada: L (luminosidad), que es perpendicular a estas dos, donde 0 equivale al negro y 100 al blanco, y define un espacio (Guerrero y col., 2002; Signorini, 2002) (Figura 11). Estas coordenadas cartesianas (a y b) se pueden transformar a coordenadas polares de la siguiente forma:

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

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

De acuerdo a los valores obtenidos 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.

Instrumentalmente, las muestras se comparan con un patrón de color definiendo las coordenadas L , a y b que son las de la muestra patrón. La cercanía o lejanía de las coordenadas de la muestra problema darán como resultado la desviación del color respecto a uno ideal (Guerrero y col., 2002).

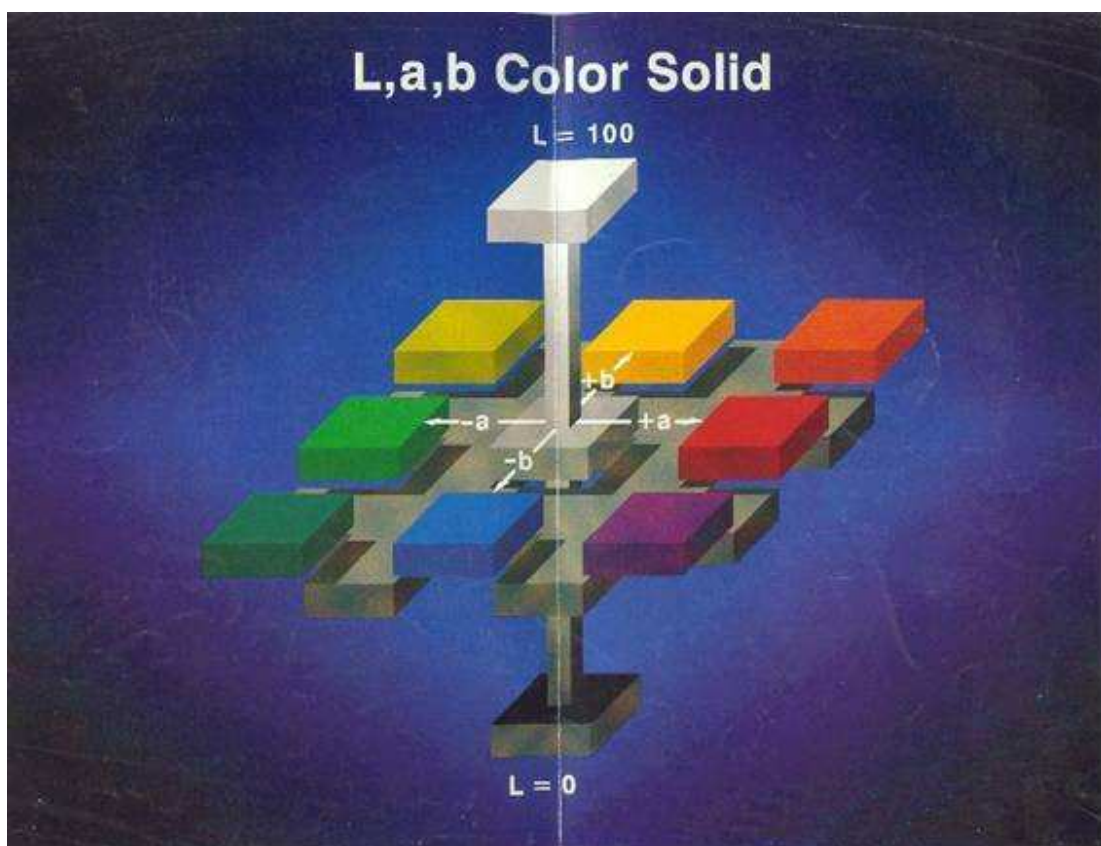


Figura 11. Sólido de color L , a , b

4.8.2 Proteínas

Las proteínas en presencia de lípidos en proceso de oxidación pueden reaccionar para formar enlaces (Cheftel y col., 1993), algunas de las reacciones que pueden darse son las

siguientes:

- Pueden actuar como antioxidantes. Sus grupos básicos pueden catalizar la condensación aldólica de los carbonilos producidos en la oxidación de los lípidos, dando lugar a la formación de pigmentos oscuros (melanoides).
- Los hidroperóxidos lipídicos pueden inducir la oxidación de proteínas ricas en azufre, dando lugar a pérdidas nutritivas significativas.
- Los productos secundarios de la oxidación de los lípidos pueden iniciar reacciones 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 provocando cambios en el sabor (Cheftel y col., 1993).
- El malonaldehído, un producto de la oxidación de los lípidos, 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.
- Las reacciones 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 es adverso en virtud de que disminuye la disponibilidad de varios aminoácidos y los valores de digestibilidad y desde el punto de vista práctico los alimentos se tornan organolépticamente inaceptables (Cheftel y col., 1993).

Existen varios métodos para la determinación de proteínas en los alimentos, algunos de ellos son:

- Biuret. Involucra un reactivo de cobre, el cual produce una coloración púrpura cuando reacciona con los enlaces peptídicos a pH alcalino (Scopes, 1994).
- Reactivo Lowry – Folin - Ciocaleau. El reactivo de Folin - Ciocaleau (ácido fosfomolibdicofosfotungstico) se reduce con los fenoles, tal como la tirosina, presentes en las proteínas y forma un complejo de molibdeno color azul (Scopes, 1994).
- Absorción de luz ultravioleta a 280 nm (aminoácidos aromáticos) ó 205-220 nm (péptidos). Las proteínas absorben a una longitud de onda de 280 nm, debido a los residuos de tirosina y triptofano que contienen. Mientras que a 205 nm la absorción de los péptidos se ve menos afectada por la composición de aminoácidos (Scopes, 1994).

- Método Kjeldahl. Es uno de los más utilizados para determinar el contenido total de proteínas a partir del nitrógeno orgánico total. Este método se basa en la digestión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de una mezcla catalítica (la cual incluye sulfato de potasio para aumentar el punto de ebullición y sulfato de cobre para acelerar la reacción) para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra primero en sulfato de amonio y finalmente en amoníaco el cual queda en solución. El digerido una vez alcalinizado se destila directamente para desprender el amoníaco el cual es atrapado en un ácido y luego se titula (Pearson, 1976; Scopes, 1994; Kirk y col., 1999). Posteriormente se calcula el nitrógeno total que se convierte en proteína utilizando el factor 6.25, que se obtiene de la relación 100/16, ya que la mayoría de las proteínas contienen aproximadamente 16% de nitrógeno en estado puro (Pearson, 1976; Badui, 1996). Otro factor utilizado es 0.014, debido a que 1 ml de ácido clorhídrico 0.1 *N* equivale a 0.014 g de nitrógeno. Los porcentajes en peso de proteína reportados para el lomo y la grasa de cerdo son de 15.9 y 6.8, respectivamente (Kirk y col., 1999).

4.8.3 Humedad

El agua se encuentra en los alimentos esencialmente en dos formas, como agua enlazada y como agua disponible o libre; el agua enlazada incluye moléculas unidas en forma química, o a través de puentes de hidrógeno a grupos iónicos o polares, mientras que el agua libre es la que no está físicamente unida a la matriz del alimento y se puede congelar o perder con facilidad por evaporación o secado. Existen varios métodos para determinar el contenido de humedad: destilación, métodos químicos e instrumentales y secado.

- Destilación. Estos métodos incluyen la destilación del alimento utilizando un disolvente no miscible con punto de ebullición mayor y gravedad específica menor que la del agua, como tolueno, heptano y xileno. El agua destilada queda debajo del disolvente condensado en un recipiente graduado que mide el volumen de la fase acuosa (Pearson, 1976; Kirk y col., 1999).

- Métodos químicos. Se basan en la reacción no estequiométrica de agua con yodo y dióxido de azufre en una solución de piridina metanol (Pearson, 1976; Kirk y col., 1999).

- Métodos instrumentales. Los aparatos utilizados se basan en la resistencia eléctrica,

la conductancia y la capacitancia del alimento, las cuales se ven afectadas por la proporción de agua que contienen (Pearson, 1976; Kirk y col., 1999).

- Secado. Este método se basa en la determinación de la pérdida de peso debida a la evaporación de agua en el punto de ebullición o temperaturas cercanas a él. Sin embargo, hay que considerar el hecho de que a veces es difícil eliminar toda la humedad presente, en virtud de que el agua puede estar unida a las proteínas, además de que a cierta temperatura el alimento es susceptible a descomponerse, por lo que pueden perderse otras materias volátiles aparte del agua (Pearson, 1976; Kirk y col., 1999).

El porcentaje en peso de agua reportado por Kirk y col. (1999) para el lomo de cerdo es de 54.3 y para la grasa de 21.1.

4.8.4 Cenizas

La ceniza de un alimento es el residuo inorgánico que queda después de quemar la materia orgánica (Kirk y col., 1999). En la carne la materia inorgánica constituye el 0.65% en peso, y está formada principalmente por potasio (0.35%), fósforo soluble total (0.2), sodio (0.05), magnesio (0.02), calcio, zinc y trazas de metales (0.03) (Lawrie, 1985). Es importante mencionar que la ceniza obtenida no tiene necesariamente la misma composición que la materia inorgánica del alimento original ya que puede haber pérdidas por volatilización o alguna interacción entre los componentes (Kirk y col., 1999).

4.8.5 Grasa

El contenido de grasa (también llamado extracto etéreo, grasa neutra o grasa cruda) que esta formado por lípidos “libres” es aquel que puede ser extraído por los disolventes menos polares, como éter etílico, mientras que los lípidos “enlazados” requieren disolventes más polares para su extracción. El contenido de lípidos libres que consiste en grasas neutras (triglicéridos) y ácidos grasos libres se determina por extracción del material seco y molido con una fracción de éter etílico en un aparato de extracción continua. Básicamente hay dos tipos de aparato de extracción:

- Tipo Bolton o Bailey-Walker. Proporciona una extracción continua en la que las

gotas condensadas del disolvente caen sobre la muestra contenida en un recipiente poroso o dedal, alrededor del cual pasan los vapores calientes del disolvente (Kirk y col., 1999).

- Tipo Soxhlet. Se realiza una extracción intermitente con un exceso de disolvente recién condensado (Kirk y col., 1999).

La eficiencia de ambos métodos depende del tratamiento previo de la muestra y de la elección del disolvente. Por otro lado, existe en el mercado el aparato Soxtec (Tecator, Bromma, Suecia), el cual es un instrumento semiautomático basado en una combinación de extracciones Bolton y Soxhlet, en el que se puede utilizar una selección de disolventes, para llevar a cabo una determinación rápida.

El contenido de grasa reportado para el lomo y la grasa de cerdo son de 29.5% en peso y 71.4%, respectivamente (Kirk y col., 1999).

4.8.6 Actividad de agua (a_a)

El término actividad de agua (a_a) define el grado de interacción del agua con los demás constituyentes del material alimentario (Guerrero y col., 2002), es decir, es una medida de la disponibilidad de agua, se calcula relacionando la presión de vapor en el equilibrio de la muestra (P) dividida entre la presión de vapor en el equilibrio del agua pura (P_o) a la misma temperatura, o sea,

$$a_a = P / P_o; \quad \text{tiene valor de cero a uno}$$

La humedad relativa en el equilibrio (%HR) se refiere a la atmósfera en torno al alimento y se relaciona con la actividad de agua mediante la siguiente ecuación:

$$\%HR = 100 \times a_a \quad (\text{Kirk y col., 1999; Guerrero y col., 2002})$$

Existen varios métodos instrumentales para la determinación de la actividad de agua, uno de ellos es la utilización de higrómetros, los cuales pueden ser de indicador de hilo de poliamida o electrónicos. En los primeros la lectura depende del cambio en la longitud de la fibra como consecuencia de la variación en la humedad relativa.

Los electrónicos son instrumentos que detectan la humedad en equilibrio sobre la muestra contenida en una pequeña cámara a una temperatura determinada. Los sensores dependen de sustancias tales como el cloruro de litio, que muestra variaciones en la conductividad al variar la humedad. La señal eléctrica que crea el sensor se amplifica

electrónicamente y la a_a o la ERH (humedad relativa en equilibrio) se presenta como una gráfica de isoterma de adsorción o en un indicador digital. Con diferentes sensores se puede medir la a_a en todo tipo de alimentos utilizando tan sólo unos cuantos g de muestra (Kirk y col., 1999).

Con relación a la velocidad de oxidación de los ácidos grasos, se ha observado que depende en gran medida de la humedad de la pasta. En alimentos desecados cuyo contenido de humedad es muy bajo ($a_a \leq 0.1$) la oxidación tiene lugar muy rápidamente. El incremento a un valor de a_a de 0.3 retarda la oxidación lipídica y frecuentemente hace que la velocidad sea mínima debido a una reducción en la actividad de los catalizadores metálicos y/o impidiendo el acceso del oxígeno al alimento (Nawar, 1993) y promueve reacciones de oscurecimiento no enzimáticas durante las cuales se forman compuestos antioxidantes. A actividad de agua intermedia (entre 0.55 y 0.85), la velocidad de oxidación se incrementa de nuevo debido al aumento en la movilidad de los catalizadores disueltos en la fase acuosa (Nawar, 1993).

4.8.7 pH

El pH de la carne está determinado por la cantidad de ácido láctico producido a partir del glucógeno durante la glucólisis anaerobia (Lawrie, 1985; Alarcón, 1992). La caída de este parámetro en el músculo se da en forma gradual desde valores aproximados a 7, que corresponde al que se presenta en el animal vivo, hasta 5.6-5.7 después de que han transcurrido de 6-8 horas del sacrificio para alcanzar transcurridas 24 horas un pH final de 5.3-5.7 (Minor-Pérez, 1998). Este pH coincide con el punto isoeléctrico de muchas proteínas, incluyendo las miofibrilares, lo que 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, 1992).

Por otro lado, el pH final de la carne también es determinante en el crecimiento microbiano, ya que la mayoría de las bacterias crecen óptimamente a un pH aproximado de 7, mientras que a valores inferiores a 4 y superiores a 9 hay crecimiento escaso (Lawrie, 1985).

Con relación a los lípidos la oxidación se incrementa conforme el pH disminuye de 7.0

(Yasosky y col., 1984; Rhee, 1992; Frankel y col., 1996). Esto se relaciona con los grupos imidazol de la histidina o amino de las proteínas los cuales juegan un papel importante en la quelación 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 reduce en su capacidad para secuestrar iones que catalizan la oxidación, como son hierro, manganeso, cobalto y cobre.

El pH de un alimento se puede medir por medio de una titulación ácido – base utilizando indicadores que cambian de color a valores de pH específicos o utilizando un potenciómetro. Este último determina la diferencia de potencial entre un electrodo de vidrio y uno estándar de calomel, que forman parte de un electrodo de combinación y se calibran con soluciones amortiguadoras comerciales de pH preciso y conocido (Kirk y col., 1999).

4.8.8 Ácidos

4.8.8.1 Ácidos grasos libres de cadena larga

Los ácidos grasos se oxidan a una velocidad ligeramente más alta cuando están en forma libre que cuando están esterificando al glicerol. Asimismo el número y posición de los dobles enlaces influye en la velocidad de oxidación, para los ácidos araquidónico, linolénico, linoleico y oleico está en una relación aproximada de 40:20:10:1 (Nawar, 1993).

La separación de una mezcla de ácidos grasos en sus componentes puede hacerse mediante la utilización de técnicas de cromatografía, como la de líquidos de alta resolución (HPLC) y la de gases (GC). En los métodos de HPLC las separaciones regularmente se llevan a cabo en columnas de fase reversa, utilizando elusión en gradiente o isocrática con metanol, acetonitrilo y agua. El orden de elusión está gobernado por la longitud de la cadena de carbono y del número de dobles ligaduras. El tiempo de retención se incrementa conforme aumenta la longitud de la cadena y disminuye el número de dobles ligaduras. Esta tendencia trae como consecuencia el que varios pares de ácidos sean difíciles de separar, por ejemplo el linolénico (18:3) y el mirístico (14:0); el palmítico (16:0) y el oleico (18:1). Una de las ventajas de este método es separar mezclas en donde los componentes experimentan alteraciones por las altas temperaturas; además, puede recolectarse cada uno

de ellos para someterse a futuros análisis (Marini, 1992).

En la cromatografía de gases se logra la separación de una mezcla por partición de sus componentes entre una fase móvil, que es un gas, y una fase estacionaria, que puede ser un líquido o un sólido. La utilización de columnas cortas y altas temperaturas permite el análisis de muchos componentes que normalmente son considerados como no volátiles. Los triglicéridos o los ácidos grasos se analizan comúnmente por éste método. Debido a que el análisis directo de los últimos es difícil a causa de su baja volatilidad, es necesario incrementarla, llevando a cabo su metilación, con un reactivo como el trifluoruro de boro en metanol, en donde el trifluoruro actúa como un catalizador (Gordon, 1990b).

La partición de los componentes, se realiza en forma diferencial para cada uno de los solutos, dependiendo de la solubilidad que éstos presenten con respecto a la fase estacionaria (Verde, 2002). Al respecto, se pueden utilizar fases estacionarias polares y no polares. En general, las fases estacionarias polares separan componentes polares y las no polares a los componentes no polares. De ellas se prefieren las polares a causa de que se tiene una mejor separación de los ésteres metilados, variando con el grado de insaturación. Los insaturados eluyen antes que los saturados en fases estacionarias no polares, mientras que en fases polares sucede lo contrario.

La forma más común de esta cromatografía es la de gas-líquido (GLC), en la cual la fase estacionaria es un líquido no volátil, y puede estar dentro de pequeñas partículas de un sólido inerte empacada dentro de una columna enrollada de vidrio o de metal. En años recientes también se utilizan columnas capilares, un ejemplo es la columna tubular abierta con paredes cubiertas (WCOT), la cual contiene la fase estacionaria en forma de una película delgada que puede estar químicamente unida a la pared interna de un capilar largo de vidrio o de acero inoxidable.

Los elementos básicos requeridos para la GC son:

a) El gas acarreador. Desde un cilindro de gas comprimido se pasa a través de un controlador de flujo de masa, comúnmente se utiliza en este sistema una velocidad de flujo de 20-60 ml/min. Un flujo más rápido puede acelerar el análisis si los componentes de la mezcla se separan bien. Flujos a velocidades menores (0.5-1.5 ml/min) se utilizan en columnas capilares de baja carga, y velocidades de flujos intermedios pueden utilizarse en columnas capilares de gran carga. El gas acarreador pasa a través de la columna, la cual se

localiza en un horno, y fluye a través del detector. La señal desde el detector es amplificada y registrada en una gráfica o en un integrador electrónico.

El nitrógeno es el gas acarreador más común para análisis en columnas empacadas. El hidrógeno es el preferido para GLC capilar, a causa de que es barato y da mejores resoluciones, como resultado de su baja viscosidad y alto coeficiente de difusión; sin embargo, debe tenerse cuidado en su manejo, en virtud de que forma mezclas explosivas con el aire. El helio es una alternativa aceptable para las columnas capilares de carga limitada, pero el nitrógeno es el más adecuado para estos sistemas; sin embargo, esto conlleva a una pérdida significativa de la resolución, debido a que no separa isómeros en los metil ésteres de ácidos grasos (Gordon, 1990b). El gas acarreador debe estar seco y libre de trazas de oxígeno, particularmente si se utiliza una columna capilar con una fase estacionaria unida, ya que éstas se deterioran rápidamente en presencia de trazas de oxígeno, además debe ser inerte, es decir, que no reaccione con las fases ni con los compuestos a separar (Gordon, 1990b; Verde, 2002).

b) Inyector. La aplicación de la muestra involucra su inyección a través del septo, ya sea directamente sobre la cabeza de la columna o dentro del espacio de cabeza, para que sea transportada por el gas acarreador dentro de la columna (Verde, 2002).

Otros métodos de aplicación incluyen la desorción térmica de volátiles en una trampa sobre un polímero poroso, lo cual es una técnica valiosa en el análisis del espacio de cabeza. Mientras que las muestras gaseosas pueden ser inyectadas con una jeringa unida a una válvula rotatoria.

Por otra parte, cuando los componentes dentro de la mezcla se encuentran en concentraciones altas, pueden dividirse en dos fracciones, para lo cual se utiliza el “split”, esto significa que una parte de la muestra va a la columna y otra se pierde por el venteo (Gordon, 1990b; Verde, 2002). Si los componentes están diluídos una vez llevada a cabo la inyección son transportados por completo a la columna, es decir se utiliza el modo “splitless” (Gordon, 1990b).

c) Horno. Es el lugar donde se encuentra la columna. Debe tener una capacidad térmica baja que permita un calentamiento y enfriamiento rápidos, puede operar isotérmicamente o con temperaturas programadas. Estas últimas se requieren si una mezcla contiene componentes con bajos tiempos de retención o bajos tiempos de retención a una

temperatura dada. El tiempo de retención (t_R) es aquel que una muestra requiere para eluir, se mide desde el momento de la inyección hasta el máximo del pico, es característico para cada muestra según el disolvente utilizado y el empaque de la columna, a una temperatura dada (Gordon, 1990b; Verde, 2002).

d) Columna. En ésta se realiza la separación de los componentes, es la parte fundamental de un sistema de cromatografía, ya que su selección y condiciones de operación definen la calidad de los resultados obtenidos. Se le da el nombre de “columnas” a los tubos que contienen la fase estacionaria.

Esta fase está formada por un soporte sólido inerte y una sustancia química adherida a las paredes de dicho soporte, se encuentra distribuida en forma uniforme. La película que queda sobre el soporte tiene un espesor del orden de micrones. El material así preparado se introduce en un tubo que puede ser de vidrio o de acero inoxidable. A través de este tubo se percola el gas transportador (fase móvil) y los componentes a separar se encuentran en estado de vapor. Los compuestos se solubilizan en forma diferencial dependiendo de su polaridad y se eluyen, en función de su presión de vapor (Verde, 2002).

Debe tener baja volatilidad a altas temperaturas, buena estabilidad térmica y baja viscosidad. Su selección depende de la estructura química de los componentes en la mezcla a separar (Gordon, 1990b; Verde, 2002). Otra característica a tomar en cuenta es su longitud, debido a que conforme ésta aumenta también lo hace el tiempo de análisis y la resolución del cromatograma, entendiéndose por resolución la medida cuantitativa del grado de separación de dos picos (a mayor separación, mayor resolución) (Verde, 2002).

e) Detector. Los detectores convierten el flujo de moléculas que pasan a través de la columna en un voltaje que puede ser monitoreado por una gráfica de registro. Existe una gran variedad de ellos, algunos ejemplos son el de conductividad térmica (responde a la concentración de vapor dentro de la cavidad del detector) (Gordon, 1990b), el de captura de electrones (es de respuesta selectiva a compuestos fuertemente electronegativos, como los derivados halogenados) y el de ionización de flama, entre otros (Verde, 2002).

El detector de ionización de flama responde a la masa del eluyente por unidad de tiempo (flujo de masa). Es el más utilizado para los ésteres metilados, en virtud de que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno, a los cuales es sensible (Gordon, 1990a).

Tiene una fuente de ionización por medio de una flama de hidrógeno. Esta flama es

capaz de ionizar la mayoría de las moléculas orgánicas, en función de su temperatura, produciéndose una nube de electrones que son atraídos hacia el electrodo colector. Esta atracción inicia una corriente eléctrica a través del electrodo colector hacia el sistema electrónico. Al ser procesada la señal por un electromedidor y un amplificador se genera una señal que se procesa en el sistema de registro (Verde, 2002), los esqueletos de los hidrocarburos pueden ser identificados por su tiempo de retención; por otro lado, cabe mencionar que el detector no responde al CO, CO₂, H₂O y H₂S.

Por último, cabe mencionar que las temperaturas del inyector, horno y detector se controlan de manera independiente (Gordon, 1990b).

4.8.8.2 Ácidos de cadena corta

La autooxidación de los ácidos láctico y acético, que son saturados, es extremadamente lenta (Nawar, 1993); sin embargo, son importantes en las pastas cárnicas debido a que el primero tiene una gran influencia en el valor del pH (Lawrie, 1985; Alarcón, 1992), el cual es una propiedad físicoquímica fundamental en la oxidación de los ácidos grasos (Yasosky y col., 1984; Rhee, 1992; Frankel y col., 1996).

Existen varios métodos para su cuantificación, entre los cuales está la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Quintero-Salazar, 2001) y la de gases (GC) (Minor-Pérez, 1998).

La técnica de HPLC es una de las más utilizadas para el análisis de ácidos. Se pueden utilizar columnas de intercambio iónico, así como de fase reversa. La detección de los mismos se efectúa por refractometría o fotometría utilizando longitudes de onda del espectro visible o ultravioleta (Macrae y col., 1993b).

También es utilizada para la determinación de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, lactosa y otros azúcares y sus derivados. Generalmente los análisis son rápidos y útiles cuando se tienen grandes cantidades de muestra que, a la vez, es una mezcla simple de compuestos (Bradbury, 1990). La mayoría de los análisis se llevan a cabo en columnas polares, utilizando una solución de acetonitrilo como fase móvil u otros disolventes tales como la acetona, acetato de etilo, agua, hidróxidos o acetatos. Algunas de las ventajas de utilizar este método son las siguientes: no es necesaria la derivatización de los azúcares y

la preparación de la muestra es simple (se realiza una extracción acuosa de la misma) (Folkes y Crane, 1988).

La cromatografía de gases se recomienda generalmente para muestras complejas de carbohidratos o para aquellas que contienen concentraciones bajas o desconocidas de ellos, en virtud de que el detector de ionización de flama es muy sensible a estos compuestos (Bradbury, 1990).

4.8.9 Compuestos químicos derivados de la oxidación de ácidos grasos (Valor TBARS)

El análisis con ácido tiobarbitúrico (TBARS-Sustancias reactivas con ácido 2-tiobarbitúrico) es uno de los más utilizados para evaluar el grado de oxidación de los lípidos (Nawar, 1993). Se basa en la reacción del malonaldehído (producto de oxidación) con el ácido 2-tiobarbitúrico, generando un complejo colorido (rojo) malonaldehído-ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) que tiene una absorbancia máxima a 530 nm. Sin embargo, el TBA puede reaccionar también con la urea, azúcares, proteínas oxidadas, ácido ascórbico y productos de encafecimiento no enzimático (Rossell, 1994; Li y col., 1999); el malonaldehído 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 otra parte, el malonaldehído no siempre se encuentra en los sistemas oxidados, en virtud de que se forma a partir de la oxidación de los ácidos grasos que contienen tres o más dobles enlaces (Nawar, 1993). Tomando en cuenta la última observación y recordando que la carne de cerdo contiene ácido linolénico (18:3) y araquidónico (20:4), cuya velocidad de oxidación es mayor a la de los mono y disaturados, esta prueba, como ya se anotó con anterioridad, se considera útil en la determinación de los estados iniciales de rancidez en lardo y alimentos que contengan carne (Rossell, 1994).

Existen dos métodos básicos para la determinación del valor TBARS (valor de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico), uno es llevar a cabo la reacción directamente en el alimento con la posterior extracción del pigmento coloreado; o por destilación del alimento y reacción del destilado con el reactivo, sin embargo ambos se

basan en la reacción, en medio ácido, del malonaldehído con el ácido tiobarbitúrico (Rossell, 1994). Los resultados se expresan como malonaldehído por referencia a una gráfica estándar que se prepara utilizando 1,1,3,3-tetra-etoxipropano, que produce el dialdehído por hidrólisis ácida (Ockerman, 1980; Kirk y col., 1999). Por otro lado, se considera que el umbral para la detección organoléptica de la rancidez es de 10 mg de malonaldehído/100 g de carne (Ockerman, 1980).

5. MATERIALES Y METODOS

La metodología empleada para determinar el efecto antioxidante de los extractos de romero y de salvia, en pastas de carne cruda de cerdo, se dividió en las siguientes etapas:

- I. Obtención de los extractos
- II. Preparación de la pasta de carne fresca de cerdo
- III. Condiciones de almacenamiento
- IV. Evaluación fisicoquímica de las pastas cárnicas
- V. Cuantificación de la oxidación de los ácidos grasos

5.1 Obtención de los extractos

5.1.1 Extracto de romero

Se obtuvieron haciendo modificaciones a la técnica reportada por Chang y col. (1977).

5.1.1.1 Extracto con cloroformo

De las ramas del romero fresco (adquiridas en el mercado de Iztapalapa, D. F., México) provenientes del estado de Morelos, 24 h después de ser cortadas, se separaron manualmente las hojas del tallo, se picaron durante 15 s en una picadora eléctrica (Moulinex, México, D. F., México), hasta obtener trozos de aproximadamente 3 mm de longitud. Se introdujeron 25 g en un matraz bola de 500 ml y, se le agregaron 100 ml de cloroformo (Baker, Xalostoc, México). La extracción se realizó bajo condiciones de reflujo, durante 2 h. Al término de este tiempo se dejó enfriar la mezcla, para pasarla a través de gasa, y lavar el residuo sólido con 100 ml de disolvente fresco. A continuación se filtró utilizando papel Whatman número 2. Posteriormente se eliminó el disolvente del filtrado

utilizando rotavapor Buchi 011 (Buchi, Flawil, Suiza), a 55°. Se pesó el residuo libre de disolvente, con el fin de calcular el rendimiento, para finalmente agregarle un volumen conocido de cloroformo y almacenarlo a 4° en un frasco ámbar, hasta su aplicación a la pasta cárnica.

En el caso de las hojas secas, el proceso de secado se llevó a cabo colocando las hojas frescas entre dos hojas de papel periódico, dejándolas durante 15 días a temperatura ambiente.

5.1.1.2 Extracto con metanol

Se obtuvo utilizando como disolvente metanol (Baker, Xalostoc, México), siguiendo la técnica descrita en el punto anterior.

5.1.2 Extracto de salvia

5.1.2.1 Extracto con cloroformo

La salvia de bolita (adquirida en el mercado de Iztapalapa, D. F., México), provenía del estado de Morelos, teniendo 24 h de ser cortada. Un ejemplar fue identificado por los Biólogos Ana Rosa López Ferrari y Adolfo Espejo Serna del Herbario Metropolitano “Dr. Ramón Riba y Nava Esparza” de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, clasificándola como *Buddleia perfoliata* Kunth. Para la obtención del extracto se siguió el mismo procedimiento que en el punto 5.1.1.1, a diferencia de que se introdujeron 25 g de salvia en el matraz bola y, se les agregaron 160 ml de cloroformo (Baker, Xalostoc, México).

5.1.2.2 Extracto con etanol

Se obtuvo según la metodología utilizada por Wang y col. (1998), con algunas modificaciones.

Las hojas frescas se picaron (Moulinex, México, D. F., México) durante 15 s, a continuación se introdujeron 25 g en un frasco ámbar y se le agregaron 250 ml de etanol (Baker, Xalostoc, México), se tapó y dejó en maceración durante 10 días a temperatura ambiente, agitándose diariamente durante, aproximadamente, 10 h en una agitadora-incubadora orbital Lab-line modelo 3525CC (Lab-line Instruments, Inc., Melrose Park, Illinois) a 75 rpm, al término de este período se procedió a filtrar primero en una manta de cielo, utilizando 150 ml de disolvente fresco para lavar y posteriormente utilizando papel Whatman núm. 2, a continuación se eliminó el disolvente en un rotavapor Buchi 011 (Buchi, Flawil, Suiza) a 65 °. Finalmente se pesó el extracto y se le agregó un volumen conocido de etanol, almacenándose en un frasco ámbar tapado a 4°, hasta su utilización (aproximadamente 24 a 48 h después).

5.2 Preparación de la pasta de carne fresca de cerdo

La pasta contiene básicamente los mismos ingredientes de una salchicha, omitiéndose las especias en virtud de que, como se mencionó al inicio de este trabajo de investigación, contienen compuestos antioxidantes que pudieran alterar los resultados.

La composición básica fue la siguiente:

Ingrediente	Porcentaje	
Carne de cerdo (músculo <i>Longissimus dorsi</i>)	59	
Lardo	14	
Agua fría	30	(del peso de la pasta formada por carne y lardo)
Cloruro de sodio	3.18	(del peso de la pasta formada por carne, lardo y agua)
Fosfato de potasio	0.45	(igual al anterior)
Emulsificante	0.1	(igual al anterior)

Se picaron por separado la carne y el lardo congelado (adquiridos en el mercado de Iztapalapa, D. F., México), en cubos de aproximadamente 1 cm, posteriormente se pesaron y homogenizaron, por separado, en una licuadora convencional (Osterizer Modelo 450-10,

Bartlesville, EUA), durante 30 s (aproximadamente) a velocidad máxima, agregando el agua poco a poco y, en el caso de la carne, también una parte de la sal. Enseguida se mezclaron ambas partes en la misma licuadora. Finalmente, se agregó el resto de los ingredientes, previamente pesados, continuándose con la homogenización hasta obtener una pasta.

Se pesaron lotes de la pasta cárnica, a cada uno de ellos se le agregaron, de manera independiente, los extractos, el peróxido de hidrógeno o la mezcla BHA/BHT, incorporándolos de manera manual, utilizando una espátula, para evitar el calentamiento de la pasta.

Se prepararon tres formulaciones, las cuales variaron en los porcentajes de pro y antioxidantes incorporados.

a) Se agregaron los extractos de romero (cloroformo) o de salvia (cloroformo) en una concentración de 0.02% p/p con relación al peso total de la pasta.

b) El contenido de peróxido de hidrógeno al 3% fue de 0.56% p/p, con base en el peso total de la pasta.

c) Tanto el extracto de romero (metanol), el de salvia (etanol), así como las mezclas romero/salvia y BHA/BHT se incorporaron en un porcentaje de 0.02 p/p relacionado con el peso de la grasa agregada a la pasta.

5.3 Envasado

Una vez que se preparó cada una de las formulaciones se llevó a cabo el envasado en forma manual, utilizando una espátula, en el cual se utilizaron envases de vidrio con las características que aparecen en la Tabla 9.

Tabla 9. Características de los envases

Temperatura de almacenamiento	Tipo de envase	Capacidad del envase (g)
30° y temperatura ambiente, con aire	Transparente, sin tapar	100
Temp. ambiente, 10 y 4° (3 y 7 días de almacenamiento)	Ambar, tapado	75
4° (24 días de almacenamiento)	Ambar, tapado	250

5.4 Condiciones de almacenamiento

5.4.1 Tiempo, temperatura y concentraciones de los extractos.

Los tiempos de almacenamiento que se estudiaron fueron 3, 7 y 24 días.

5.4.1.1 Almacenamiento por 3 días (72 horas)

En este lapso se almacenaron las pastas a temperatura ambiente con incorporación de aire, temperatura ambiente, 10 y 4°. Los tratamientos aplicados aparecen en las Tablas 10 a y b.

Tabla 10a. Tratamientos en el almacenamiento por 72 horas

Pro ó antioxidante	Temperatura de almacenamiento		
	Ambiente c/aire	Ambiente	4°
Control	✓	✓	✓
Peróxido de hidrógeno	✓	✓	✓
Extracto de romero con cloroformo	✓		✓
Extracto de salvia con cloroformo	✓	✓	✓

Como se mencionó anteriormente, en estos tratamientos la concentración de extractos fue de 0.02% p/p y de 0.56% p/p de peróxido, basándose en el peso total de la pasta (Tabla 10a). Al control no se le agregó sustancia alguna. Por otra parte, en aquellas temperaturas en las que se incorporó aire, se realizó mediante un homogenizador a velocidad máxima, durante un minuto.

Tabla 10b. Tratamientos en el almacenamiento por 72 horas

Antioxidante	Temperatura de almacenamiento		
	Ambiente c/aire	10°	4°
Control	✓	✓	✓
BHA/BHT	✓	✓	✓
Extracto de romero con metanol	✓	✓	✓
Extracto de salvia con etanol	✓	✓	✓

En este caso, al igual que el anterior, al control no se le incorporó algún antioxidante y,

tanto el BHA/BHT como los extractos, se agregaron en un porcentaje de 0.02 con base en el contenido de grasa agregada a la pasta (Tabla 10b).

A excepción de los tratamientos en donde se agregó el extracto de romero con cloroformo, en el cual no se tuvo repetición, en todos los restantes se trabajó con dos de ellas.

5.4.1.2 Almacenamiento por 7 días

En este tiempo de almacenamiento se aplicó el extracto de salvia obtenido con cloroformo y el peróxido de hidrógeno en concentraciones similares a los tratamientos de la Tabla 10a; además, se manejó un control. Las temperaturas que se estudiaron fueron 30° con incorporación de aire, temperatura ambiente y 4°, teniéndose dos repeticiones en cada tratamiento. Al igual que en el almacenamiento durante 72 horas, las determinaciones se llevaron a cabo a temperaturas elevadas, por lo que el tiempo de almacenamiento fue de 1 semana para evitar la descomposición de la pasta; por otra parte, era importante conocer el efecto de los extractos de romero y de salvia por separado, sobre las variables de estudio en este período.

5.4.1.3 Almacenamiento por 24 días

Las condiciones de almacenamiento y los tratamientos fueron similares a los descritos en la Tabla 10b, las diferencias fueron:

- únicamente se aplicó una temperatura de 4°
- el extracto de romero se obtuvo con cloroformo
- además de los tratamientos mencionados, se agregaron los extractos de romero y de salvia juntos, en una concentración de 0.01% p/p cada uno.

En todos ellos se llevaron a cabo dos repeticiones.

Las muestras se almacenaron durante 24 días debido a que se tiene interés en: 1) el efecto de los extractos solos y en combinación sobre las variables de estudio; 2) su período de inducción persiste durante todo el almacenamiento.

En la Tabla 11 aparecen los tratamientos llevados a cabo en cada experimento, los cuales se mencionaron en el punto 5.4.

Tabla 11. Tratamientos llevados a cabo en cada experimento

Experi mento	Antioxidante o proxidante	Solvente de extracción			Almac. previo a la aplicación a la pasta	Condiciones de almacenamiento de la pasta				Tiempo total de almacena miento	
		Clorofor mo	Metanol	Etanol		30° con aire	Temp. ambiente con aire	Temp. ambiente	10°		4°
1o.	Romero Peróxido de hidrógeno Control	√			21 días		√			√	72 horas
2o.	Romero seco Control	√			no		√			√	96 horas
3o.	Salvia Peróxido de hidrógeno Control	√			15 días		√	√		√	72 horas
4o.	Salvia Peróxido de hidrógeno Control	√			no	√		√		√	1 semana
5o.	Romero Salvia BHA/BHT Control		√		no		√		√	√	72 horas
6o.	Romero Salvia Romero/Salvia BHA/BHT Control	√			no					√	21 ó 24 días

5.5 Evaluación fisicoquímica de la pasta cárnica

Todos los análisis que se mencionan a continuación se realizaron al inicio y final del almacenamiento, con el objetivo de poder evaluar los cambios en la composición química de las pastas al finalizar cada período.

5.5.1 Color

La determinación se realizó por duplicado, utilizando un colorímetro Hunter Lab modelo D25-PC2 (Chroma Meter CR-200, Tokio, Japón).

Se calibró el equipo, utilizando como estándares los valores de $L=94.5$, $a=1.0$, $b=1.9$, obtenidas de un patrón. A continuación se tomó la lectura de la muestra, por duplicado, colocándola en el portamuestras, procurando no dejar espacios libres (con aire) en el recipiente, rotándola 90° entre cada lectura. Los parámetros estándar determinados fueron L , a y b .

Los valores de a y b se transformaron a coordenadas polares, para obtener los valores de cromaticidad y tonalidad mediante las ecuaciones:

$$\begin{aligned}\text{Tonalidad} &= \tan^{-1} b/a \\ \text{Cromaticidad} &= (a^2 + b^2)^{1/2}\end{aligned}$$

El valor de la luminosidad (L) se tomó igual a la lectura en el colorímetro.

5.5.2 Contenido de proteína

La determinación se llevó a cabo por duplicado, mediante una modificación al método Kjeldahl reportado por Pearson y Tauber (1984). Se pesó una muestra de 1.0 g sobre papel filtro Whatman núm. 2, transfiriéndose a un matraz Kjeldahl de digestión. Se añadieron aproximadamente 0.5 g de mezcla catalítica [formada de sulfato de potasio y sulfato de cobre (ambos de Baker, Xalostoc, México) en una proporción de 10:1], 3 perlas de vidrio y 10 ml de ácido sulfúrico concentrado (Baker, Xalostoc, México). El calentamiento del matraz en posición inclinada se inició suavemente, incrementándose gradualmente hasta alcanzar la temperatura máxima del digestor Micro-Kjeldahl Labconco modelo 60011

(Labconco, Kansas City, Missouri, EUA), una vez que la muestra cambió a color verde translúcido, se dejó digerir durante 30 min más, después de este tiempo se dejó enfriar. El tubo de salida del condensador, del aparato de destilación Micro-Kjeldahl Labconco, se sumergió en un matraz receptor que contenía 20 ml de ácido bórico (Baker, Xalostoc, México) al 4% al cual se le añadieron 10 gotas de indicador rojo de metilo [616 mg de rojo de metilo y 83 mg de verde de bromocresol (ambos de Sigma, San Luis, EUA) en 100 ml de alcohol etílico]. A continuación se añadió la muestra digerida al matraz de destilación, enjuagando el matraz de digestión con una cantidad mínima de agua, la cual se agregó nuevamente al matraz de destilación; posteriormente, se dejaron caer suavemente por la pared del matraz 20 ml de una solución de hidróxido de sodio (Baker, Xalostoc, México) al 50%. Se dejó la mezcla en ebullición hasta que, por lo menos, se obtuvieron 45 ml de destilado, el cual se tituló con ácido clorhídrico (Baker, Xalostoc, México) 0.1 N.

Se llevó a cabo la digestión y destilación de 1 g de papel filtro, para utilizar el valor del volumen gastado de ácido clorhídrico como blanco.

El contenido de proteína se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{proteína} = (\text{ml HCl gastados en la muestra} - \text{blanco}) \times 0.014007 \times 6.25 \times \text{normalidad del ácido} \times 100 / \text{peso muestra}$$

5.5.3 Contenido de humedad

La determinación de humedad se realizó por duplicado, mediante el método de secado, reportado por Kirk y col. (1999). Se colocó una cápsula de porcelana de fondo plano y unos 7 cm de diámetro en el horno de secado (Ríos Rocha, Modelo HS-41, México) a 100°, hasta peso constante, después se colocó en un desecador para que alcanzara la temperatura ambiente. Posteriormente, se obtuvo el peso de la cápsula vacía y a continuación se pesaron en ella 10 g de muestra. Inmediatamente después se introdujo nuevamente la cápsula con la muestra en el horno, y se dejó durante 24 h a 100°, al finalizar este período se sacó y colocó en el desecador. Una vez que alcanzó la temperatura ambiente se pesó la cápsula. Para obtener un peso constante, se volvió a introducir en el horno por intervalos de 0.5 h.

El porcentaje de humedad se calculó mediante la diferencia en el peso de la muestra antes y después del secado.

$$\text{Sólidos (\%)} = [\text{peso de los sólidos (g)} / \text{peso de la muestra fresca (g)}] \times 100$$

$$\text{Humedad (\%)} = 100 - \text{sólidos (\%)}$$

5.5.4 Determinación de cenizas

El contenido de cenizas se realizó por duplicado, de acuerdo al método descrito por Kirk y col. (1999).

El método consiste en calcinar la muestra proveniente de la determinación de humedad, primero en forma suave, con flama baja hasta que se carbonice y después, incinerarla en una mufla (Lindberg, México, D. F.), incrementando poco a poco la temperatura, hasta alcanzar los 550°, dejándola en estas condiciones durante 1 h.

A continuación se dejó enfriar la muestra unos min, dentro de la mufla y, enseguida se pasó a un desecador para que alcanzara la temperatura ambiente. Finalmente se pesó la cápsula con las cenizas y se calculó su contenido en la muestra, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cenizas} = [\text{peso de las cenizas (g)} / \text{peso de la muestra fresca (g)}] \times 100$$

5.5.5 Contenido de grasa

La determinación del contenido de grasa se realizó por duplicado, utilizando un equipo Soxtec HT2 (Tecator, Bromma, Suecia), mediante la metodología reportada por Pearson y Tauber (1984), con modificaciones.

Cuidadosamente se transfirió 1 g de muestra seca al dedal de extracción y se cubrió con algodón, para evitar salpicaduras; se sujetó el dedal al anillo y se colocó en el equipo (el anillo quedó sujeto magnéticamente). Se agregaron 50 ml de hexano (Baker, Xalostoc, México) al vaso receptor y se colocó sobre la manta de calentamiento, la cual se encontraba a 140°. Se introdujo el dedal en el vaso para llevar a cabo la extracción. Una vez que se inició el reflujo de hexano, se abrieron las llaves para permitir el paso del disolvente al

dedal y se dejó en ebullición durante 30 min, transcurrido este tiempo se dejó en extracción por 15 min, para finalizar en enjuagar durante otros 15 min. Al término de este tiempo se sacaron con pinzas tanto el vaso receptor como el dedal, éste último se colocó en un desecador para que disminuyera su temperatura y, a la vez, se evaporara el disolvente. Finalmente se procedió a pesar el dedal desprovisto de algodón y, se calculó el contenido de grasa utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de grasa en peso seco} = [\text{peso de la grasa} / \text{peso de la muestra seca}] \times 100$$

5.5.6 Determinación de la actividad de agua (a_w)

La determinación se hizo utilizando un medidor de actividad de agua (a_w) marca Decagon CX – 1 (Decagon, Washington, EUA), de la siguiente manera:

El medidor se calibró agregando agua desionizada en el contenedor, teniendo cuidado de agregar un volumen tal que solamente se cubriera totalmente la base (aproximadamente un tercio del volumen total); posteriormente, se colocó el botón en la posición leer. Una vez que la humedad del agua en el contenedor alcanzó el equilibrio (el punto del indicador digital deja de ser intermitente), se tomó la lectura de la actividad de agua y de la temperatura.

Posteriormente, se introdujo la muestra, al igual que en el caso del agua cubriendo toda la base del contenedor, y se tomó la lectura correspondiente.

5.5.7 Determinación de pH

El pH se determinó por duplicado, utilizando un potenciómetro digital (Conductronic, México, D. F.), previa homogenización de 10 g de la pasta cárnica con 90 ml de agua destilada en una licuadora doméstica (Osterizer Modelo 450-10, Bartelesville, EUA), a velocidad máxima durante 1 min.

5.5.8 Perfil de ácidos grasos libres de cadena larga

La determinación se realizó para los ácidos mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico y oleico, de acuerdo con el método AOAC (1990) reportado por Signorini (2002). Se introdujeron 0.5 g de pasta cárnica en un sistema de reflujo en el interior de un matraz, agregándole perlas de ebullición. A través del tubo refrigerante se adicionaron 6 ml de una solución 0.5 N de NaOH en metanol. La mezcla se sometió a ebullición durante 10 min, agregándole posteriormente 7 ml de trifluoruro de boro en metanol al 14% (Aldrich, Milwaukee, EUA), dejándolo nuevamente en ebullición durante 5 min. A continuación se le adicionaron 1.5 ml de hexano (Baker, Xalostoc, México) sometiendo la mezcla a ebullición por 1 min. Al término de este tiempo se retiró el matraz y se dejó enfriar en un baño de hielo, para posteriormente agregarle una solución saturada de NaCl y llevar la fase orgánica hasta el cuello del matraz. Con pipeta Pasteur se retiró la fase orgánica, y se almacenó en refrigeración en un tubo sellado durante un período no mayor a 6 h.

Se inyectaron 0.4 μ L de cada muestra en un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 (Varian, Walnut Creek, EUA), adaptado con un detector de ionización de flama. La separación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó en una columna DB-1 (J & W Scientific, Folsom, EUA) de 30 m de longitud, 0.315 mm de diámetro interno, 0.25 μ m de espesor de película, compuesta en un 100% por dimetilpolisiloxano. Las condiciones de análisis fueron isotérmicas con una temperatura de horno de 250° y, 300° en el inyector y el detector, flujo de gas acarreador (nitrógeno) de 1.5 ml/ min, presión constante de columna de 11.9 psi, split de 50 y un tiempo de análisis de 4 min. Las áreas bajo los picos fueron procesadas por el software Star Chromatography Workstation (versión 4.5) (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, EUA). La determinación se realizó por quintuplicado. Se trabajó con las condiciones cromatográficas enunciadas anteriormente, debido a que con ellas se tuvo una mayor resolución de los picos y reproducibilidad en las determinaciones. Los ésteres metílicos fueron identificados mediante estándares de referencia de ésteres metílicos (Sigma, San Luis, EUA) de los ácidos mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico.

A partir de los estándares de ácidos grasos se elaboró una curva patrón para cuantificar la concentración de los ácidos presentes en las muestras.

5.5.9 Cuantificación de ácidos de cadena corta

La extracción de los ácidos láctico y acético se llevó a cabo mediante la metodología reportada por Quintero-Salazar (2001). Se homogenizaron 5 g de la pasta cárnica con 20 ml de agua destilada y desionizada, en una licuadora convencional (Osterizer Modelo 450-10, Bartesville, EUA) a velocidad máxima durante 1 min. A continuación las muestras se centrifugaron (centrífuga IEC. Centra CL3R, Needhan Heights, Massachusetts, EUA) a 3200 g durante 40 min a 4°; el sobrenadante se filtró y aforó a 25 ml con agua destilada y desionizada.

La determinación se realizó inyectando 0.4 μ L de cada muestra en un cromatógrafo de gases HP 6890 (Hewlett Packard, EUA), con detector de ionización de flama, utilizando una columna capilar HP-225 con un grosor de capa interna de 0.25 μ m, 30 m de longitud y diámetro interno de 0.32 μ m. El análisis fue realizado en condiciones isotérmicas con una temperatura de horno de 50° y 200° en el inyector y detector, utilizando nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 4.5 ml/min, una presión constante de 16.7 psi, split de 50, atenuación de dos y un tiempo de análisis de 3 min. Las áreas bajo los picos fueron procesadas por el integrador HP 3395 (Hewlett Packard, EUA). La determinación se llevó a cabo por quintuplicado.

Para determinar la concentración de ambos ácidos se procedió a construir las curvas estándar, bajo las mismas condiciones que para las muestras, utilizando ácido láctico (Baker, Xalostoc, México) y ácido acético grado HPLC (Baker, Xalostoc, México), realizando las diluciones pertinentes.

5.6 Cuantificación de la oxidación de los ácidos grasos (Valor TBARS)

La cuantificación de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) se llevó a cabo 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°, durante 2 min a máxima velocidad en una licuadora doméstica (Osterizer Modelo 450-10, Bartesville, EUA); se transfirieron a un matraz de destilación, se añadieron 47.5 ml de agua destilada a 50°, 2.5 ml de ácido clorhídrico (Baker, Xalostoc, México) (1:2 v/v), dos gotas de

antiespumante (Droguería Cosmopolita, México, D. F.) (1:10 p/v) y algunas perlas de ebullición.

El matraz se calentó en una manta eléctrica y 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, San Luis, EUA) [0.2883 g/100 ml de ácido acético glacial (Baker, Xalostoc, México) al 90%] se taparon y agitaron. Un testigo fue preparado de manera similar, con 5 ml del ácido, en lugar de la muestra. Los tubos con la muestra y el testigo se colocaron en agua a ebullición, dejándose durante 35 min. Al terminar este tiempo se sacaron los tubos y se dejaron enfriar en baño de hielo durante 10 min. Finalmente, se midió la absorbancia (D) a 530 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Beckman, Fullerton, EUA). La concentración de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico se calculó utilizando la siguiente ecuación:

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

En la Tabla 12 se muestran las variables de respuesta analizadas en cada experimento de este trabajo de investigación.

Tabla 12. Variables de respuesta analizadas en cada experimento

Variables de respuesta	Experimento					
	1o.	2o.	3o.	4o.	5o.	6o.
Proteína	√		√	√	√	√
Actividad de agua	√		√	√	√	√
Humedad	√		√	√	√	√
Grasa	√		√	√	√	√
pH	√		√	√	√	√
Tonalidad	√			√	√	√
Luminosidad	√			√	√	√
Cromaticidad	√			√	√	√
TBARS	√	√	√	√	√	√
Cenizas				√	√	√
Acidos:						
Mirístico					√	√
Palmitoleico					√	√
Palmitico					√	√
Oleico					√	√
Esteárico					√	√
Láctico					√	√
Acético					√	√

5.7 Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a análisis estadístico mediante la prueba de análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Duncan, con un nivel de significancia (α) de 0.01. El paquete estadístico empleado fue SPSS versión 8.0.

5.8 Diagrama general

En la Figura 12 se muestra la secuencia experimental llevada a cabo durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

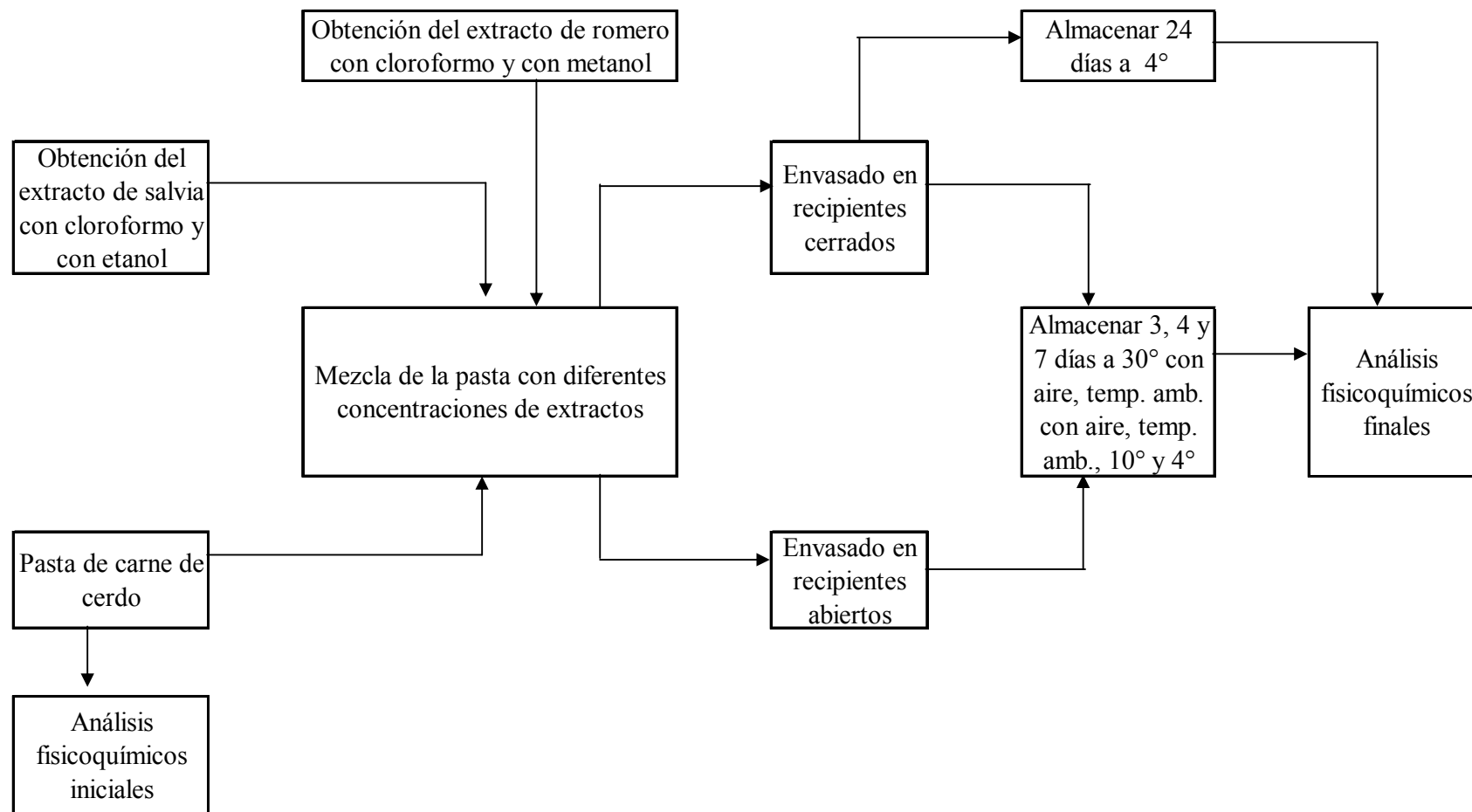


Figura 12. Diagrama general del experimento

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Obtención de los extractos

Los compuestos fenólicos participan como inactivadores de radicales libres por los grupos hidroxilo que contienen (Decker, 1998). Los extractos de romero y de salvia europea, como se mencionó en las secciones 4.6 y 4.7, tienen actividad antioxidante debido a que tanto el ácido carnósico como el carnosol tienen dos grupos hidroxilo dentro de su estructura mientras que el ácido rosmarínico presenta cuatro grupos.

6.1.1 Extracto de romero

Se utilizó cloroformo como disolvente para romero debido a: 1) el extracto de esta planta presenta actividad antioxidante al aplicarlo en lardo (Chang y col., 1977); 2) para poder comparar su efecto con el extracto de salvia obtenido también con cloroformo.

El extracto obtenido de hojas frescas se almacenó durante 21 días en frascos ámbar tapados a 4° (Tabla 12, 1° experimento), para protegerlo de la oxidación antes de aplicarlo a la pasta (Okamura y col., 1994).

Se obtuvo también el extracto con cloroformo a partir de hojas secas (Tabla 12, 2° experimento), encontrándose que también presenta actividad antioxidante. El rendimiento obtenido (44.46%) fue superior al reportado en la literatura (26%) (Chang y col., 1977), debido posiblemente a que se lavó el residuo con disolvente fresco un mayor número de veces.

Se obtuvo también el extracto, a partir de hojas frescas, utilizando como disolvente el metanol (Tabla 12, 5° experimento) basándose en los resultados de Chang y col (1977) que reportan que posee actividad antioxidante en lardo superior al obtenido con cloroformo, bajo las mismas condiciones de experimentación.

Comparando el rendimiento del extracto obtenido a partir de hojas frescas con cloroformo (10.4%) y con metanol (23.73%), se observó que el último es superior, debido posiblemente a que se obtiene una mayor concentración de sustancias polares en las hojas.

Por motivos de claridad en este trabajo de investigación cuando se menciona al extracto

de romero, se referirá al obtenido a partir de hojas frescas.

6.1.2 Extracto de salvia

Este extracto se obtuvo a partir de hojas frescas (Tabla 12, 3er. experimento) utilizando cloroformo como disolvente. Posteriormente, se almacenó durante 15 días a 4° en frasco ámbar tapado para protegerlo de la oxidación para después aplicarlo a la pasta.

El extracto de salvia se obtuvo con cloroformo debido a que de acuerdo con Chang y col. (1977) la mayor actividad antioxidante de *Salvia officinalis* L. al aplicarlo en lardo se obtiene empleando este disolvente.

En pruebas preliminares se encontró que los valores TBARS, que miden el grado de oxidación, no disminuyen a temperatura ambiente y 4°, opuestamente a lo reportado por Chang y col. (1977). Teniéndose la posibilidad de que los compuestos que le confieren esta actividad fueran sensibles a temperatura elevada, se optó por obtener el extracto bajo condiciones ambientales. Para ello se modificó la técnica reportada por Wang y col. (1998), en donde se utiliza etanol como disolvente a temperatura ambiente (Tabla 12, 5° experimento). Estos autores observaron que el ácido rosmarínico, al igual que otros compuestos presentes, actúan como inactivadores de radicales libres, de allí la elección de obtener el extracto utilizando esta técnica.

Por otra parte, el rendimiento promedio obtenido con etanol (8.1%) fue inferior al obtenido con cloroformo (16.2%), lo cual podría indicar que hubo una menor cantidad de sustancias polares en las hojas y/o, a temperaturas elevadas la extracción fue más eficiente, refiriéndonos específicamente a cantidad.

6.2 Preparación de la pasta de carne fresca de cerdo

Desde el punto de vista fisicoquímico una pasta cárnica esta compuesta por diferentes sistemas: solución de proteínas hidrosolubles, azúcares y sales; suspensión de partículas tisulares en el agua; gel de sustancias proteicas del tejido muscular; grasa libre fijada en el gel de las proteínas musculares solubles en agua y sal, en forma de emulsión. Una de las teorías propuestas para explicar la estabilidad de las pastas finas crudas menciona que ésta

se consigue mediante la captura física del agua, glóbulos de grasa, sales y otras partículas pequeñas dentro de la matriz, debido a la viscosidad del medio (Perlo, 2000).

El lardo se agregó congelado a la pasta en virtud de que el picado eleva la temperatura, lo que provoca que se funda la grasa causando discontinuidad en la matriz proteica, lo cual desestabiliza la pasta resultando en una excesiva pérdida de grasa y de agua (Gordon y Barbut, 1992).

La concentración de extractos de romero y de salvia europea que se reporta en la literatura por su efectividad antioxidante es de 0.02% p/p con base en el contenido de grasa, por ello se utilizó este porcentaje. Se aplicó en la misma proporción a la pasta, pero basándose en el peso total de la emulsión, lo que dió un porcentaje real de extracto de 0.15 con base en el contenido total de grasa.

Como la combinación BHA/BHT presenta efecto sinérgico (Shahidi y col., 1992), se tomó como base de comparación de la actividad antioxidante de los extractos estudiados.

6.3 Envasado

Como se mencionó en la sección 4.5.5, para determinar la actividad de un antioxidante es necesario determinar el período de inducción de una grasa con y sin antioxidante. Por ello se incluyó un control al que no se le agregó sustancia antioxidante alguna. Se buscó acortar el período de inducción mediante la incorporación de aire a la pasta, en virtud de que la reacción del oxígeno atmosférico con los ácidos grasos causa la oxidación de los mismos (Ockerman, 1980; Hamilton, 1994).

Para acelerar el desarrollo de la rancidez, las muestras se envasaron en recipientes abiertos y transparentes, que permitieron el contacto de la pasta con el oxígeno del aire y con la luz. Asimismo, se almacenaron las muestras a 30° dado que tanto la luz como el calor actúan como catalizadores en la formación de los primeros radicales libres (Ockerman, 1980).

En el caso contrario, para disminuir el efecto de los oxidantes antes mencionados se utilizaron frascos ámbar completamente tapados.

6.4 Evaluación fisicoquímica de la pasta cárnica

6.4.1 Almacenamiento durante 72 horas y una semana

6.4.1.1 Color

El color de la carne es uno de los parámetros de calidad que más influye en la selección del consumidor. Como se mencionó en la sección 4.8.1, el color depende de la proporción relativa de los tres pigmentos musculares (mioglobina, oximioglobina y metamioglobina). En el caso particular de la metamioglobina son varios los factores que pueden influir en su formación: pH ácido (<6.5), crecimiento y/o formación de metabolitos por la microbiota, actividad de las enzimas reductoras endógenas, y niveles de antioxidantes presentes tanto endógenos como exógenos, entre otros (Pérez-Alvarez y col., 2000).

a) Luminosidad

De acuerdo con los resultados que se muestran en las Tablas 13, 14 y 15 (Anexo) no hay diferencia significativa ($p>0.01$) en la luminosidad de las muestras almacenadas durante 72 horas y 1 semana entre los diferentes tratamientos aplicados, a excepción de las pastas en donde el extracto de romero (usando metanol como disolvente) actuó como prooxidante. Asimismo, al final del almacenamiento se presentó una disminución en la luminosidad.

Cabe mencionar que al aplicar los extractos de romero obtenidos con cloroformo y con metanol, el extracto de salvia extraído con etanol, y la mezcla BHA/BHT se obtuvieron valores inferiores a los del control, lo que indicó que hubo una menor decoloración de las muestras (de acuerdo con lo discutido en la sección 4.8.1). Esta protección hacia el color posiblemente se debió a una inhibición de *Pseudomonas sp.* las cuales aceleran la formación de metamioglobina en el músculo (Dainty y col., 1983). En cuanto a las muestras con extracto de romero los resultados coincidieron con los reportados por Yu y col. (2002) y Fernández-López y col. (2003) quienes aplicaron extractos de la misma planta en carne de pavo y de cerdo. Al respecto O'Grady y col. (2001) observaron una reducción en el contenido de oxígeno disuelto en el medio como resultado de su consumo durante la oxidación de los ácidos grasos, lo cual provocó una aceleración en la oxidación de la oximioglobina.

Con relación a las pastas que contenían peróxido de hidrógeno, los valores de luminosidad en todos los tratamientos (Tablas 13 y 15) fueron superiores a los del control, posiblemente debido a que en presencia del peróxido la oxidación de la oximioglobina procede vía una interacción directa entre ambos reactivos, sin involucrar la formación de radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Stewart, 1990; O'Grady y col., 2001).

En el caso de las pastas donde el extracto de romero (empleando metanol como disolvente) actuó como prooxidante, la luminosidad fue significativamente superior ($p > 0.0001$), coincidiendo con una mayor oxidación de los ácidos grasos (Tabla 16).

En las pastas que contenían extracto de salvia (con cloroformo como disolvente) almacenadas durante una semana a 30° y a temperatura ambiente (Tabla 15) se observó una luminosidad superior a la del control, posiblemente relacionado con el valor TBARS muy alto (Tabla 17). Finalmente aquellas muestras almacenadas a 30° con incorporación de aire presentaron valores de luminosidad inferiores (55.40) a los de tratamientos a temperatura ambiente (67.24) y a 4° (66.48), debido a la pérdida de humedad (Tabla 18) lo cual provocó la deshidratación de la superficie con la consecuente concentración del pigmento, que se apreció mas oscuro (Alarcón, 1992).

b) Cromaticidad

Con base en los resultados presentados en las Tablas 19, 20 y 21 no se observó diferencia significativa ($p > 0.01$) en los valores de cromaticidad entre los tratamientos en almacenamiento a 72 horas y 1 semana, a excepción de las muestras a 4°, cuando se utilizaron como disolventes metanol y etanol.

Las pastas almacenadas por 72 horas que contenían extracto de romero (con cloroformo y metanol), extracto de salvia (con etanol) y la mezcla BHA/BHT presentaron valores superiores al control, indicando una mayor intensidad del color. En las muestras con peróxido de hidrógeno hubo una menor cromaticidad comparada con el control. En las muestras almacenadas a 4° con extracto de romero como antioxidante se tuvieron los valores más altos de cromaticidad, mientras que cuando este extracto actuó como prooxidante fueron los más bajos, es decir hubo mayor decoloración con estos últimos. Esta tendencia pudo deberse a una mayor oxidación, reflejada en valores TBARS más altos (Tabla 16).

En las muestras almacenadas por 1 semana a 30° con incorporación de aire y a temperatura ambiente los valores de cromaticidad de las pastas con extracto de salvia (17.58 y 16.93) fueron menores al control (18.40 y 17.36, respectivamente) y a 4° fueron mayores (18.22 y 16.36 respectivamente).

Por otro lado, al final de ambos períodos de almacenamiento hubo una reducción en la cromaticidad de las muestras.

c) Tonalidad

Conforme los valores de la tonalidad aumentaron, el color cambió de rojo a café, lo que significó que la oximioglobina se oxidó a metamioglobina (Alarcón, 1992). Por lo tanto, calculando el incremento de la tonalidad durante el período de estudio y comparando estos incrementos, el tratamiento con mayor incremento fue el que presentó mayor oxidación del pigmento.

Al aplicar extracto de romero fresco obtenido con cloroformo (Figura 13 y Tabla 22), se observó que no hubo diferencia significativa en la tonalidad de las muestras añadidas con peróxido de hidrógeno como prooxidante y las añadidas con extracto de romero como antioxidante, tanto a temperatura ambiente con aire ($p > 0.997$) como a 4° ($p > 0.971$), aún cuando los incrementos obtenidos con el extracto de romero (7.15 y 2.76) fueron menores a los del control (7.89 y 3.11) tanto a temperatura ambiente con aire como a 4°, lo que significó que el extracto contenía compuestos que protegen de la oxidación al pigmento, Yin y Cheng (2003) detectaron dos compuestos con actividad antioxidante presentes en el ajo que pueden estabilizar al pigmento directamente, ya sea incidiendo en el ciclo redox del hierro o a través de la estructura de la globina, incrementando su estabilidad y protegiéndolo de la oxidación.

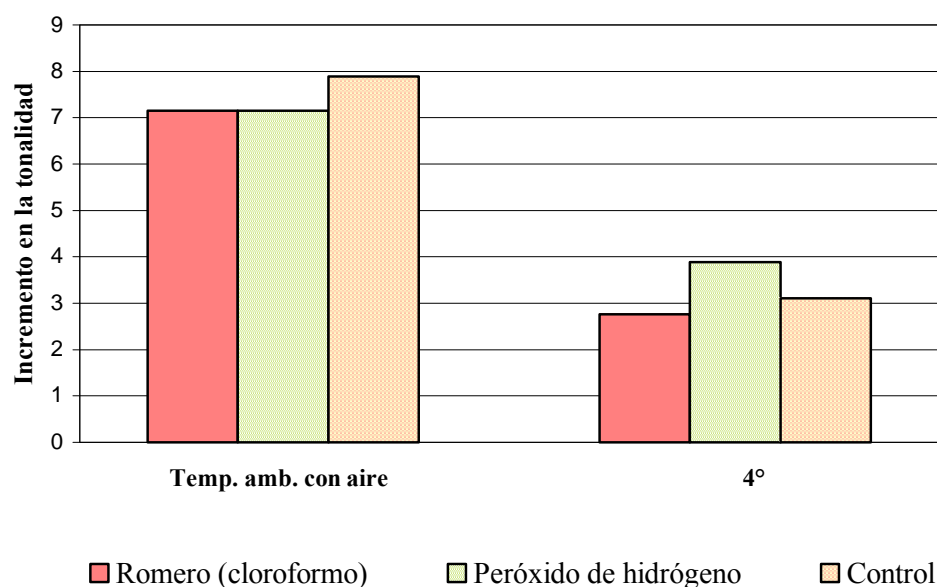


Figura 13. Incremento en la tonalidad de pastas almacenadas durante 72 horas con extracto de romero aplicado después de 21 días de almacenarlo a 4° (usando cloroformo como disolvente)

En muestras añadidas con peróxido de hidrógeno y almacenadas a temperatura ambiente con aire, el incremento en la tonalidad (7.15) fue menor al que presentó el control, es decir hubo menor oxidación del pigmento, mientras que a 4° (3.88) ocurrió lo contrario, posiblemente se debió a que, aún cuando hubo una reacción directa del peróxido con la oximioglobina, en el primer caso el pH final de la muestra fue mayor en las muestras con peróxido (6.17) que en el control (6.14), y en el segundo caso fue inferior (5.96 y 5.98 muestras con peróxido y el control, respectivamente). Yin y Faustman (1993) observaron que conforme aumenta el pH de 4 a 6.5 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.

Los incrementos en la tonalidad de muestras almacenadas a temperatura ambiente con aire fueron mayores a los que se observaron a 4°. Este hecho se puede explicar por varios mecanismos: un incremento en la temperatura aumenta la tasa de disociación del oxígeno desde su combinación reversible con la mioglobina provocando una mayor tendencia a la

autooxidación; también pudo deberse a una mayor ionización de los aminoácidos que protegen al grupo hemo (Signorini, 2002); o al aumento en la velocidad de diferentes reacciones prooxidantes (Yin y Faustman, 1993). Sin embargo, el tiempo de almacenamiento si fue significativo ($p > 0.0001$) en la oxidación del pigmento, es decir, con ninguno de los tratamientos aplicados se inhibió totalmente la formación de metamioglobina.

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 23, no hubo diferencia significativa ($p > 0.01$) entre los tratamientos a las temperaturas de almacenamiento estudiadas. Comparando la acción de los extractos de romero y de salvia (Figura 14), se observó que con el primero se presentó menor oxidación del pigmento, pudiera deberse a: 1) menor oxidación de los ácidos grasos libres (Tablas 24 y 25); 2) el ácido carnósico, el compuesto que se encuentra en mayor concentración en el romero, tiene dos grupos hidroxilo en su estructura (Figura 5) y el ácido rosmarínico, el de mayor concentración en la salvia europea (en similitud con la salvia de bolita), cuenta con cuatro grupos (Figura 5). De acuerdo con estudios reportados por Kroll y Rawel (2001) estos ácidos al oxidarse forman quinonas, las cuales reaccionan con la 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.

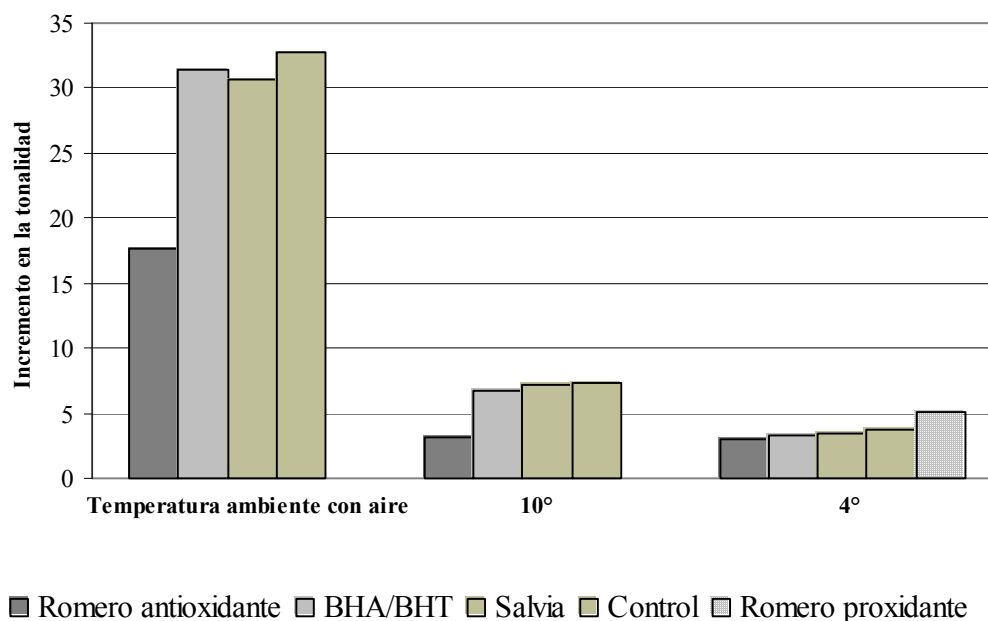


Figura 14. Incremento en la tonalidad de pastas almacenadas durante 72 horas con extracto de romero antioxidante (usando metanol como disolvente, aplicado después de almacenarlo 18 horas a 4°), de salvia (en etanol) y de romero prooxidante (usando metanol como disolvente, aplicado después de almacenarlo 2 días a 4°)

En el almacenamiento a 4°, las muestras donde el extracto de romero actuó como prooxidante se presentaron las mayores diferencias en la tonalidad debido a una mayor oxidación reflejada en valor TBARS más altos (Tabla 16).

En concordancia con los resultados reportados por Signorini (2002) a mayor tiempo de almacenamiento, mayor la oxidación de la oximioglobina.

La oxidación del pigmento en pastas almacenadas 1 semana no fue significativamente diferente ($p > 0.01$) (Tabla 26) entre los tratamientos. Sin embargo, cuando se aplicó el extracto de salvia a las pastas almacenadas a 30° con aire y temperatura ambiente, los incrementos fueron superiores comparados con el resto de los tratamientos (Figura 15) en correlación a mayores valores TBARS (Tabla 17). El peróxido de hidrógeno provocó una mayor oxidación que en las muestras control almacenadas a las temperaturas de estudio, posiblemente debido a la reacción directa del peróxido con la oximioglobina. En el almacenamiento a 30° con incorporación de aire se observó un menor incremento en la tonalidad con respecto al obtenido a temperatura ambiente, este comportamiento pudiera

deberse a que a 30° la actividad de agua y la humedad disminuyeron significativamente ($p < 0.0001$) (Tablas 18 y 27), lo que pudiera reducir la movilidad de los catalizadores disueltos en la fase acuosa (Nawar, 1993).

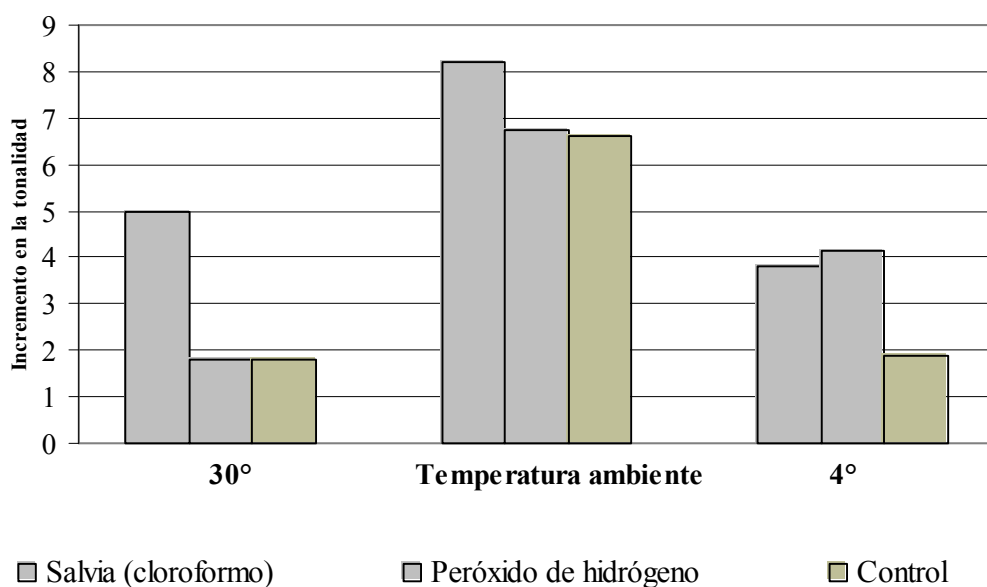


Figura 15. Incremento en la tonalidad de pastas almacenadas durante 1 semana con extracto de salvia (usando cloroformo como disolvente)

6.4.1.2 Proteína

En las proteínas de alimentos almacenados en presencia de lípidos en proceso de oxidación pueden aparecer enlaces cruzados covalentes inter o intramoleculares. Los radicales libres, formados principalmente a partir de los carbonos α de los restos de aminoácidos, tienden a reaccionar unos con otros para dar lugar a la polimerización de las cadenas polipeptídicas (Cheftel y col., 1993).

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 28, después de 72 horas de almacenamiento, el contenido de proteína no presentó cambio significativo en los tratamientos a las temperaturas estudiadas ($p > 0.01$). Sin embargo, al final de este lapso la concentración disminuyó en todos ellos, esto pudo deberse a que, como se mencionó en la sección de proteína 4.8.2, las proteínas pueden reaccionar con los lípidos en proceso de oxidación; por otra parte, puede presentarse la formación de aminas biogénicas causada por

los microorganismos presentes, a partir de los aminoácidos contenidos en la pasta (Quintero-Salazar, 2001; Signorini, 2002). Tanto la biomasa como las aminos biogénicas se cuantifican como nitrógeno total. Sin embargo, hay que hacer una cuantificación diferencial para saber si es proteína, aminos biogénicas o aminoácidos.

Durante las primeras 72 horas de almacenamiento se presentó una menor concentración media de proteína a 4° comparada con la obtenida a temperatura ambiente, con un cambio significativo en refrigeración ($p > 0.0001$) (Tabla 29), posiblemente debido a que las bajas temperaturas pueden provocar desnaturalización parcial de algunas proteínas (Cheftel y col., 1993), lo cual facilita el desarrollo de microorganismos (Greer, 1988), dentro de los cuales se pudieran encontrar aquellos formadores de aminos biogénicas (Quintero-Salazar, 2001; Signorini, 2002).

En el almacenamiento a una semana (Tabla 30) el control presentó un porcentaje medio de proteína significativamente superior ($p > 0.002$) al que se presentó en las muestras añadidas con el extracto de salvia y con el peróxido de hidrógeno (13.253, 12.013 y 11.993%, respectivamente), esto posiblemente se debió a que el pH del primero fue inferior, lo cual provocó una inhibición de microorganismos productores de aminos biogénicas. En el almacenamiento a 30° hubo un incremento significativo ($p > 0.0001$) en la concentración media de proteína, debido posiblemente a la disminución en la humedad de las muestras (Tabla 18), lo que tuvo como consecuencia la concentración de los componentes (Lawrie, 1985). Al término de una semana, hubo un incremento significativo (13.186%) ($p > 0.0001$) con relación al inicio del almacenamiento (11.654%), este comportamiento posiblemente se debió a la alta desviación estándar que se obtuvo (4.61%).

6.4.1.3 Humedad

La concentración proteica, el pH, la temperatura, el tiempo, la fuerza iónica y la presencia de otros componentes afectan a las fuerzas que toman parte en las interacciones proteína-proteína y proteína-agua. Las interacciones proteína-proteína son máximas al punto isoeléctrico, al cual la proteína asociada y compactada exhibe la hidratación mínima (Cheftel y col., 1993) en virtud de que el agua libre no está ligada a las proteínas sino inmobilizada por la configuración física de las mismas (Alarcón, 1992).

De acuerdo con la Tabla 31 el cambio en el contenido medio de humedad en muestras almacenadas 72 horas no fue significativo para ninguno de los tratamientos ($p > 0.01$). Sin embargo, se pudo observar que para los tres tipos de antioxidante o prooxidante, en las muestras almacenadas a temperatura ambiente con incorporación de aire, la humedad al término del almacenamiento es menor comparada con el resto de las temperaturas empleadas; es posible que bajo estas condiciones pudiera haberse generado cierto grado de desnaturalización en las proteínas, por lo cual se reduce el área superficial y el número de grupos amino polares disponibles para fijar agua (Brewer y Harbers, 1991; Cheftel y col., 1993; Signorini, 2002).

Se observó una mayor pérdida promedio de humedad a 4° (Tablas 18 y 31) comparado con almacenamiento a temperatura ambiente. Asimismo, se observó una reducción significativa de humedad en refrigeración (65.606%) (Tabla 32) ($p > 0.0001$) comparada con la obtenida a 10° (66.954%), este comportamiento pudiera ser resultado de la probable desnaturalización de las proteínas a temperatura baja (Cheftel y col., 1993) con el consiguiente descenso de la capacidad de retención de agua (Hultin, 1993).

Con relación a las muestras almacenadas durante una semana (Tabla 18) en el almacenamiento a 30° hubo una pérdida significativa de humedad ($p > 0.003$), posiblemente debido a que a esta temperatura las cadenas de polipéptidos en las proteínas del músculo se despliegan y forman nuevas uniones de hidrógeno, con la consecuente disminución en el grado de hidratación (Lawrie, 1985). Por otra parte, el pH promedio de estas muestras (5.55) fue muy próximo al punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares (5.3-5.5), por consiguiente la carga de las proteínas tiende a ser cero, no pudiendo retener agua mediante enlaces electrostáticos (Alarcón, 1992; Cheftel y col., 1993; Minor-Pérez, 1998).

6.4.1.4 Cenizas

La concentración de cenizas se debe al contenido de minerales. Su concentración en el músculo es relativamente constante (Pearson y Tauber, 1984).

Aún cuando se ha reportado que las hojas secas del romero contienen cenizas (6.5 g/100 g) (Duke, 1985), posiblemente en el extracto se encontraron en concentraciones bajas, de tal manera que no influyeron en el contenido medio de cenizas en las pastas, en virtud de

que en el almacenamiento durante 72 horas no se presentó diferencia entre los distintos tratamientos (Tabla 33). Sin embargo, de acuerdo con la Tabla 34, después de 1 semana de almacenamiento se presenta una disminución ($p > 0.001$) significativa, posiblemente debido a pérdidas por volatilización durante la incineración (Kirk y col., 1999).

6.4.1.5 Grasa

De los nutrimentos de la carne, la grasa es la que está sometida a fluctuaciones más amplias. La carne que posee abundante grasa suministra gran cantidad de energía, pero contiene menos vitaminas, minerales (Niinivaara, 1973) y agua (Pearson y Tauber, 1984) que la carne magra. La grasa está formada por ácidos grasos y vitaminas liposolubles, entre otros (Niinivaara, 1973).

El contenido medio de grasa (Tablas 35, 36 y 37) disminuyó significativamente al término del período de almacenamiento ($p > 0.01$) (72 horas y 1 semana), posiblemente debido a la oxidación de los ácidos grasos libres (Nawar, 1993; Ranken, 1994). Esta tendencia concuerda con lo reportado por Brewer y Harbers (1991) en carne de cerdo fresca molida.

En el almacenamiento durante 72 horas (Tablas 35 y 36), a 4° se presentaron menores valores promedio comparados con el almacenamiento a otras temperaturas, posiblemente se debió a que las reacciones de lipólisis son más lentas a temperaturas bajas (Hultin, 1993). Sin embargo, después de 1 semana de almacenamiento (Tabla 37), a 4° se tuvo un media superior (52.056%) a la obtenida a temperatura ambiente (50.979%), debido a que en esta última las pastas tuvieron un pH significativamente inferior (5.23) ($p > 0.0001$) al de las pastas almacenadas en refrigeración (5.64) el cual provocó la inhibición de las enzimas lipolíticas.

Cuando las muestras se almacenaron de 30° (Tabla 37) el contenido de grasa disminuyó significativamente ($p > 0.0001$), con relación a las muestras almacenadas a temperatura ambiente y 4°, siendo esto la causa probable de un incremento igualmente significativo en la oxidación de los ácidos grasos (Tabla 17).

6.4.1.6 Actividad de agua (a_w)

Los tejidos animales y vegetales contienen agua en diferentes concentraciones, distribuida de una manera muy compleja y heterogénea. El agua no sólo contribuye a las propiedades de textura de un alimento, también sus interacciones con los diferentes componentes determinan el tipo de reacciones químicas que pueden ocurrir en éste (Guerrero y col., 2002).

Al igual que con el contenido de humedad (Tabla 31) no hubo diferencia significativa en la actividad de agua entre los diferentes tratamientos ($p>0.1$) (Tabla 38), esta diferencia fue mayor cuando se consideró el tiempo en la segunda repetición del extracto de salvia, en donde se apreció una disminución significativa ($p>0.0001$) de 0.968 a las cero horas, a 0.957 a las 72 horas. Este comportamiento pudiera deberse a cierto grado de desnaturalización en las proteínas. Por otro lado, este resultado no concordó con el que se reporta en la Tabla 31 para el mismo período de estudio, posiblemente se deba a la alta desviación estándar (2.504) que presenta esta última.

Asimismo, en concordancia con el contenido de humedad se tuvo una actividad de agua menor a temperatura ambiente con incorporación de aire que en el resto de los tratamientos (Tabla 38), lo mismo ocurrió en muestras a 4° comparando con temperatura ambiente y a 10° (Tablas 27, 38 y 39), mientras que a 30° se presentó una disminución significativa ($p>0.0001$) de la misma.

Con relación a la actividad de agua de las pastas almacenadas durante una semana, se observó una cantidad significativamente mayor ($p>0.0001$) en aquellas que contenían peróxido de hidrógeno (0.937), siguiéndole las de extracto de salvia (0.927) y finalmente el control (0.920). Este comportamiento posiblemente se debió a que hubo menos oxidación (valores TBARS menores) en las muestras añadidas con peróxido de hidrógeno (1.574), siguiendo las muestras con extracto de salvia (2.775) y finalmente el control (3.088). Esto se pudo deber a que el malonaldehído reaccionó con los grupos amino libres de las cadenas polipeptídicas, modificando la capacidad de retención de agua de las proteínas (Cheftel y col., 1993).

6.4.1.7 pH

El pH tiene una influencia importante en la textura de la carne, la capacidad de retención de agua, la resistencia al desarrollo microbiano y en el color. Si el pH desciende a valores bajos (alrededor de 5.5) mientras la temperatura de la canal es todavía elevada (cerca de 30°), se produce una desnaturalización de las proteínas contráctiles y/o sarcoplásmicas, lo cual disminuye la capacidad de éstas para fijar agua, dando como resultado el músculo pálido, suave y exudativo (PSE). Cuando el pH final de la carne es muy alto (cerca de 6.0-6.5) tiene una excelente capacidad de retención de agua, pero poca resistencia al desarrollo microbiano, en este caso el músculo es oscuro, firme y seco (DFD) (Hultin, 1993).

En las muestras de pastas donde se aplicó el extracto de romero con cloroformo (Tabla 40) la diferencia en el pH medio no fue significativa ($p > 0.427$); sin embargo en las muestras almacenadas a temperatura ambiente con aereación el pH fue más alto (6.06, 6.175 y 6.140) al de las muestras almacenadas a 4° (5.925, 5.965 y 5.980) tanto en las muestras con extracto de romero como en las añadidas con peróxido de hidrógeno y el control. Este comportamiento se debió a que las primeras tuvieron mayor oxidación (TBARS más altos) que a temperatura de refrigeración (Tabla 41). Durante la oxidación de los ácidos grasos se forman compuestos como aldehídos y cetonas, entre otros (Nawar, 1993), que pudieron incrementar el pH. Por otro lado, se observó una disminución en el pH del inicio (6.06) y del final (6.02) del almacenamiento, posiblemente debido a que a pesar de que en ese momento se formaron los productos de oxidación de los ácidos grasos libres, también se incrementaron las concentraciones de ácidos de cadena corta como el acético y el fórmico (Rose, 1969; Elferink y col., 2001).

El pH de las muestras con la segunda repetición del extracto de salvia (Tabla 40) no fue significativamente diferente para las tres temperaturas de almacenamiento (ambiente con aire, ambiente y 4°) ($p > 0.642$), además de no ser afectado por el tiempo ($p > 0.07$).

El pH de las pastas con extracto de romero y salvia obtenidos con metanol y etanol, respectivamente, y almacenadas por 72 horas (Figuras 16, 17 y 18 y Tabla 42), disminuyeron significativamente ($p > 0.0001$), en todos los tratamientos estudiados, posiblemente debido al incremento en la concentración del ácido acético en las muestras (Tabla 43), también reportado por Minor-Pérez (1998) en carne de cerdo fresca empacada

al vacío. Por otra parte, no hubo diferencia significativa ($p > 0.01$) entre los pH finales de muestras tratadas con los diferentes antioxidantes, dentro de la misma temperatura, lo que pudiera significar que en ese lapso, no hubo cambios en la producción del ácido acético, en virtud de que sus concentraciones no son significativamente diferentes. Asimismo, es importante destacar que las muestras almacenadas a 10° tuvieron un pH inicial menor (5.444) al presentado tanto en muestras almacenadas a temperatura ambiente con aire (5.615) como las almacenadas a 4° (6.122), posiblemente debido a que la concentración media de los ácidos láctico y acético fue mayor en muestras a 10° , siguiendo en orden descendente a temperatura ambiente y finalmente a 4° (Tablas 43 y 44).

Comparando la variación en pH de las pastas almacenadas a 4° , cuando el extracto de romero actúa como anti y prooxidante (Tablas 42 y 45), se pudo observar que, en el primer caso hubo una disminución significativa, mientras que cuando actuó como prooxidante hubo un incremento también significativo ($p > 0.0001$), debido a que al oxidarse los ácidos grasos se forman productos que pudieran provocar el incremento en el pH (Tablas 16 y 24).

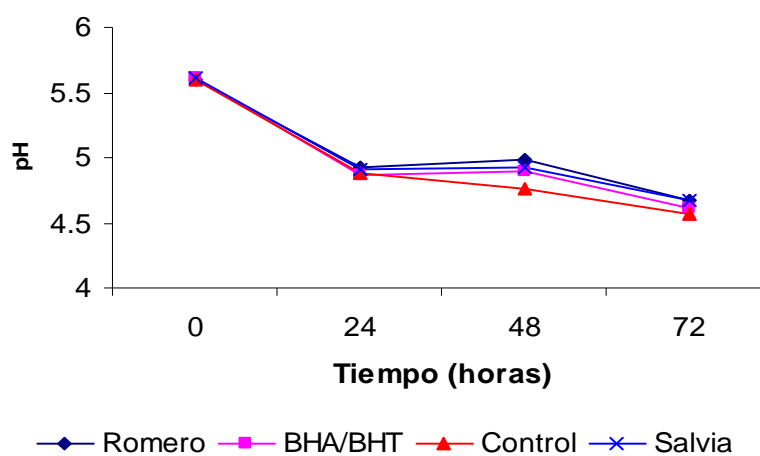


Figura 16. pH en pastas almacenadas durante 72 horas a temperatura ambiente con aire, con extracto de romero (en metanol) y de salvia (en etanol)

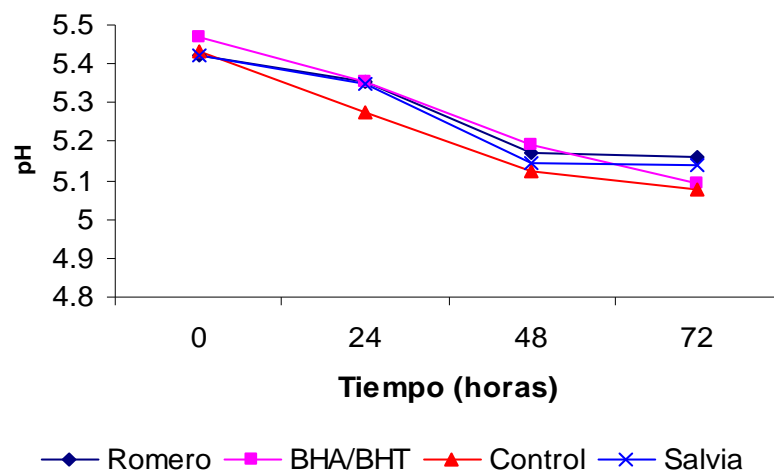


Figura 17. pH en pastas almacenadas durante 72 horas a 10°, con extracto de romero (en metanol) y de salvia (en etanol)

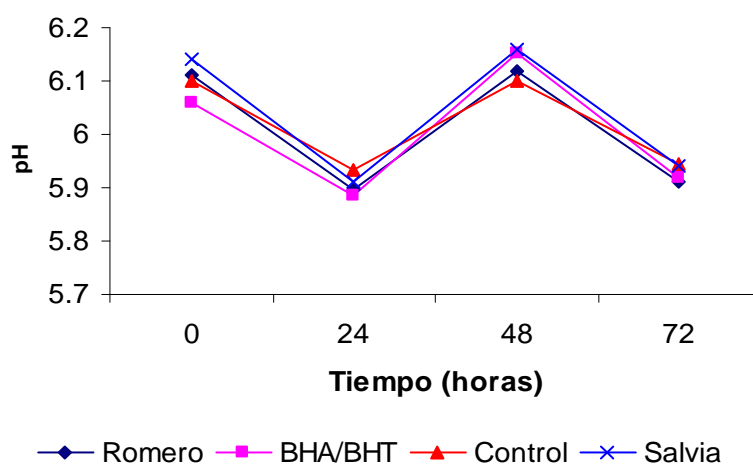


Figura 18. pH en pastas almacenadas durante 72 horas a 4°, con extracto de romero (en metanol) y de salvia (en etanol)

En las muestras almacenadas durante una semana, las que se mantuvieron a temperatura ambiente (Tabla 46) presentaron valores significativamente menores ($p > 0.0001$) de pH, posiblemente debido a que bajo estas condiciones se favoreció el crecimiento de microorganismos productores de ácido acético (Rose, 1969; Elferink y col., 2001). En las muestras almacenadas a 30° con extracto de salvia, así como en las muestras control, el pH fue mayor (5.342 y 5.380, respectivamente) al de muestras a temperatura ambiente (5.242 y 5.225) e inferior al de muestras en refrigeración (5.697 y 5.672), debido a que aún cuando

la temperatura es superior al resto de los tratamientos, hubo cierta inhibición en el desarrollo de las bacterias causado por la baja actividad de agua de las muestras (Tabla 27) (Lawrie, 1985). En el caso de las pastas que contenían peróxido de hidrógeno almacenadas a 30°, se observó el pH más alto (5.932) de los tres tratamientos y a 4° el más bajo (5.577), posiblemente se debió a que provocó la inhibición de microorganismos formadores de ácidos de cadena corta y de aquellos productores de aminas biogénicas (Russell, 1991; Minor-Pérez, 1998; Quintero-Salazar, 2001; Signorini, 2002).

6.4.1.8 Concentración de ácidos grasos libres de cadena larga

En la carne de cerdo y en el lardo, el ácido oleico es el que se encuentra en mayor concentración, siguiéndole en orden decreciente la de ácidos palmítico, esteárico, linoleico, palmitoleico y mirístico, principalmente (Rhee, 1992). La formación de estos ácidos grasos libres es el resultado de la actividad lipolítica endógena o exógena sobre los fosfolípidos y triglicéridos. Con relación a la actividad exógena, se sabe que las bacterias del género *Pseudomonas*, bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* producen lipasas, las cuales actúan en la carne fresca (Signorini, 2002).

a) Romero:

Las Tablas 47 a la 51, así como las Figuras 39 a la 43 muestran las áreas y curvas patrón para ácidos mirístico, palmitoleico, palmítico, oleico y esteárico, respectivamente; la Figura 44 muestra el cromatograma de ácidos grasos libres de cadena larga estudiados.

Como se muestra en la Figura 19, en el almacenamiento a temperatura ambiente con incorporación de aire la concentración de los cinco ácidos grasos libres (mirístico, palmitoleico, palmítico, oleico y esteárico) presenta una tendencia similar. La concentración de los ácidos fue superior en el control, aunque estadísticamente no fue significativa ($p > 0.0001$) con respecto a los otros tratamientos (Tablas 52 a la 56). A las 24 horas de almacenamiento se presentó un incremento en las concentraciones de estos ácidos en las pastas con extracto de romero y BHA/BHT, en este último el aumento fue significativo, y posteriormente disminuyó. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Signorini (2002) en carne de cerdo almacenada a 20°, atribuyendo el descenso en la concentración a un consumo por parte de la flora microbiana o a procesos de autooxidación

con la consecuente producción de aldehídos y cetonas. Con relación al control, el mismo incremento ocurrió a las 72 horas, comportamiento que está de acuerdo con los resultados presentados por Minor-Pérez (1998) en carne de cerdo fermentada almacenada a 19°, debiéndose a la flora con actividad lipolítica presente en las muestras.

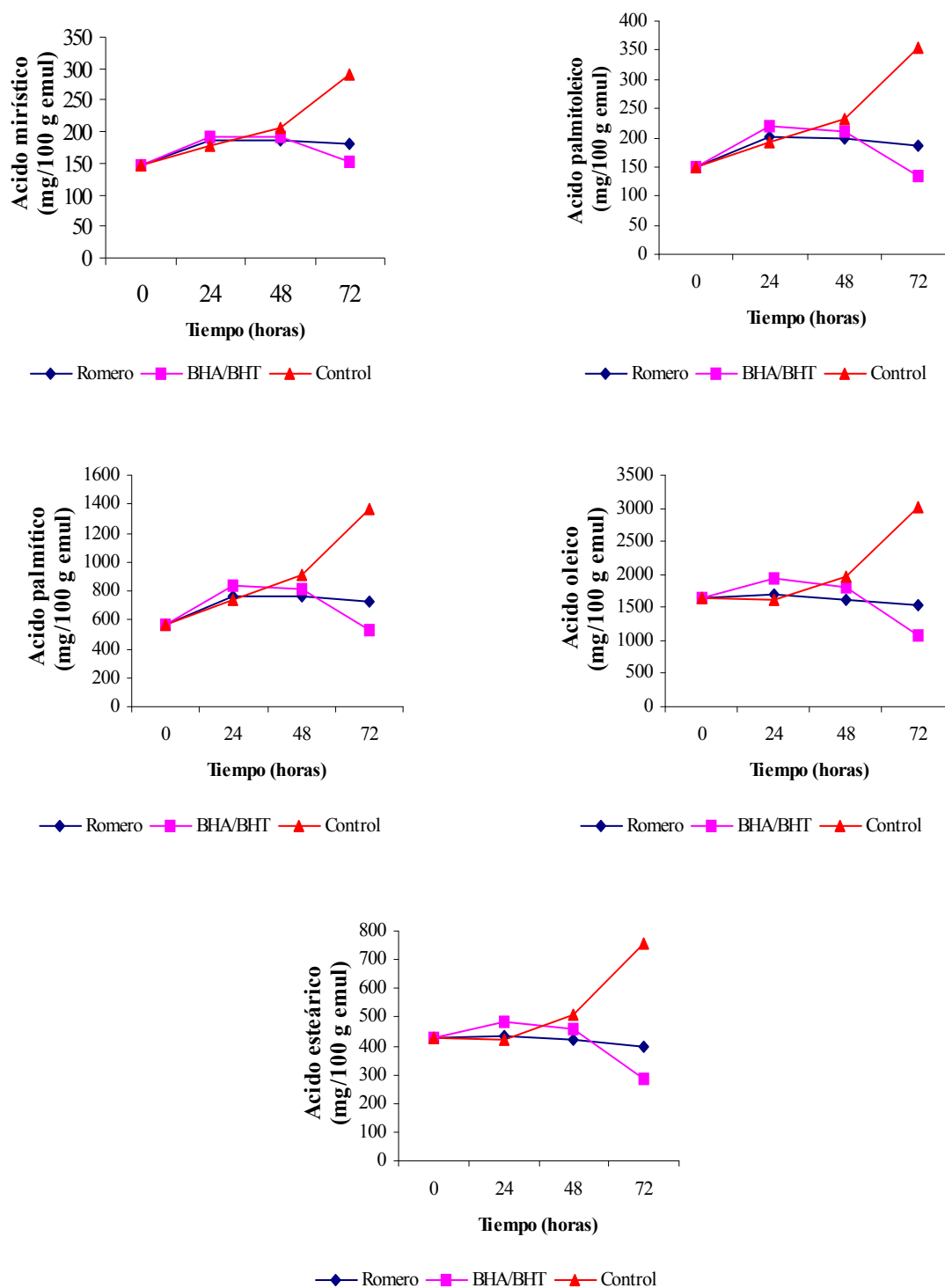


Figura 19. Concentración de ácidos grasos libres en pastas almacenadas durante 72 horas a temperatura ambiente con incorporación de aire (romero en metanol)

En el almacenamiento a 10°, al igual que a temperatura ambiente en aire, se presentó un incremento en las concentraciones de los ácidos grasos libres, para descender significativamente al final del mismo (Figura 20 y Tablas 52 a la 56). En el caso de los ácidos mirístico y palmitoleico, las concentraciones fueron no detectables durante las primeras 24 horas; esto pudo deberse a la baja actividad lipolítica en las muestras en virtud de que, al comparar las cantidades iniciales de los otros ácidos con las obtenidas a temperatura ambiente, se observó que fueron inferiores. Por otro lado, de los ácidos grasos libres cuantificados, los ácidos mirístico y palmitoleico son los que se encuentran en menor concentración en la carne (Tabla 2).

La concentración de ácidos grasos libres obtenida en muestras con extracto de romero fue mayor a la que presentó el resto de los tratamientos, aunque no sin diferencia significativa ($p > 0.01$). Este comportamiento pudiera deberse a que el extracto contiene enzimas que se activaron bajo las condiciones de almacenamiento estudiadas o a que el extracto contiene compuestos que activan a las enzimas presentes naturalmente en la pasta.

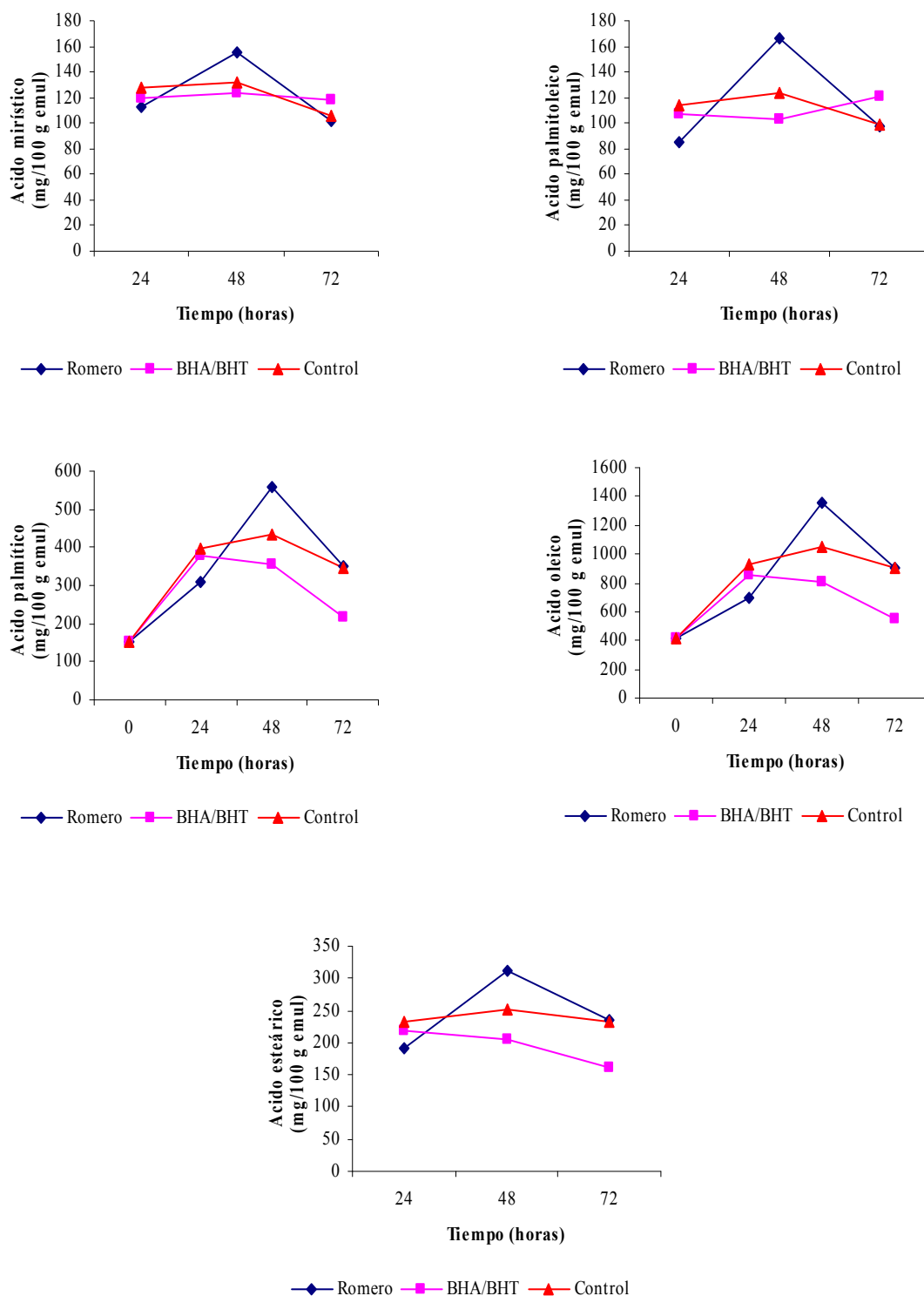


Figura 20. Concentración de ácidos grasos libres en pastas almacenadas durante 72 horas a 10° (romero en metanol)

La actividad lipolítica inicial en las muestras almacenadas a 4° fue superior a las almacenadas a 10° e inferior a las de temperatura ambiente (por comparación de las concentraciones iniciales de los ácidos grasos libres) (Figura 21 y Tablas 52 a la 56), posiblemente debido a que no se detectó ácido mirístico. A esta temperatura las concentraciones promedio de los 5 ácidos analizados, en muestras con BHA/BHT fueron mayores al resto de los tratamientos, aunque sin diferencia significativa ($p>0.01$).

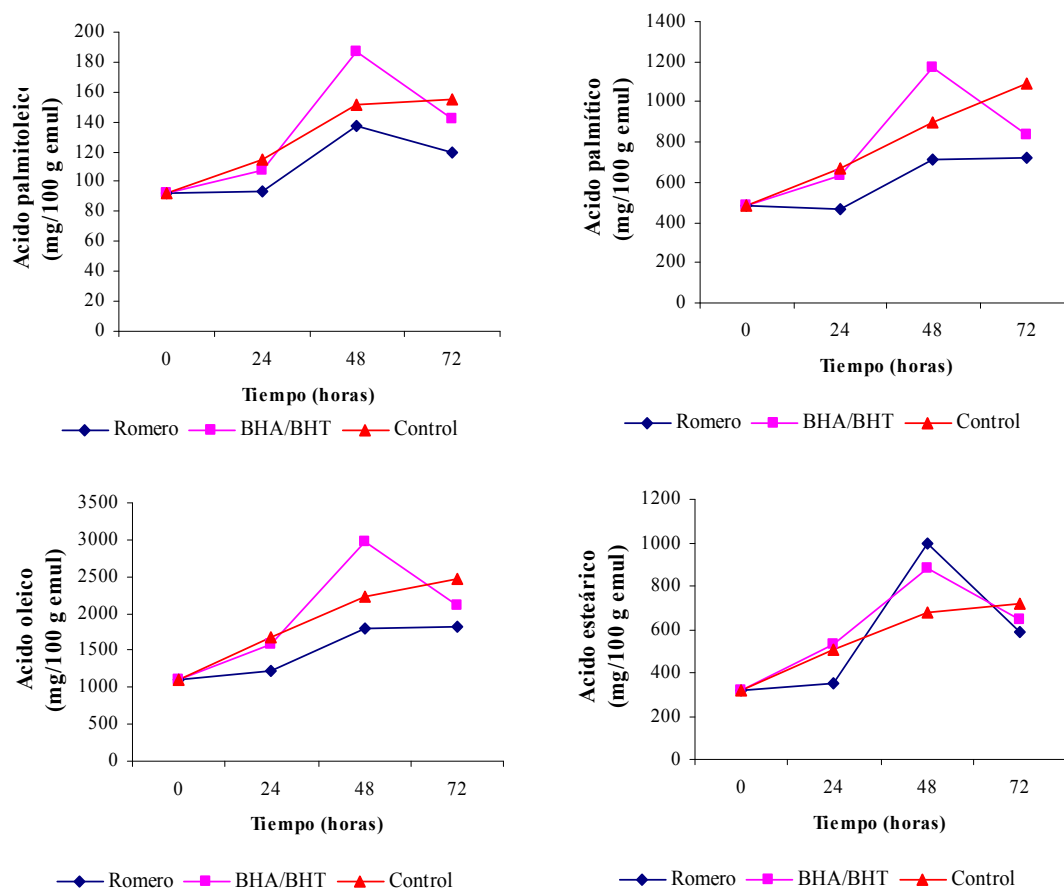


Figura 21. Concentración de ácidos grasos libres en pastas almacenadas durante 72 horas a 4° (romero en metanol)

b) Salvia:

Debido a la baja actividad lipolítica en las muestras analizadas tanto a temperatura ambiente con incorporación de aire como a 10° y 4°, no se detectó ácido mirístico durante las 72 horas en que se llevaron a cabo las determinaciones.

En los tres tratamientos a temperatura ambiente con incorporación de aire, se presentó un incremento en las concentraciones de los ácidos a las 72 horas (Figura 22 y Tablas 57 a la 60) siendo las pastas con BHA/BHT las que tienen la concentración media más alta comparada con la salvia y el control.

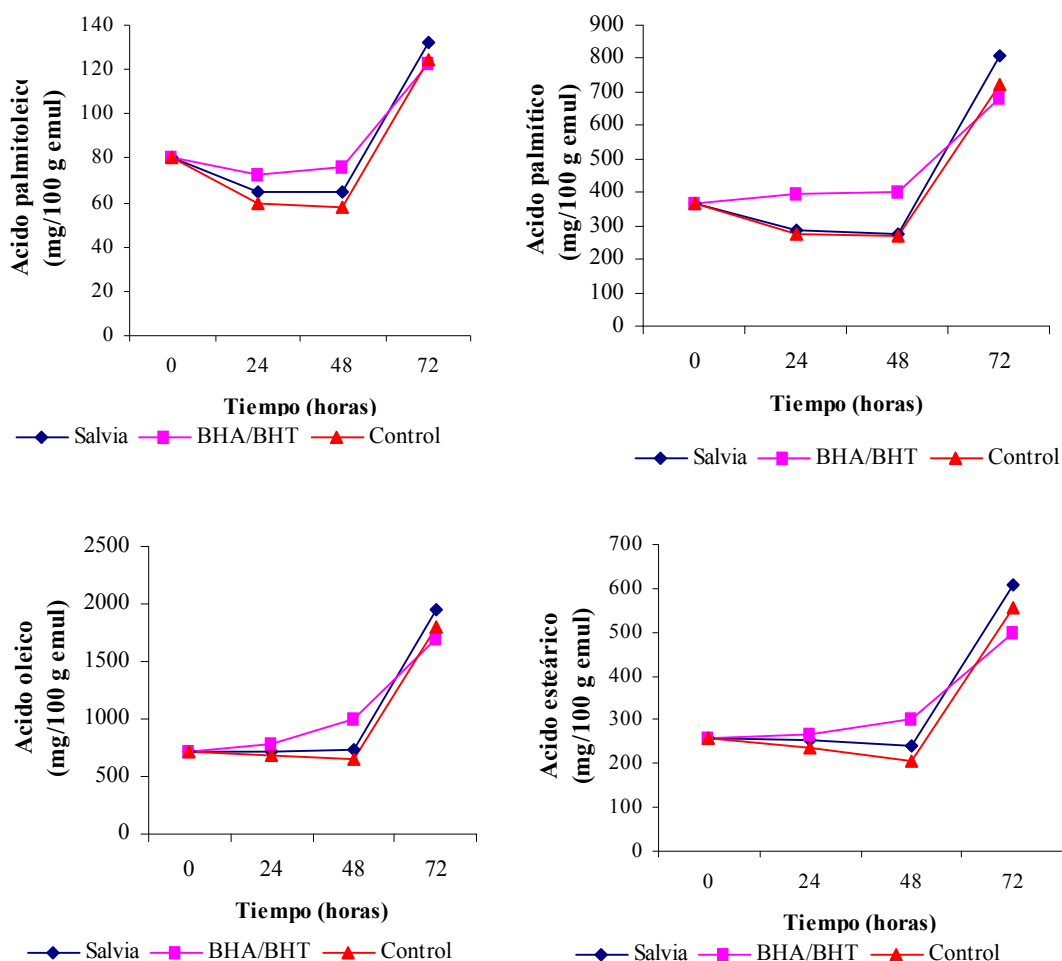


Figura 22. Concentración de ácidos grasos libres en pastas almacenadas durante 72 horas a temperatura ambiente con incorporación de aire (salvia en etanol)

Durante el almacenamiento a 10° (Figura 23 y Tablas 57 a la 60) todos los ácidos grasos en los 3 tratamientos, presentan un comportamiento similar al descrito anteriormente, es decir, se tiene un incremento en su concentración para posteriormente disminuir, aún cuando estos cambios no son significativos ($p > 0.01$).

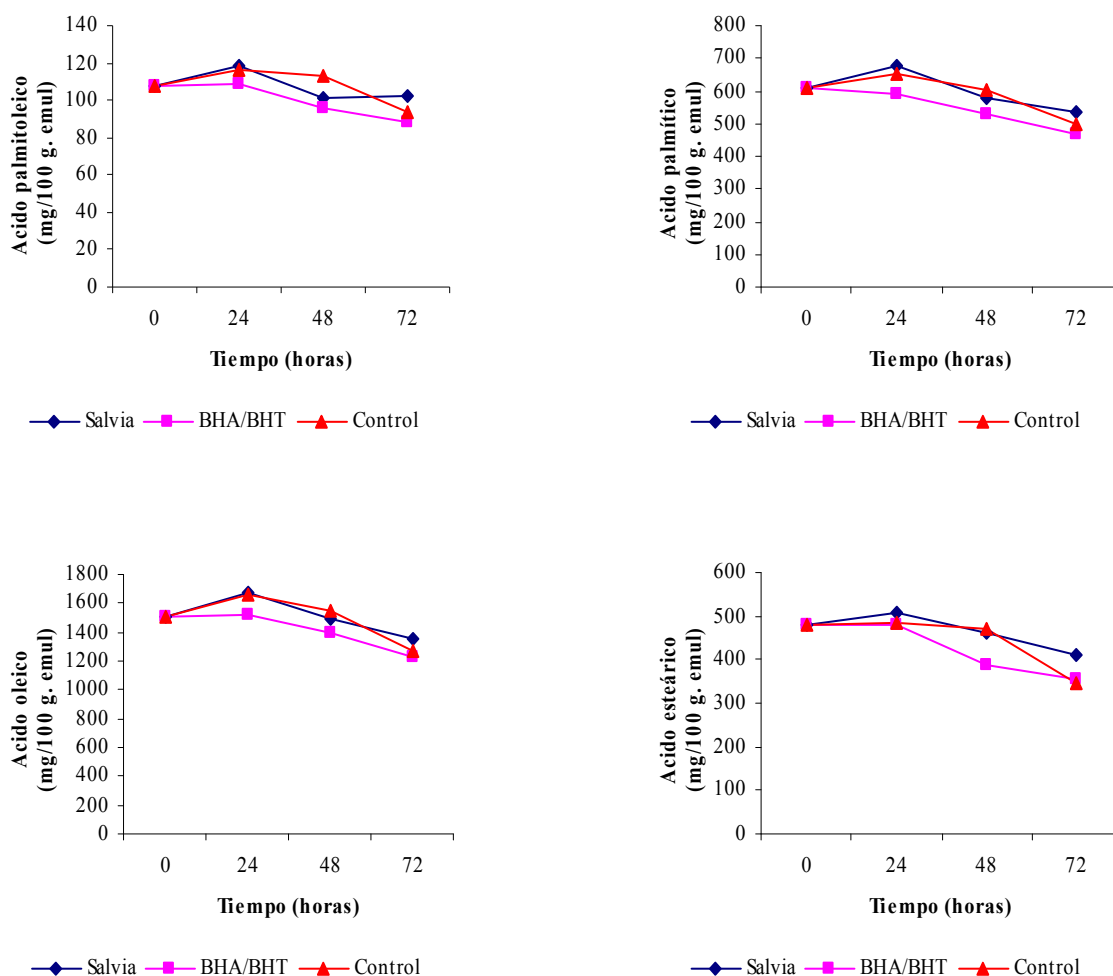


Figura 23. Concentración de ácidos grasos libres en pastas almacenadas durante 72 horas a 10° (salvia en etanol)

En el almacenamiento a 4° (Figura 24 y Tablas 57 a la 60) las cantidades de ácidos tienen una variación igual a la mencionada a 10°; sin embargo en este caso los cambios si son significativos ($p > 0.0001$) posiblemente debido a que la carga microbiana productora de enzimas lipolíticas fue superior y estas enzimas no fueron inhibidas por la temperatura de refrigeración (Nawar, 1993; Ranken, 1994).

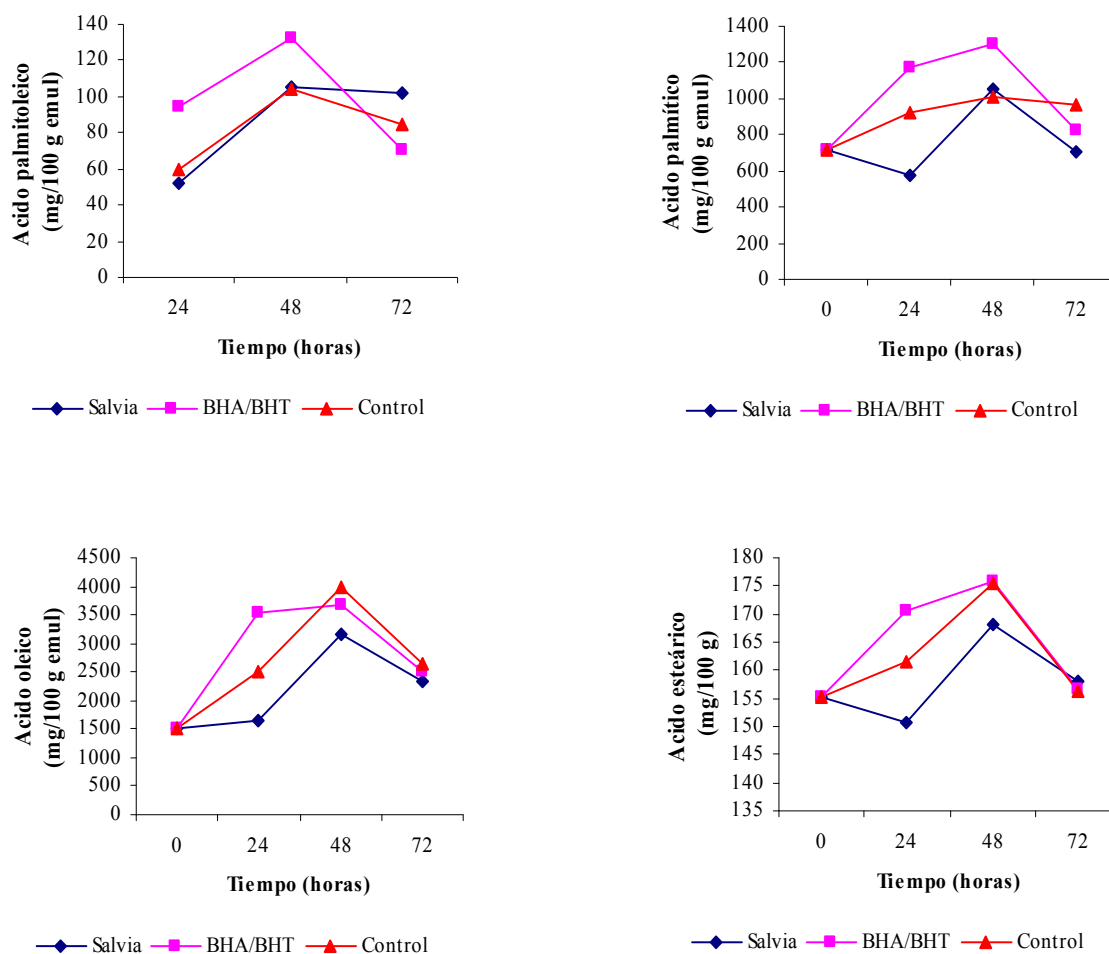


Figura 24. Concentración de ácidos grasos libres en pastas almacenadas durante 72 horas a 4° (salvia en etanol)

6.4.1.9 Análisis de ácidos de cadena corta

Los cambios fisicoquímicos relacionados con la descomposición que sufre la carne están asociados principalmente con la actividad metabólica de la microflora patógena. *Brochothrix thermosphacta* es una de las principales bacterias en procesos de descomposición, debido a que por actividad metabólica produce acetoina, ácido acético e isobutírico, entre otros.

Las enterobacterias son otro grupo importante, dentro de éste están *Serratia* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., las cuales provocan olores a putrefacción

(Minor-Pérez, 1998).

Las Tablas 60 y 61, así como las Figuras 45 y 46 muestran las áreas y curvas patrón para ácidos láctico y acético, respectivamente; la Figura 47 muestra el cromatograma de ácidos de cadena corta estudiados.

Con relación a la producción de ácido láctico, en todos los tratamientos dentro de las tres temperaturas en que se llevaron a cabo las determinaciones, se presentó una disminución significativa ($p > 0.0001$) en las concentraciones (Figura 25 y Tabla 44). Sin embargo, en muestras almacenadas a temperatura ambiente con incorporación de aire a las 72 horas de almacenamiento se detectó aproximadamente el 35% del ácido que había al inicio, a 10° el 50% y a 4° el 67%. Este comportamiento posiblemente se debió a que, de acuerdo con resultados reportados por Minor-Pérez (1998) y Elferink y col. (2001) en las pastas crecieron bacterias lácticas heterofermentativas y otras capaces de degradar el ácido láctico a acético. Por otro lado, el hecho de que a 4° se conserve el mayor porcentaje promedio del ácido pudiera ser porque, la carga microbiana fue menor, las bajas temperaturas inhibieron el crecimiento de los microorganismos que metabolizaban el ácido (Thomas y col., 1985); a esta temperatura las muestras tuvieron pH promedio de 6.02, mientras que a temperatura ambiente con aire fue 5 y a 10° 5.26, los autores antes referidos observaron que la conversión de láctico a acético se da únicamente cuando se tienen valores de pH menores de 5.8.

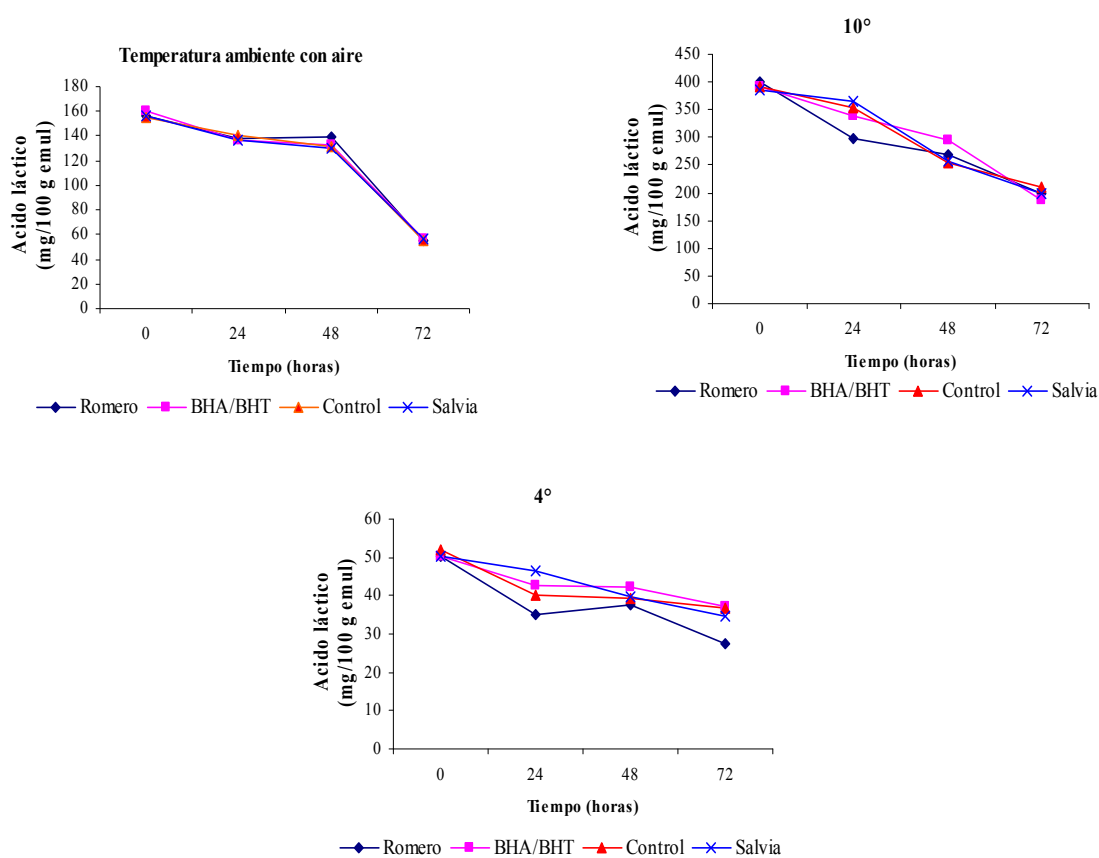


Figura 25. Contenido de ácido láctico en pastas almacenadas durante 72 horas, con extracto de romero (en metanol) y de salvia (en etanol)

Finalmente, no hubo diferencia significativa ($p > 0.0001$) en cuanto a las concentraciones finales de ácido láctico en las tres temperaturas, lo que pudiera significar que bajo las condiciones de estudio y en el período de almacenamiento en que se llevaron a cabo las determinaciones, ninguno de los antioxidantes utilizados tuvo efecto sobre el desarrollo de la flora tanto productora como consumidora de ácido láctico, de acuerdo con resultados reportados por Minor-Pérez (1998) y Elferink y col (2001).

De acuerdo con los resultados de la Figura 26 y Tabla 43 se observó un incremento en la concentración del ácido acético en las muestras, este comportamiento pudiera deberse a la microflora alterante presente en las pastas.

En las muestras almacenadas a 10° se presentó un incremento ligero al final del almacenamiento en las pastas con romero, BHA/BHT y salvia; en el caso del control hubo una disminución (182.46 a 172.94 mg/100 g), probablemente debido a que la cuenta inicial

de microorganismos era baja.

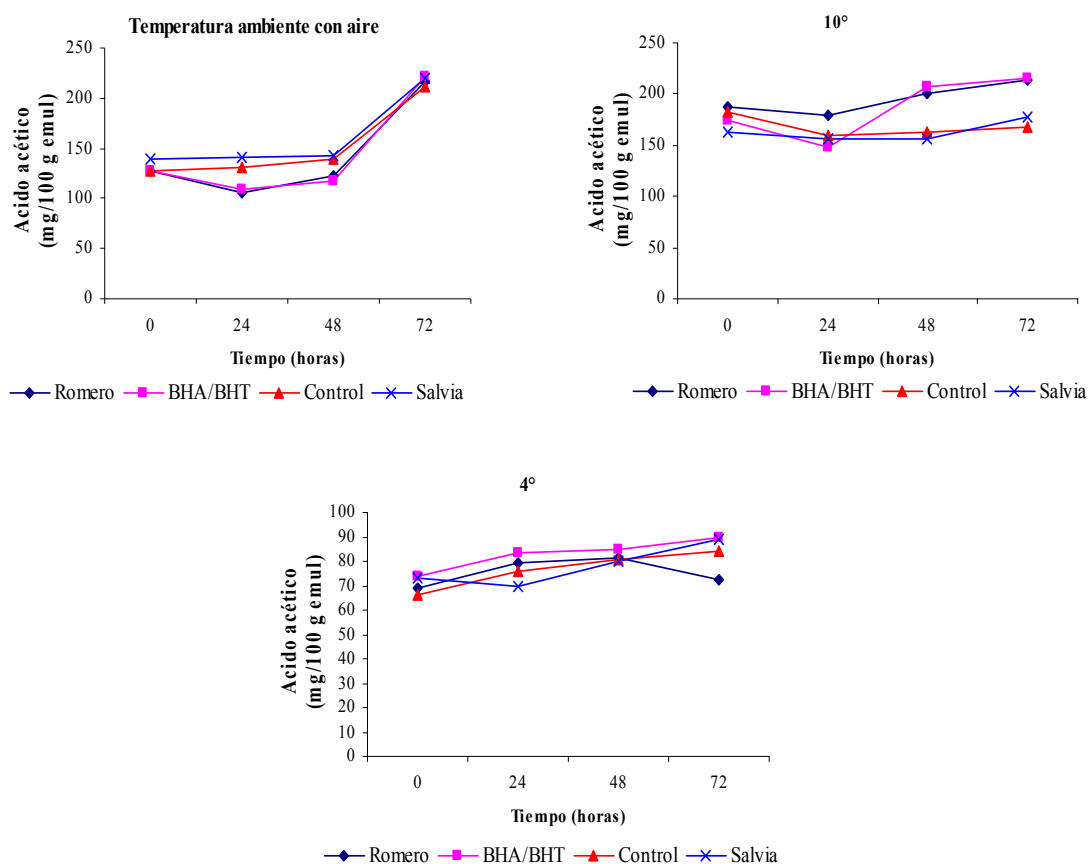


Figura 26. Contenido de ácido acético en pastas almacenadas durante 72 horas, con extracto de romero (en metanol) y de salvia (en etanol)

6.4.2 Oxidación de los ácidos grasos libres

Una vez obtenido el extracto de romero a partir de hojas frescas, como se mencionó en la sección 6.1.1, se almacenó durante 21 días y se incorporó a la pasta. Al aplicarlo se observó que si presenta actividad antioxidante (Figura 27 y Tabla 41) después de 72 horas de almacenamiento, en virtud de que a pesar de no haber diferencia significativa ($p > 0.241$), los valores TBARS en el extracto tanto a temperatura ambiente con incorporación de aire (0.394 mg/kg) como a 4° (0.143 mg/kg) son menores a los que presenta el control (0.910 y 0.701 mg/kg respectivamente). Este comportamiento puede ser explicado debido a que el extracto contiene compuestos que inactivan los radicales libres (Masuda y col., 2001; Yu y col., 2002; Fernández-López y col., 2003; Sánchez-Escalante y

col., 2003) y previenen la descomposición de los hidroperóxidos (Frankel y Huang, 1996), de esta manera hay menor formación de malonaldehído; y por otra, las condiciones de almacenamiento del extracto fueron adecuadas para conservar su poder antioxidante. Las especies químicas más comunes que participan como inactivadores de radicales libres son los grupos hidroxilo de los fenoles y amino (proteínas). Los compuestos fenólicos son los antioxidantes primarios más comunes y casi siempre los más efectivos; la eficiencia depende de su estabilidad al calor, solubilidad y sensibilidad al pH, lo cual tiene influencia en su retención y actividad (Decker, 1998). Asimismo, cuando el extracto se incorporó a una concentración superior a la que aparece en la literatura (0.02%, Chang y col., 1977) (0.15% basándose en el contenido de grasa) presentó actividad antioxidante.

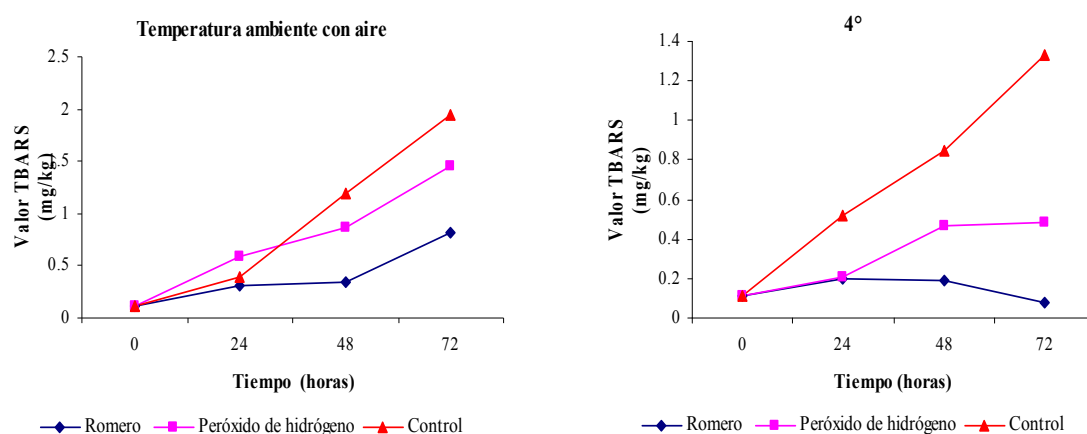


Figura 27. Valor TBARS en pastas almacenadas durante 72 horas con extracto de romero aplicado después de almacenarlo 21 días a 4° (usando cloroformo como disolvente)

Es importante mencionar que el período de inducción (Hamilton, 1994) al aplicar el extracto de romero a muestras almacenadas a temperatura ambiente con incorporación de aire fue de 48 horas y en refrigeración continuaba hasta las 72 horas, tiempo total del experimento (Figura 27). Por otra parte, los valores TBARS alcanzados en todos los tratamientos a temperatura ambiente con incorporación de aire fueron mayores que a 4° (Tabla 41) debido a que a temperatura de refrigeración disminuyó la velocidad de oxidación de los ácidos grasos (Hultin, 1993).

El peróxido de hidrógeno, que inicialmente se agregó como prooxidante no actuó en esta forma, ni a temperatura ambiente con incorporación de aire, ni a 4° al presentar valores menores de TBARS (0.751 y 0.316 mg/kg) con relación al control (0.910 y 0.701 mg/kg)

(Figura 27 y Tabla 41). Posiblemente se debió a que al agregar únicamente el peróxido sin la adición de un agente reductor, la velocidad de la reacción de Fenton y por ende la generación de radicales libres fue lenta, ya que ésta es inhibida por superóxido dismutasa y la catalasa (Aruoma y col., 1992), las cuales actúan sobre los radicales libres producidos por la reacción anterior y los formados de manera natural en la pasta.

El extracto de romero proveniente de hojas secas se aplicó a la pasta cárnica inmediatamente después de haberse obtenido observándose que, al igual que el extraído de hojas frescas, presentó actividad antioxidante tanto a temperatura ambiente como a 4° (Figura 28 y Tabla 41), lo cual indicó que los componentes que le confieren esta actividad seguían activos después del secado de las hojas. A temperatura de refrigeración el período de inducción continuaba hasta las 96 horas, mientras que a temperatura ambiente duró aproximadamente 24 horas, menor al presentado por el extracto obtenido de hojas frescas (48 horas). Esto puede explicarse en virtud de que la pasta utilizada en el primer caso presentaba una oxidación inicial mayor (valor TBARS de 0.229 y 0.108 mg/kg), lo cual significó que la cantidad de radicales libres por inactivar (Aruoma y col., 1992; Madsen y Bertelsen, 1995; Masuda y col., 2001; Yu y col., 2002; Fernández-López y col., 2003; Sánchez-Escalante y col., 2003) y la prevención de la descomposición de hidroperóxidos (Frankel y Huang, 1996) era mayor.

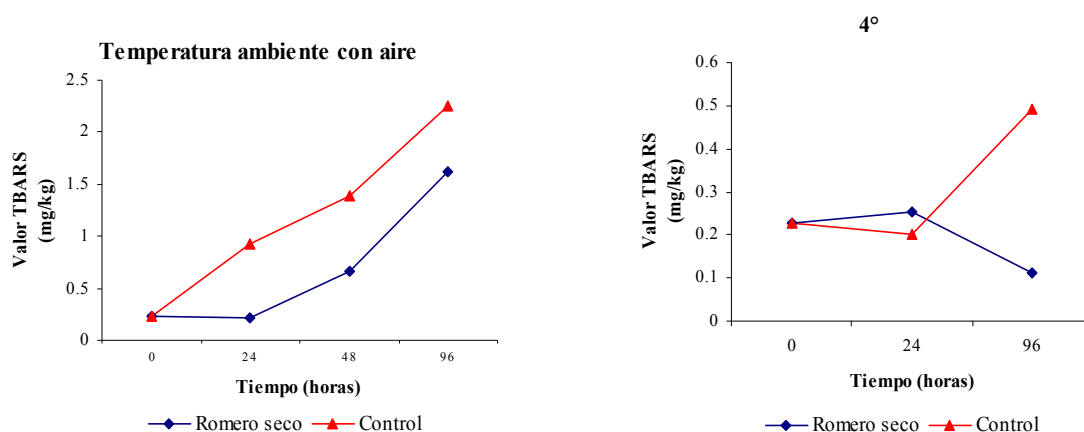


Figura 28. Valor TBARS en pastas almacenadas durante 96 horas con extracto de romero seco (usando cloroformo como disolvente)

Aunque el análisis de TBARS en muestras añadidas con extracto de salvia se llevó a cabo por duplicado, los valores de TBARS obtenidos no fueron similares (Figura 29 y Tabla 63), posiblemente debido al hecho de que el valor TBARS inicial de las pastas no fue el mismo, en el primer caso fue de 0.02 mg/kg y en el segundo de 0.332 mg/kg.

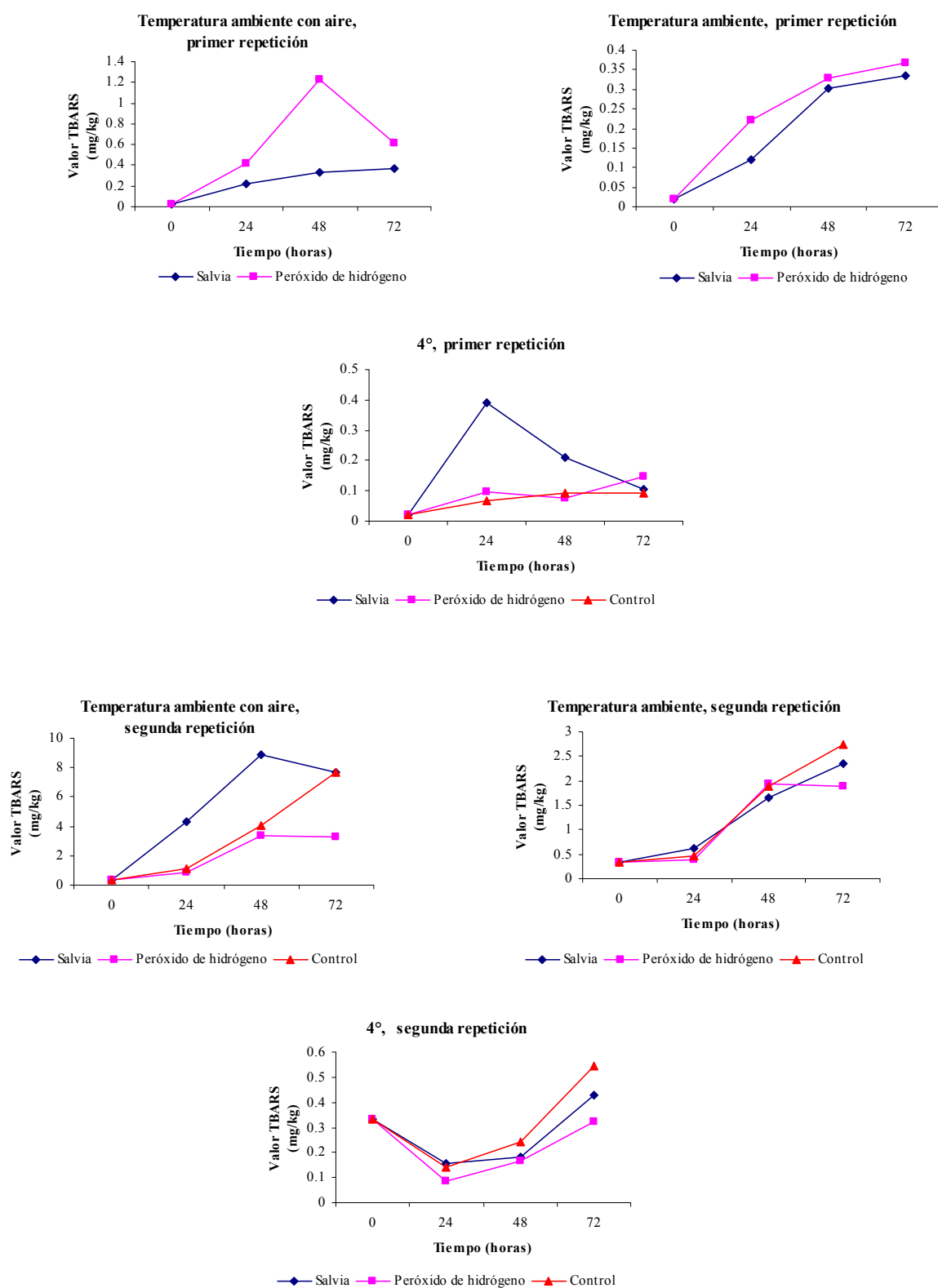


Figura 29. Valor TBARS en pastas almacenadas durante 72 horas con extracto de salvia aplicado después de almacenarlo 15 días a 4° (usando cloroformo como disolvente)

Posiblemente algunos compuestos que forman parte del extracto de salvia son sensibles a la oxidación bajo ciertas condiciones de almacenamiento, como la temperatura, la oxigenación y a los valores iniciales de oxidación de las pastas. Debido a que en la segunda repetición de la aplicación del extracto a las pastas almacenadas a temperatura ambiente con incorporación de aire actuó como prooxidante (Valor TBARS de 5.314 y 3.296 mg/kg para el extracto y control, respectivamente), estas tres condiciones pudieron inducir la oxidación de algunos compuestos los cuales provocaron una mayor formación de radicales libres que a su vez reaccionaron con los ácidos grasos (Cheftel y col., 1993; Decker, 1998).

Se utilizó un porcentaje mayor de extracto (0.15% basándose en el contenido de grasa) al reportado en la bibliografía (0.02%, Chang y col., 1977), lo que pudo causar que la salvia, en condiciones altamente oxidantes (elevada temperatura y oxigenación), sea un prooxidante (Shahidi y col., 1992; Frankel y col., 1996; Decker, 1998).

En el almacenamiento a temperatura ambiente (segunda repetición, el extracto si tuvo actividad antioxidante (Valor TBARS de 1.244 y 1.354 mg/kg para el extracto y control, respectivamente), lo que corroboró la teoría de que bajo las tres condiciones altamente oxidantes (elevada temperatura de almacenamiento, oxigenación de las muestras y altos valores iniciales de oxidación de la pasta) el extracto actuó como prooxidante.

En la segunda repetición de aplicación del extracto tanto a temperatura ambiente como a 4°, durante las primeras 48 y 72 horas respectivamente, el comportamiento de las muestras fue el mismo, independientemente del tratamiento, debido a que en ese tiempo estuvieron actuando los antioxidantes naturales de la carne (proteínas, enzimas, vitaminas, entre otros) (Deshpande y col., 1996; Alasnier y col., 2000). Por otra parte las gotas de grasa en la pasta se encuentran rodeadas de una película proteica (Flores y Bermell, 1985; Gordon y Barbut, 1992; Dickinson, 1993) la cual forma una barrera contra el paso tanto del extracto como del peróxido de hidrógeno; con el tiempo las proteínas se degradaron (Signorini, 2002) haciendo esa matriz menos compacta por lo cual quedan espacios por donde pueden penetrar tanto el extracto como el peróxido. En la primera repetición los tratamientos no presentaron este comportamiento, posiblemente debido a que las proteínas ya tenían cierta degradación al inicio del experimento.

El peróxido de hidrógeno, en la segunda repetición no actuó como prooxidante y en la primera sí actuó como tal. Este comportamiento pudo deberse a: 1) la cantidad de hierro en

el músculo utilizado para preparar la pasta fue suficiente para incrementar la velocidad de oxidación debido a que ésta depende, entre otros factores de la concentración del metal (Decker y Hultin, 1991), y/o 2) la integridad de la matriz proteica que rodea las gotas de grasa evitó el contacto del peróxido con la grasa.

De acuerdo con la Figura 30 y la Tabla 24 los valores TBARS obtenidos con el extracto de romero a las tres temperaturas estudiadas fueron inferiores a los de las muestras control aunque en algunos casos la diferencia no fue significativa, por lo que se pudo concluir que si presentó actividad antioxidante. Sin embargo, la mayoría de los valores TBARS fueron significativamente mayores ($p > 0.0001$) a los obtenidos con la mezcla BHA/BHT.

A temperatura ambiente con aereación (Figura 30), se observó que desde el primer día de almacenamiento hubo un incremento notable en valores TBARS; en el caso del romero de 0.124 a 1.172 mg/kg y para el control de 0.124 a 3.367 mg/kg, posiblemente debido a que la miosina, una de las principales proteínas miofibrilares que forman parte de la matriz que rodea al glóbulo de grasa (Gordon y Barbut, 1992), presentó degradación desde el inicio del almacenamiento a 20° (Signorini, 2002) con lo cual quedó expuesto el glóbulo de grasa a los oxidantes. Por otra parte, después de las 48 horas hubo una disminución en los valores TBARS para las pastas con romero y el control. Al respecto Li y King (1999) observaron que, conforme se incrementa la concentración del 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.

Comparando los valores iniciales de TBARS de las pastas almacenadas a 10° y 4° (Tabla 24) se puede observar que las primeras presentaron menor oxidación (0.108 y 0.214 mg/kg respectivamente) durante las 72 horas esta tendencia continuó, aún en las pastas con la mezcla BHA/BHT, lo cual significó que en pastas almacenadas a tiempos cortos con alta oxidación de ácidos grasos, esta reacción no puede ser disminuída por bajas temperaturas ni antioxidantes a niveles tan bajos como aquellos alcanzados con pastas cuya oxidación es inicialmente moderada.

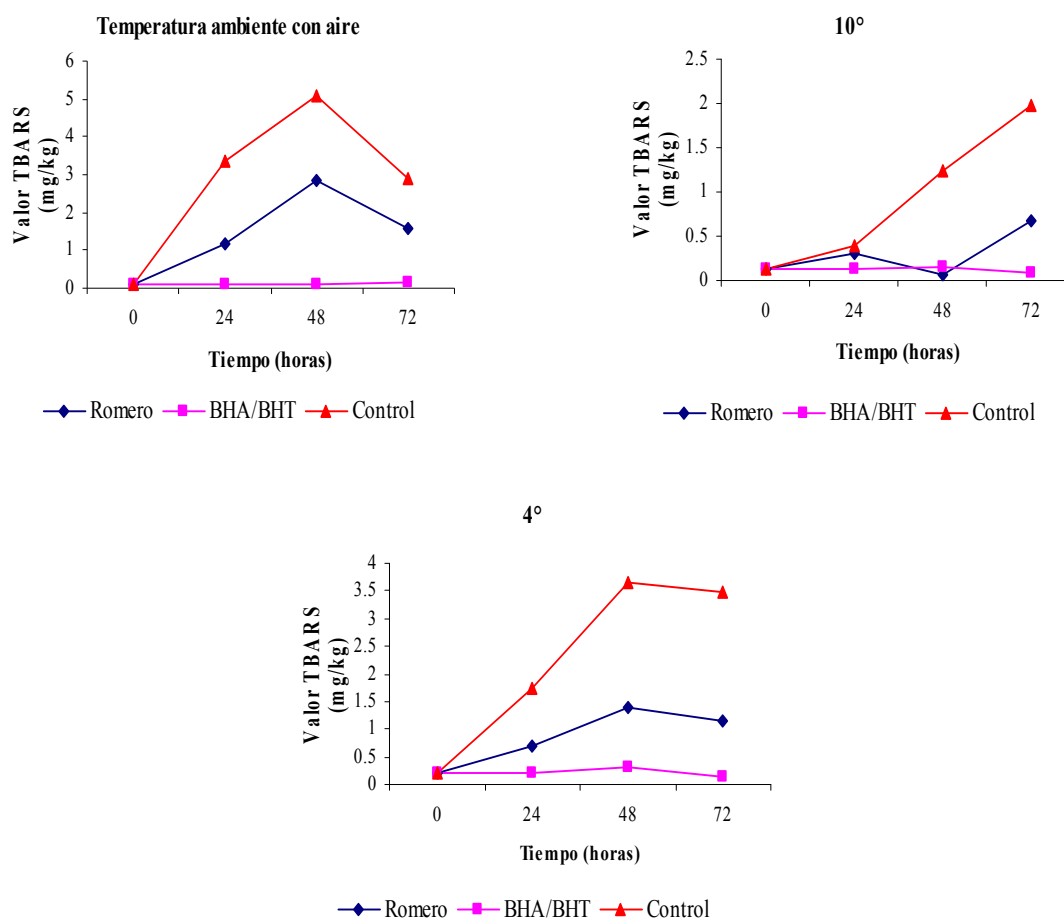


Figura 30. Valor TBARS en pastas almacenadas durante 72 horas con extracto de romero aplicado después de almacenarlo 18 horas a 4° (usando metanol como disolvente)

Para llevar a cabo este estudio se utilizó extracto de romero obtenido de hojas frescas, que se almacenó a $4 \pm 2^\circ$ en frasco ámbar tapado durante 48 horas antes de su incorporación a las pastas, es decir se refrigeró aproximadamente 30 horas más que el extracto utilizado en las pastas cuyo valor TBARS aparece en la Figura 30 y Tabla 24.

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 31 y Tabla 59, se pudo observar que el extracto actúa como antioxidante hasta las 48 horas, para posteriormente invertir este efecto, este comportamiento quizá se debió a que algunos compuestos del extracto ya estaban oxidados desde el principio del experimento; aunado a esto el metanol contiene trazas de hierro, el cual puede catalizar la oxidación del ácido carnósico (Masuda y col., 2001) los radicales formados pueden dar lugar a peróxidos y su descomposición disminuir la concentración de antioxidante en el medio, a la vez que provoca la formación de especies

radicales adicionales las cuales pueden promover la oxidación (Decker, 1998).

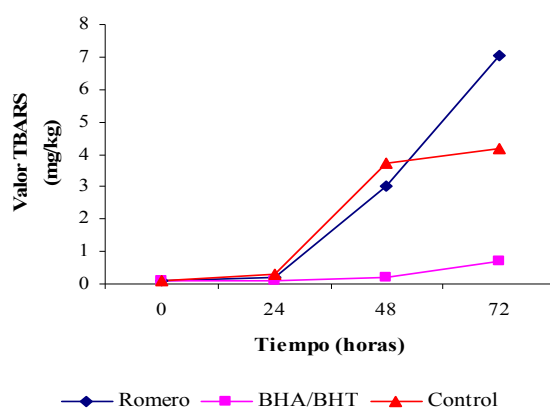


Figura 31. Valor TBARS en pastas almacenadas durante 72 horas con extracto de romero aplicado después de almacenarlo 2 días a 4° (usando metanol como disolvente) actuando como prooxidante

Al comparar los valores de TBARS iniciales y finales de las pastas almacenadas a 4° (Tablas 16 y 24) se observa que todos los tratamientos del grupo de pastas donde el romero actuó como antioxidante experimentaron menor oxidación durante las 72 horas, a pesar de presentar un valor inicial de TBARS superior (0.214 mg/kg) al de las muestras donde el extracto actuó como prooxidante (0.108 mg/kg). La posible razón es que el pH medio inicial del primer grupo fue superior (6.116) al del segundo (5.545), al respecto se ha observado que la oxidación de los lípidos se incrementa conforme el pH disminuye debido a 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, redundando en su capacidad para secuestrar iones que catalizan la oxidación (Yasosky y col., 1984).

Este análisis se llevó a cabo al mismo tiempo que el de los ácidos grasos libres, pudiéndose observar que en el caso del control (Tabla 16), hubo un incremento significativo ($p > 0.0001$) en el valor TBARS después de 48 horas de almacenamiento, la misma tendencia se observó en las concentraciones de los ácidos palmitoleico y oleico (Tablas 53 y 55) que, por ser insaturados, se oxidan más fácilmente (Ockerman, 1980; Nawar, 1993; Hamilton, 1994). Estos resultados son opuestos a los obtenidos por Alasnier y col. (2000) quienes observaron que un incremento en las cantidades de ácidos libres no es equivalente a una mayor oxidación, en virtud de que éstos pudieran permanecer en la membrana y ser protegidos de la oxidación por la vitamina E, antioxidante que se encuentra

incluido en la bicapa de la membrana. Sin embargo, este comportamiento pudiera deberse a que los frascos en donde se encontraba la pasta se abrían cada 24 horas para llevar a cabo el muestreo, por lo tanto, el aire que ingresaba aceleró la oxidación de los ácidos grasos (Nawar, 1993; Macrae y col., 1993a).

En las muestras almacenadas a las tres temperaturas estudiadas, los valores TBARS con el extracto de salvia (Figura 32 y Tabla 25) fueron inferiores a los del control, lo que significó que actuó como antioxidante. Por otro lado, al igual que en muestras con extracto de romero obtenido con metanol, la oxidación fue superior a la observada con BHA/BHT.

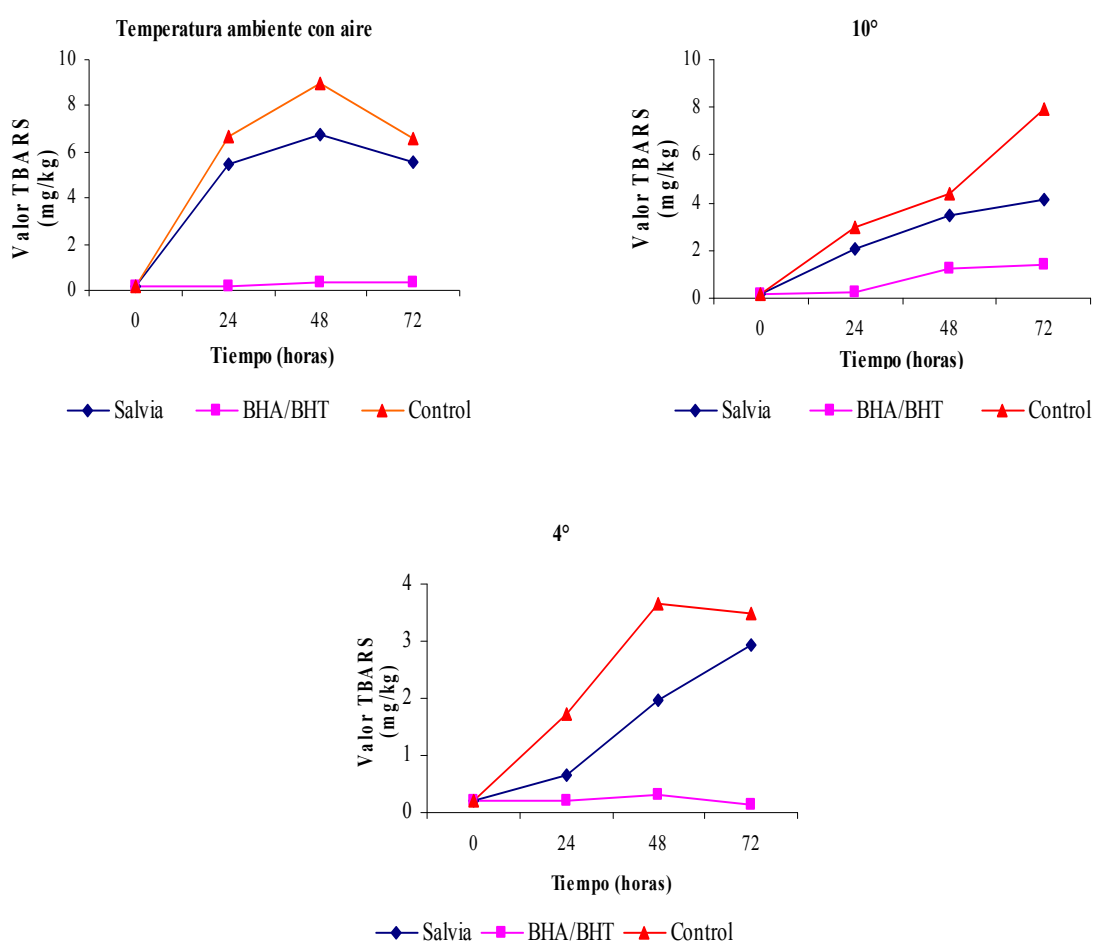


Figura 32. Valor TBARS de pastas almacenadas durante 72 horas (salvia en etanol)

Aún cuando el valor inicial de TBARS fue elevado, como es el caso de las pastas almacenadas a 4° el extracto actuó como antioxidante, efecto que no presentó el extracto obtenido con cloroformo. Esto pudiera indicar que los compuestos que le confieren la

capacidad antioxidante son polares, por lo tanto se extrae una mayor diversidad de ellos y/o se obtienen en mayor concentración con etanol.

En el almacenamiento a 4° (Tablas 24 y 25) se pudo constatar que el extracto de romero inhibe en mayor grado la formación de productos de oxidación que el extracto de salvia, al presentar un valor medio de TBARS inferior al de la salvia (0.860 y 1.444 mg/kg respectivamente).

De los datos presentados en la Figura 33 y Tabla 17 se puede concluir que en las pastas almacenadas a 30°, a partir de las 24 horas de almacenamiento el valor TBARS para el tratamiento con salvia (1.156 mg/kg) fue significativamente superior ($p > 0.0001$) al del control (0.381 mg/kg); en ese mismo lapso se presentó un comportamiento similar, a temperatura ambiente y, a partir de las 48 horas, a 4°. Esta tendencia posiblemente se debió a que, bajo las condiciones de obtención del extracto, se indujo la oxidación de algunos componentes (Cheftel y col., 1993; Decker, 1998) que pudieran actuar como prooxidantes. Por otra parte, al igual que en las pastas almacenadas durante 72 horas utilizando metanol y etanol como disolventes, en algunos de los tratamientos los valores TBARS llegan a un máximo para posteriormente descender.

Durante el período de almacenamiento a 30°, el peróxido de hidrógeno no actuó como prooxidante (Tabla 17), debido a que al disminuir la humedad de las muestras (Tabla 18) la movilidad del hierro y del peróxido también fueron menores reduciendo así su actividad catalítica (Nawar, 1993). El caso contrario se presentó en el almacenamiento a temperatura ambiente y 4°, en donde se observó actividad prooxidante lo cual se debió a la cantidad de hierro en el músculo y/o a la integridad de la matriz proteica que rodea a las gotas de grasa en la pasta.

La actividad del extracto en el almacenamiento a 72 horas a temperatura ambiente y 4°, en la segunda repetición (Tabla 63) comparada con la obtenida en 1 semana de almacenamiento (Tabla 17), se pudo observar que en la primera actuó como antioxidante, mientras que en la segunda como prooxidante. Este comportamiento pudiera deberse a que en la segunda repetición el extracto se almacenó en refrigeración durante 15 días antes de aplicarse a las pastas, lo cual pudiera haber inhibido la oxidación de algunos compuestos, dándole mayor estabilidad.

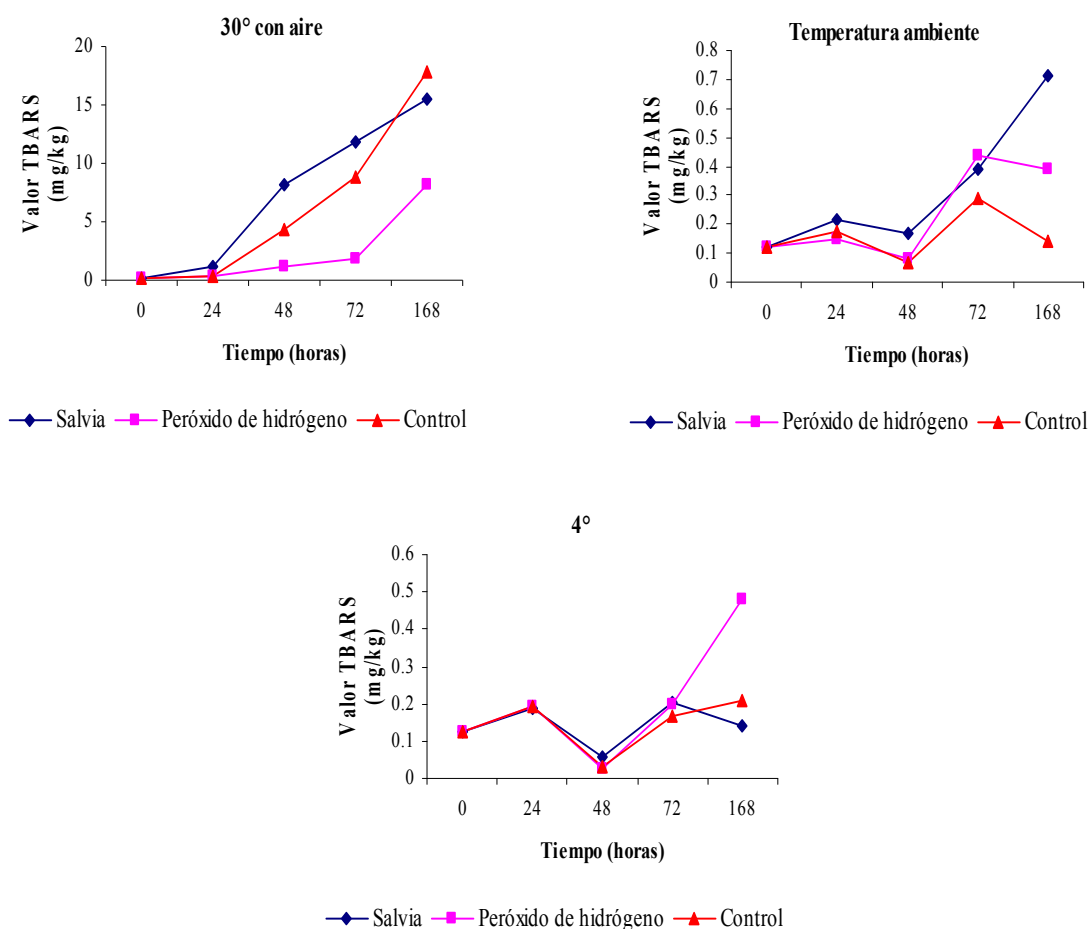


Figura 33. Valor TBARS en pastas almacenadas durante 1 semana con extracto de salvia (usando cloroformo como disolvente)

6.4.3 Almacenamiento durante 24 días.

En este tiempo de almacenamiento se probó el efecto del extracto de salvia obtenido con etanol y el de romero con cloroformo (Tabla 12, 6° experimento). Esta metodología experimental se siguió con base en resultados obtenidos en los puntos 6.4.1.1 y 6.4.2, en que con estos extractos se obtuvo la mayor protección contra la oxidación de los ácidos grasos y de la oximioglobina.

6.4.3.1 Color

a) Luminosidad

De acuerdo con los resultados reportados en la Tabla 64, se obtuvo una luminosidad inferior al control con todos los antioxidantes utilizados, siendo las pastas con extracto de romero las que presentaron un valor significativamente inferior ($p > 0.0001$) al resto de los tratamientos.

Cuando se aplicó la mezcla BHA/BHT (69.45) la luminosidad fue significativamente menor ($p > 0.0001$) al control (71.66), pero mayor al resto de los tratamientos, lo que significó que aún cuando estos antioxidantes protegieron de la oxidación a los ácidos grasos (Tabla 65), no actuaron de la misma manera con la oximioglobina. Este comportamiento posiblemente se debió a que ambos antioxidantes son reductores. Para que ocurra la oxidación de la forma ferrosa de la oximioglobina a metamioglobina, debe ser reducida otra especie, en este caso es el oxígeno unido a la molécula. Dado que éste necesita dos electrones para su reducción y en esta reacción se lleva a cabo la transferencia de uno de ellos desde el hierro al oxígeno, el segundo es donado por algún compuesto reductor (Livingston y Brown, 1981), de aquí el comportamiento antes mencionado de la mezcla BHA/BHT.

A pesar de que no hay diferencia significativa en la oxidación de los ácidos grasos entre las pastas que contenían extracto de salvia (1.56 mg malonaldehído/kg) y el control (1.73 mg/kg), el valor de la luminosidad obtenido con el primero (69.07) fue significativamente menor ($p > 0.0001$) al del control (71.66), lo cual podría indicar que el extracto contenía compuestos que le imparten estabilidad al pigmento (Yin y Cheng, 2003).

Durante el tiempo de almacenamiento se presentan disminuciones y posteriores elevaciones de los valores de luminosidad, estas fluctuaciones posiblemente se debieron a la actividad de la enzima metamioglobina reductasa, la cual reduce la metamioglobina a oximioglobina (Livingston y Brown, 1981; Stewart, 1990; Zhu y Brewer, 1998)

b) Cromaticidad

En las muestras con extracto de romero se presentó un valor de cromaticidad significativamente más alto ($p > 0.001$) (Tabla 66) que para el resto de los tratamientos. Es

decir, el color fue más intenso. Por otra parte, conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento la cromaticidad disminuyó, siendo significativa esta variación durante los primeros 7 días.

c) Tonalidad

La Tabla 67 muestra que aún cuando la diferencia no fue significativa, las muestras a las que se añadió el extracto de romero con cloroformo tuvieron un incremento en tonalidad menor, comparado con el resto de los tratamientos (Figura 34). En el caso de muestras con extracto de salvia el incremento en tonalidad (106.27) sólo fue superado por las muestras control (106.84), debido, como se mencionó anteriormente, a la oxidación que presentaron las muestras en ambos tratamientos (1.564 para la salvia y 1.738 para el control) (O'Grady y col., 2001). En el caso de la mezcla romero/salvia (95.16), aún cuando no protegió de la oxidación a la oximioglobina como lo hizo el extracto de romero, si se presentó una ligera disminución con relación a las muestras con salvia, lo cual corroboró el hecho de que algunos componentes del romero brindan protección al pigmento.

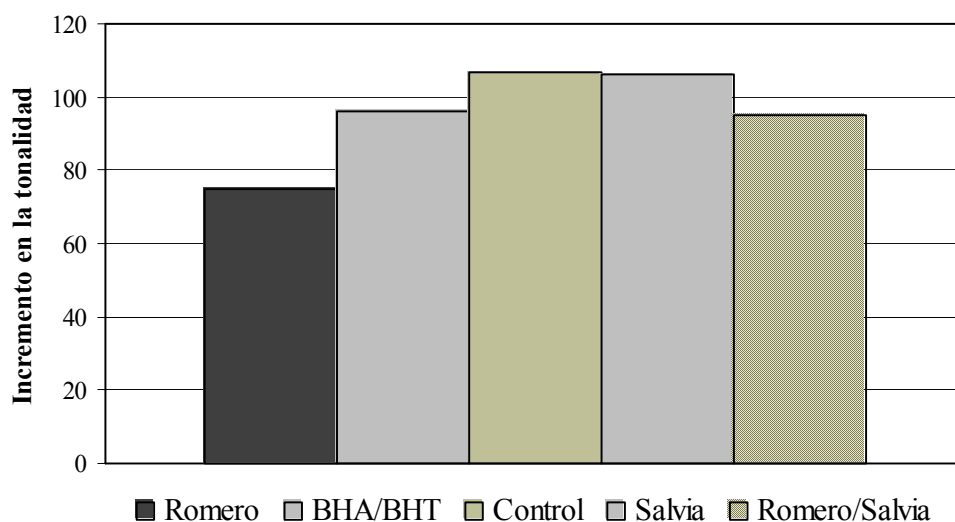


Figura 34. Incremento en la tonalidad de pastas almacenadas a 4°, durante 24 días con extracto de romero (en cloroformo) y de salvia (en etanol)

En el día 24 de almacenamiento se presentó una disminución en el incremento de la tonalidad (105.06) con relación al día 21 (134.94) esto posiblemente se debió, como se

mencionó anteriormente, a la actividad de la enzima metamioglobina reductasa presente en el tejido muscular.

6.4.3.2 Proteína

La concentración media de proteína (Tabla 68), al igual que en el almacenamiento a 72 y 1 semana (Tablas 28, 29 y 30), no fue significativamente diferente ($p > 0.887$) para cada uno de los antioxidantes aplicados. Se presentó una disminución significativa ($p > 0.004$) conforme se incrementó el tiempo de almacenamiento, posiblemente por la formación de aminas biogénicas causada por los microorganismos presentes, a partir de los aminoácidos contenidos en la pasta (Quintero-Salazar, 2001; Signorini, 2002).

6.4.3.3 Humedad

No hubo diferencia significativa ($p > 0.083$) en el contenido de humedad entre los tratamientos a los 21 días de almacenamiento (Tabla 69). Al final de este tiempo se presentó un incremento comparado con la humedad inicial, en virtud de que a temperaturas de refrigeración algunas reacciones (entre ellas la pérdida de humedad) son más lentas (Hultin, 1993). Esta variación pudo deberse al cambio en la humedad ambiente ya que los análisis se realizaron en julio, con alta humedad relativa.

6.4.3.4 Cenizas

Al igual que en el almacenamiento a 72 horas y 1 semana (Tablas 33 y 34), no se presentó diferencia significativa ($p > 0.208$) en el contenido de cenizas entre los diferentes tratamientos (Tabla 70). En los días 14 y 21 la concentración disminuyó significativamente ($p > 0.009$), posiblemente por pérdidas durante la incineración.

6.4.3.5 Grasa

La concentración media de grasa difirió significativamente ($p > 0.004$) entre los tratamientos con antioxidantes (Tabla 71), observándose un mayor contenido con el extracto de romero lo cual podría estar asociado con los bajos valores TBARS (Tabla 65) que presenta este extracto (menor oxidación de ácidos grasos libres) y al posible contenido de enzimas lipolíticas del extracto.

De igual manera que en el almacenamiento a 72 horas y 1 semana (Tablas 35, 36 y 37), las concentraciones disminuyeron significativamente ($p > 0.0001$) con el tiempo de estudio.

6.4.3.6 Actividad de agua (a_w)

De manera similar al contenido de humedad (Tabla 69), la actividad de agua no varió significativamente entre los tratamientos con los antioxidantes estudiados ($p > 0.978$) (Tabla 72). Al final del almacenamiento también se presentó un incremento ($p > 0.002$).

6.4.3.7 pH

Durante los 3 primeros días de almacenamiento se observó una disminución significativa ($p > 0.0001$) en los valores promedio de pH (Figura 35 y Tabla 73) en todos los tratamientos. Sin embargo, sólo con romero y BHA/BHT hubo un incremento en la concentración media de ácido acético (Tabla 74), el descenso en el resto de los tratamientos pudiera deberse a que, las enterobacterias presentes pueden llevar a cabo una fermentación fórmica en cuyo caso la concentración de ácido fórmico quizá sea determinante en el valor del pH. Entre los días 7 y 10 a pesar de que se presentó un incremento significativo en las concentraciones de los ácidos láctico y acético, no hubo diferencia en el pH dentro de los tratamientos. Este comportamiento se pudiera explicar por la capacidad amortiguadora del músculo (Hultin, 1993). Al término del almacenamiento, las pastas que contienen extracto de romero presentaron un pH menor a los otros tratamientos, aunque no significativo, debido a que fue el único tratamiento donde se detectó ácido acético (Tabla 74).

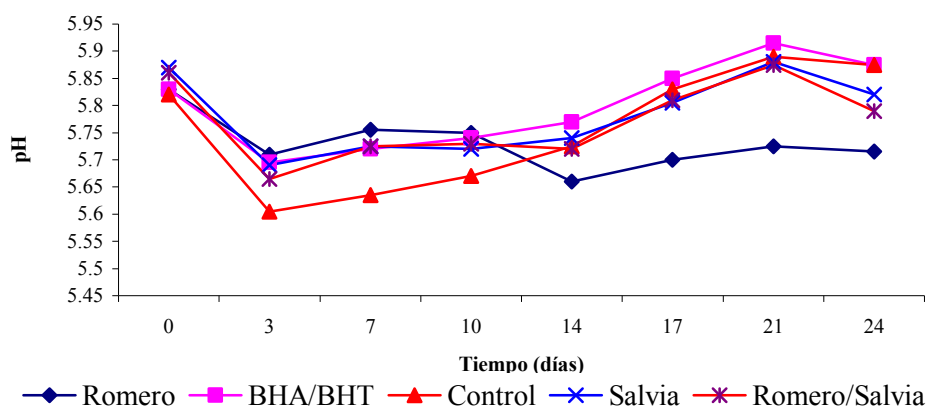


Figura 35. pH en pastas almacenadas durante 24 días a 4° con extracto de romero (en cloroformo) y de salvia (en etanol)

6.4.3.8 Concentración de ácidos grasos libres de cadena larga

No se detectó ácido mirístico en ninguno de los tratamientos, lo cual podría indicar que la actividad lipolítica en las pastas fue baja durante todo el almacenamiento (Nawar, 1993; Hernández y col., 1998).

A pesar de que a partir del día 10 y hasta el 17 las pastas con extracto de salvia presentan los valores TBARS significativamente más altos ($p > 0.0001$) (Tabla 65) comparados con los demás tratamientos, se tuvieron también las concentraciones más elevadas (a excepción del día 21 de almacenamiento) de ácidos palmitoleico, palmítico, oleico y esteárico (Figura 36 y Tablas 75 a 78). Este comportamiento posiblemente se debió a que hubo elevada actividad lipolítica además de que pudo existir una inhibición del desarrollo de la flora microbiana que metaboliza los ácidos grasos.

En el día 14 hubo un incremento significativo ($p > 0.0001$) en la concentración de todos los ácidos grasos libres en muestras añadidas con extractos de romero y de salvia por separado (Tablas 75 a 78). Al añadirse en forma conjunta ambos extractos el incremento fue significativamente superior ($p > 0.0001$) al obtenido de manera individual y al resto de los tratamientos, posiblemente debido a reacciones de lipólisis.

Las concentraciones de los cuatro ácidos grasos cuantificados aumentaron entre los días 10 y 17 de almacenamiento, con un descenso posterior. Este descenso pudiera deberse al

consumo de los ácidos por parte de la flora microbiana presente en las pastas. Signorini (2002) menciona que la curva de producción de lipasa por parte de *B. thermosphacta* presenta dos elevaciones, una durante la fase exponencial de crecimiento y la segunda en la fase estacionaria temprana.

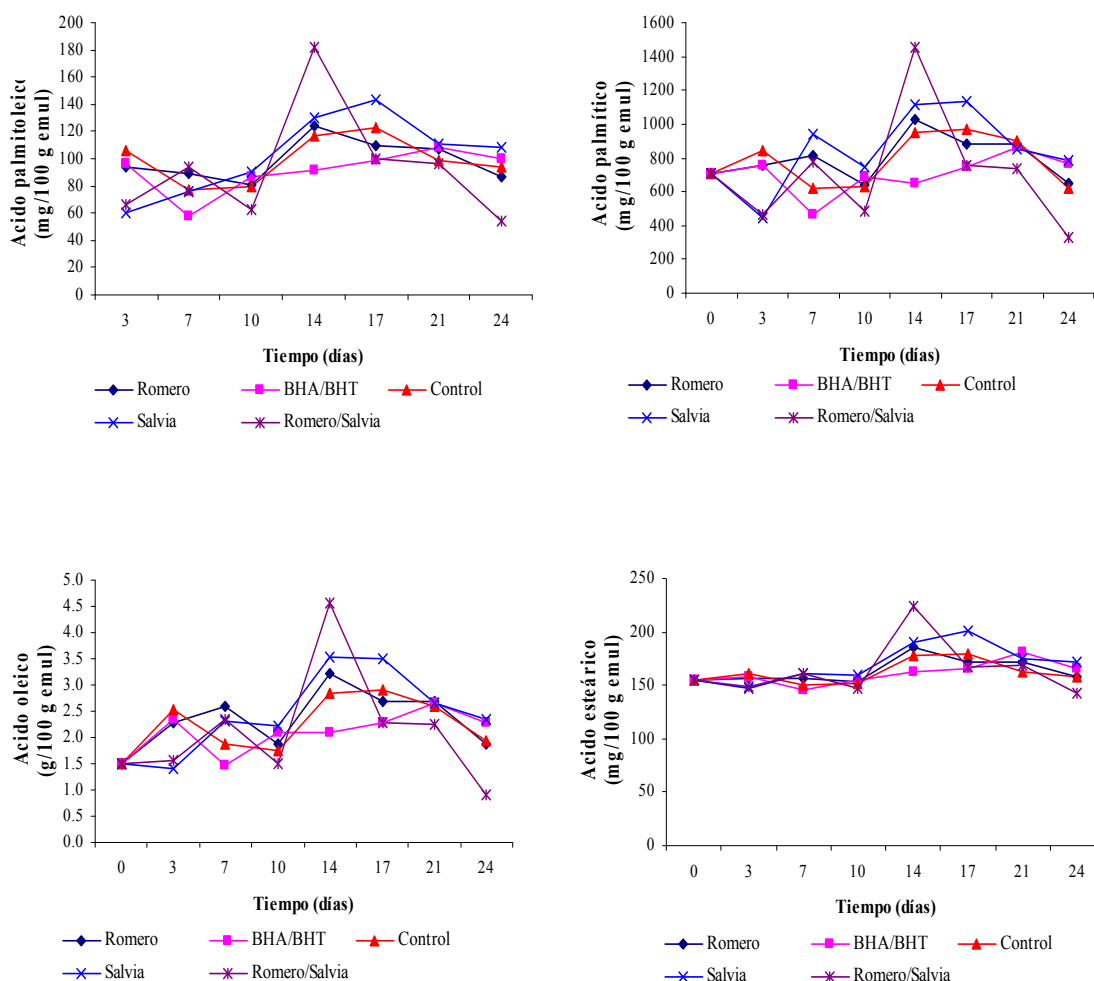


Figura 36. Concentración de ácidos grasos libres en pastas almacenadas durante 24 días a 4° con extracto de romero (en cloroformo) y de salvia (en etanol)

6.4.3.9 Análisis de ácidos de cadena corta

Para todos los tratamientos no hubo cambio significativo ($p > 0.01$) en las concentraciones de los ácidos láctico y acético durante los primeros tres días (Figura 37 y Tablas 74 y 79). A partir del día siete se incrementó significativamente la concentración de

ambos ácidos ($p > 0.0001$), disminuyendo el ácido láctico en el día 17 y, en el día 10 el ácido acético. La disminución en el ácido láctico no coincidió con el incremento del acético como pudiera esperarse, posiblemente debido a la predominancia de diferentes tipos de microorganismos a lo largo del almacenamiento, primero degradando el ácido láctico para formar acético y posteriormente metabolizando a este último.

A excepción del día 21, durante todo el almacenamiento las concentraciones de ácido láctico en pastas con extracto de romero fueron las más bajas, al mismo tiempo, la concentración de ácido acético en estas muestras fue la más elevada, lo cual pudiera indicar que el extracto contiene compuestos que inhiben el crecimiento de algunos microorganismos, como *E. coli*, que puede reducir el ácido acético a etanol (Coppen, 1994; Del Pozo-Insfran y col., 2002; Draughon, 2004).

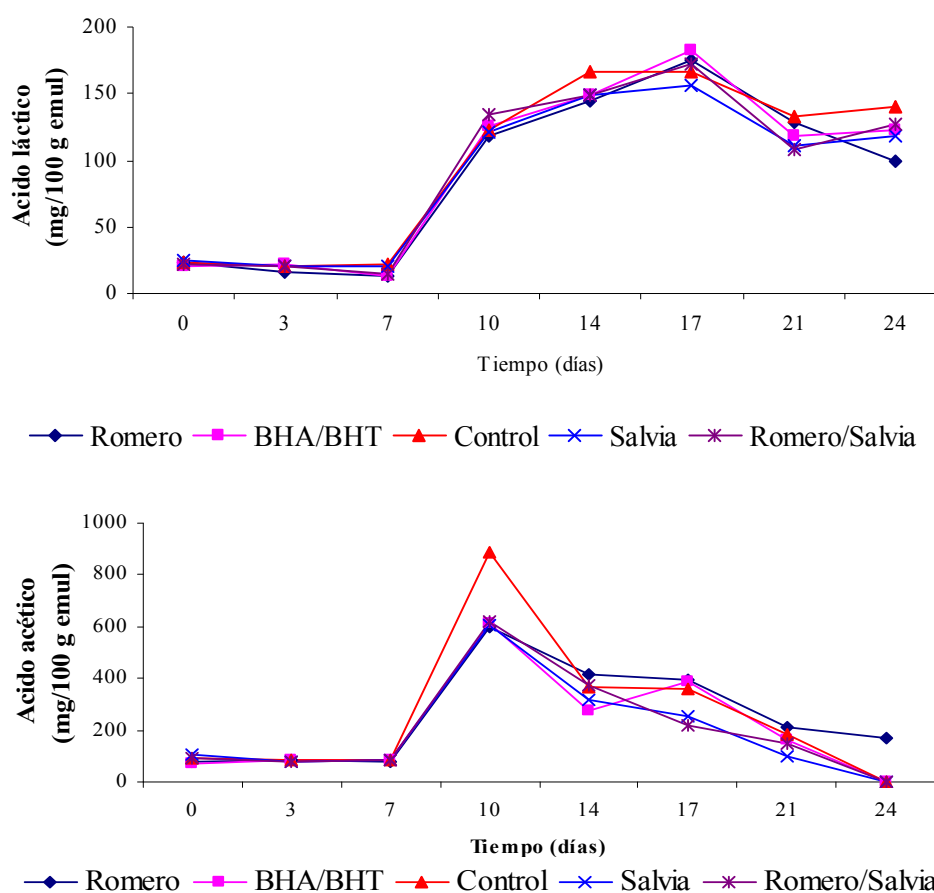


Figura 37. Concentración de ácido láctico y acético en pastas almacenadas durante 24 días a 4° con extracto de romero (en cloroformo) y de salvia (en etanol)

6.4.4 Oxidación de los ácidos grasos libres

En todos los tratamientos, excepto en el control durante los 3 primeros días de almacenamiento, se presentó un descenso en los valores TBARS (Figura 38 y Tabla 65), lo que significó que hubo actividad antioxidante; esta tendencia posiblemente se debió a que, el malonaldehído presente en las pastas reaccionó con las proteínas de la matriz de la pasta (Li y King, 1999); además los antioxidantes inhibieron la formación de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (Frankel y Huang, 1996).

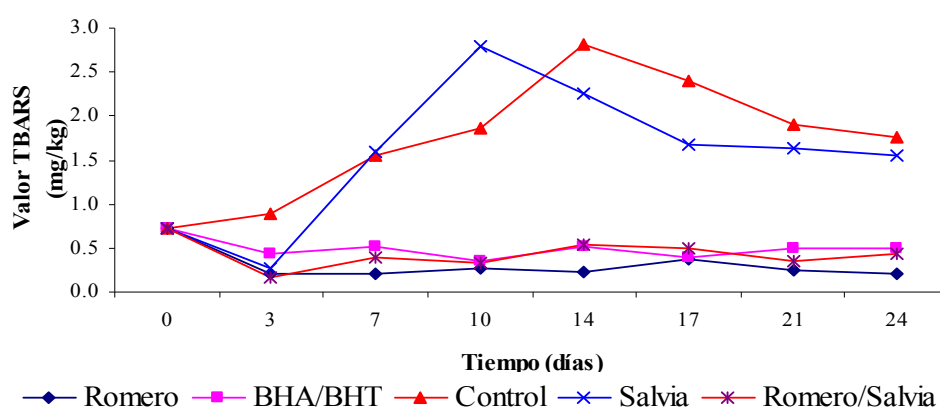


Figura 38. Valor TBARS para pastas almacenadas durante 24 días a 4° con extracto de romero (en cloroformo) y de salvia (en etanol)

En el caso del control, la velocidad de formación de las sustancias reactivas posiblemente fue superior a la de la reacción del malonaldehído, de aquí que hubo un incremento en su concentración; asimismo, en este período se observó un incremento significativo ($p > 0.0001$) en las concentraciones de los ácidos palmitoleico y oleico (Tablas 75 y 77), mientras que el valor TBARS no aumentó, lo que coincide con los resultados obtenidos por Alasnier y col. (2000). Al conservar las muestras en frascos cerrados, se impidió el paso del oxígeno, lo que disminuyó notablemente las reacciones de oxidación.

El propósito de aplicar una mezcla de los extractos de romero y de salvia fue observar si presentaban sinergismo. Este se presentó en el día 3, en virtud de que el valor TBARS para la mezcla (0.172 mg/kg) fue inferior al del romero (0.208 mg/kg) y al de la salvia (0.261 mg/kg) utilizados de manera individual; posiblemente a partir de este tiempo alguno o

algunos de los compuestos que forman parte del extracto de salvia se oxidaron rápidamente, no llevándose a cabo la donación de protones entre los compuestos antioxidantes de ambos extractos, los cuales se regeneran y continúan con su acción antioxidante (Nawar, 1993). Por otra parte, el extracto de romero no sólo debe inactivar los radicales libres formados en la emulsión misma, sino también aquellos formados por el extracto de salvia (Cheftel y col., 1993; Decker, 1998).

El período de inducción continuó hasta el día 24 de almacenamiento en las pastas que contenían el extracto de romero y las mezclas romero/salvia y BHA/BHT (Macrae y col., 1993a; Hamilton, 1994). Finalmente, los valores TBARS observados durante el almacenamiento con el extracto de romero (0.306 mg/kg) y la mezcla romero/salvia (0.431 mg/kg) fueron inferiores al observado con la mezcla BHA/BHT (0.491 mg/kg), lo cual indicó que tuvo un poder antioxidante superior al presentado con antioxidantes comerciales, aún cuando éstos sean sinergistas.

El extracto de romero se añadió en concentraciones de 0.02% p/p con base en el peso total de la pasta (0.15% en el contenido de grasa) y de 0.02% p/p con base en el peso de la grasa agregada a la pasta; en ambos casos actuó como antioxidante en el almacenamiento a 72 horas y 24 días respectivamente (Tablas 41 y 65).

Es importante mencionar que en el sistema estudiado, pasta de carne cruda de cerdo, y empleando el valor TBARS para medir la oxidación de los ácidos grasos, el más efectivo antioxidante vegetal fue el extracto de romero obtenido con cloroformo, siguiéndole el de romero con metanol, salvia con etanol y salvia con cloroformo. Aún cuando no se realizó el análisis de la composición de los extractos, basándose en la información de la bibliografía, se puede concluir que el poder antioxidante del extracto de romero fue superior al de salvia, debido a que el ácido carnósico es el compuesto presente en mayor concentración en el romero, mientras que el ácido rosmarínico, es el de mayor concentración en la salvia. De acuerdo con información publicada por McClemens y Decker (2002), 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, que es el sitio donde se lleva a cabo la oxidación. Basándose en la polaridad de los compuestos antes mencionados, al llevar a cabo la extracción con cloroformo, siendo este menos polar que el metanol, se obtuvo una

mayor concentración de ácido carnósico en el extracto de romero; de igual manera al llevar a cabo la extracción de extracto de salvia con etanol, cuya polaridad es superior al cloroformo, se extrajo una mayor cantidad de ácido rosmarínico.

7. CONCLUSIONES

- La incorporación de los extractos de romero obtenidos con cloroformo y con metanol, de salvia con cloroformo y con etanol, el peróxido de hidrógeno y la mezcla BHA/BHT no afectaron el contenido de proteína, humedad, cenizas, grasa, actividad de agua y pH en las pastas almacenadas a temperatura ambiente con incorporación de aire, a temperatura ambiente, 10° y 4° durante 72 horas. Asimismo, el extracto de romero con cloroformo, salvia con etanol, las mezclas romero/salvia y BHA/BHT no influyeron en el contenido de proteína, humedad, cenizas y actividad de agua en el almacenamiento a 4° durante 24 días.
- El peróxido de hidrógeno, en ausencia de un compuesto reductor provocó la oxidación de ácidos grasos en las pastas almacenadas durante 72 horas a 4° en la primer repetición de aplicación del extracto de salvia con cloroformo; y temperatura ambiente y 4° en el almacenamiento a 1 semana, en el resto de los tratamientos no presentó acción prooxidante. Sin embargo, sí provocó la oxidación de la oximioglobina.
- El extracto de salvia con etanol protegió a la oximioglobina de la oxidación, mientras que el mismo extracto con cloroformo la aceleró.
- La mezcla BHA/BHT tuvo un poder antioxidante hacia los ácidos grasos superior al del extracto de romero con metanol y al de salvia con etanol, pero provocó una mayor oxidación de la oximioglobina.
- Los extractos de romero con cloroformo y con metanol protegieron a la oximioglobina contra la oxidación. En muestras con extracto de romero con cloroformo se presentó menor oxidación que el de salvia con etanol, al almacenarlos 24 días a 4°.
- La oxidación de la oximioglobina estuvo en función de la oxidación de las pastas expresada como valores TBARS, la temperatura, el tiempo de almacenamiento y la composición de los extractos.
- El incremento en la concentración de ácidos grasos libres no favoreció la oxidación de los mismos.

-
- Los extractos de romero con metanol, de salvia con etanol y la mezcla BHA/BHT no tuvieron influencia sobre la concentración de ácidos grasos libres de cadena larga ni de ácidos láctico y acético por 72 horas, independientemente de la temperatura de almacenamiento.
 - A 4° durante 24 días se presentó un incremento significativo ($p > 0.0001$) en la concentración de todos los ácidos grasos libres de cadena larga en muestras con extractos de romero y de salvia por separado y en mezcla.
 - Los cambios en las concentraciones de los ácidos láctico y acético parecen estar relacionados con la presencia de microorganismos.
 - Los extractos de romero provenientes tanto de hojas frescas como secas inhibieron la oxidación de ácidos grasos.
 - El extracto de salvia obtenido con cloroformo actuó como prooxidante cuando se incorporó aire a las pastas, la oxidación inicial de los ácidos grasos de las muestras fue elevada (Valor TBARS de 0.123 mg/kg y 0.332 mg/kg) y se añadió a la pasta en una concentración de 0.02% con base en el peso de la misma.
 - Los extractos de romero con cloroformo y de salvia con etanol presentaron sinergismo durante los 3 primeros días de almacenamiento refrigerado.
 - En el sistema utilizado, pasta de carne cruda de cerdo tomando como criterio el valor TBARS para medir la oxidación, el antioxidante vegetal más eficiente fue el de romero obtenido con cloroformo, siguiéndole el de romero con metanol, salvia con etanol y salvia con cloroformo.

8. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

La discusión sobre el mecanismo de acción de los extractos, se dieron con base en la información que aparece en la literatura. Sin embargo, se considera necesario llevar a cabo estudios para corroborar y complementar esta información.

Dentro de estos estudios es fundamental la separación y caracterización de los principales componentes de cada uno de los extractos, aplicándolos de manera individual a las pastas, para observar su influencia sobre las propiedades estudiadas en esta tesis.

La posible actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos aplicados a pastas almacenadas a distintas temperaturas es también tema de futuros estudios.

Dado que los extractos se aplicaron a la pasta en forma de solución en el disolvente con el cual se extrajeron, es necesario realizar pruebas de solubilidad en disolventes GRAS para poder ser aplicados en los alimentos. Es necesario desarrollar o adaptar alguna metodología por medio de la cual los extractos puedan incorporarse a las pastas sin modificar sus propiedades.

Finalmente, una vez determinado el disolvente y la forma de aplicación de los extractos, incorporar éstos a un producto alimenticio real similar a la pasta estudiada en esta tesis, y determinar la efectividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos.

9. BIBLIOGRAFIA

- Alarcón, A. D.** 1992. Constitución química y bioquímica del músculo y calidad de la carne. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia, División de Posgrado Analítico.
- 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.
- Alberti, P.,** Sañudo, C. y Bahamonde, A. 2002. Spectrophotometric characterisation of colour classification system of beef meat. *48th International Congress of Meat Science and Technology*. Volumen II, Roma, 25-30 de agosto del 2002, pp. 454 - 455.
- Ander, P.** y Sonnessa, A. J. 1979. La Ley de distribución de Nernst. Propiedades de las soluciones. En: Principios de Química. Introducción a los Conceptos Teóricos. Editorial Limusa, México, pp. 474 – 476.
- 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 Loligers, J. 1992. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, **22**(2): 257 - 268.
- Badui, S.** 1996. Diccionario de Tecnología de los Alimentos. Editorial Alhambra Mexicana, México, p. 159.
- Betancourt, Y.,** Gutiérrez, M. A. y Betancourt, I. 2003. Red mexicana de plantas medicinales. En Red de plantas medicinales de Tlaxcala.
En: <http://www.geocities.com/florbach/>.
- Bhagavan, H. N.** y Nair, P. P. 1992. Antioxidants in dietary fats. En: Fatty acids in Foods and their Health Implications. Marcel Dekker, Nueva York, pp. 329 – 336.
- Bourges-Rodríguez, H.** 2000. Los lípidos en la nutrición humana. En: Cuadernos de Nutrición. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.
En: <http://www.aerobicos.com.mx>.

-
- Bradbury, A. G W.** 1990. Gas chromatography of carbohydrates in food. En: Principles and Applications of Gas Chromatography in Food Analysis. Gordon, M. H. (Ed.). Ellis Horwood Limited, West Sussex, Inglaterra, pp. 111 - 144.
- Brewer, M. S.** 1998. What is “warmed-over-flavor”?. National Pork Board. American Meat Science Association. En: <http://www.porkboard.org/>
- Brewer, M. S.** y Harbers, C. A. Z. 1991. Effect of packaging on physical and sensory characteristics of ground pork in long-term frozen storage. *Journal of Food Science*, **56**(3): 627 – 631.
- Colby, D. S.** 1987. Función de las proteínas. Fijación. En: Compendio de Bioquímica. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V., pp. 29 - 44.
- Coppen, P. P.** 1994. The use of antioxidants. En: Rancidity in Foods. Allen, J. C. y Hamilton, R. J. (Eds.). Blackie Academic and Professional, Londres, Gran Bretaña, pp. 84 - 103.
- Cortés, F.** 2000. Medicine, myths and magic the folk healers of a Mexican market. *Economic Botany*, **54**(4): 427 – 438.
- Cuvelier, M. E.,** Berset, C. y Richard, H. 1994. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**(3): 665 - 669.
- Chang, S. S.,** Ostric-Matijasevic, B., Hsieh, O. A. L. y Huang, C. 1977. Natural antioxidants from rosemary and sage. *Journal of Food Science*, **42**(4): 1102 – 1106.
- Cheftel, J. C.,** Cuq, J. L. y Lorient, D. 1993. Aminoácidos péptidos y proteínas. En: Química de los Alimentos. Fennema, O. R. (Ed.), Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España, pp. 275 - 414.
- Chen, X.,** Jo, C., Lee, J. I. y Ahn, D. U. 1999. Lipid oxidation volatiles and color changes of irradiated pork patties as affected by antioxidants. *Journal of Food Science*, **64**(1): 16 - 19.
- Dainty, R. H.,** Shaw, B. G y Roberts, T. A. 1983. Microbial and chemical changes in chill-stored red meats. *Food Microbiology*, **1**: 151 - 177.
- Decker, E. A.** 1998. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in Food Science and Technology*, **9**: 241 - 248.
-

-
- Decker, E. A.** y Hultin, H. O. 1991. Lipid oxidation in muscle foods via redox iron. En: Lipid Oxidation in Food. St. Angelo, A. J. (Ed.). *American Chemical Society at the Fourth Chemical Congress of North America*, American Chemical Society, ACS Symposium Series 500, Washington.
- Del Pozo-Insfran, D.**, Hernández-Brenes, C., Cantú, H. y Covarrubias, A. A. 2002. Determinación de las propiedades antimicrobianas de pigmentos naturales estabilizados. En: <http://congresoie.mty.itesm.mx>.
- Deshpande, S. S.**, Deshpande, U. S. y Salunkhe, D. K. 1996. Nutritional and health aspects of food antioxidants. En: Food Antioxidants. Technological Toxicological and Health Perspectives. Marcel Dekker. Nueva York. pp. 361 - 470.
- Dickinson, E.** 1993. Towards more natural emulsifiers. *Trends in Food Science and Technology*, **4**: 330 - 333.
- Draughon, F. A.** 2004. Use of botanicals as biopreservatives in foods. *Food Technology*, **58**(2): 20 – 28.
- Duke, J. A.** 1985. Handbook of Medical Herbs. CRC Press. Boca Ratón, Florida.
- Elferink, O.**, Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F. y Driehuis, F. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 12-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(1): 125 - 132.
- 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.
- 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, S. A., México, pp. 124 – 125.
- Flores, J.** y Bermell, S. 1985. Capacidad de emulsión de las proteínas miofibrilares. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* (España), **25**(4): 481 - 489.
- Folkes, D. J.** y Crane, L. 1988. Determination of carbohydrates. En: HPLC in Food Analysis. Macrae, R. (Ed). Academic Press, Londres, Gran Bretaña, pp. 71 – 94.
- 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.
- 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**: 201 – 208.
- Furesa.** 2002. Extracto de romero.
En: <http://www.furesa.es/fufural/spain/productos/romero.html>.
- Gordon, A.** y Barbut, S. 1992. Mechanisms of meat batter stabilization: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32**(4): 299 - 332.
- Gordon, M. H.** 1990a. Lipids. En: Principles and Applications of Gas Chromatography in Food Analysis. Gordon, M. H. (Ed). Ellis Horwood Limited, West Sussex, Gran Bretaña, pp. 145 - 175.
- Gordon, M. H.** 1990b. Principles of gas chromatography. En: Principles and Applications of Gas Chromatography in Food Analysis. Gordon, M. H. (Ed). Ellis Horwood Limited, West Sussex, Gran Bretaña, pp. 11 - 58.
- Greer, G G** 1988. Bacteria and meat quality. *31st Annual Conference of the Canadian Institute of Food Science and Technology*, Winnipeg, Canadá.
- Guerrero, I.,** Ponce, E. y Pérez-Chabela, M. L. 2002. Curso Práctico de Tecnología de Carne y Pescado. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, D. F.
- Guntensperger, B.,** Hammerli-Meier, D. E. y Escher, F. E. 1998. Rosemary extract and precooking effects on lipid oxidation in heat-sterilized meat. *Journal of Food Science*, **63**(6): 955 – 957.
- 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>
- 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, P.,** Navarro, J. L. y Toldrá, F. 1998. Lipid composition and lipolytic enzyme activities in porcine skeletal muscles with different oxidative pattern. *Meat Science*, **49** (1): 1 – 10.
-

-
- 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.
- Hultin, H. O.** 1993. Características del tejido muscular. En: Química de los Alimentos. Fennema, O. R. (Ed.). Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España, pp. 815 – 888.
- Hunt, M. C.** 1980. Meat color measurements. En: *Annual Reciprocal Meat Conference*. Volumen 33, Universidad Purdue, West Lafayette, Indiana.
- 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. Marcel Dekker. Nueva York, pp. 5 - 64.
- Jaswir, I.** Chen Man, Y. B. y Kitts, D. D. 2000. Synergistic effects of rosemary sage and citric acid on fatty acid retention of palm olein during deep – fat frying. *Journal of American Oil Chemists Society*, **77**(5): 527 – 533.
- Johns, A. M.**, Birkinshaw, L. H. y Ledward, D. A. 1989. Catalysts of lipid oxidation in meat products. *Meat Science*, **25**: 209 – 220.
- Kahl, R.**, Weinke, S. y Kappus, H. 1989. Production of reactive oxygen species due to metabolic activation of butylated hidroxyanisole. *Toxicology*, **59**: 179 – 194.
- Kirk, R. S.**, Sawyer, R. y Egan, H. 1999. Composición y análisis de alimentos de Pearson. Compañía Editorial Continental, S. A. de C. V., México, pp. 9 – 46 y 517 - 582.
- 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.
- 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.
- Leung, A. Y.** y Foster, S. 1996. Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics. John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, pp. 364 – 365, 446 – 447, 457 – 459 y 492 – 495.
-

-
- 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 – 99. En: http://ohioline.osu.edu/sc172/sc172_6.html
- 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.
- Lin, C. C.** y Liang, J. H. 2002. Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. *Journal of Food Science*, **67**(2): 530 - 533.
- Livingston, D. J.** y Duane Brown, W. 1981. The chemistry of myoglobin and its reactions. *Food Technology*, **35**(5): 244 – 251.
- 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. Chromatography. En: Encyclopaedia of Food Science. Food Technology and Nutrition, Volumen II, Academic Press, San Diego, California, pp. 954 - 972.
- 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.
- Marini, D.** 1992. HPLC of lipids. En: Food Analysis by HPLC. Marcel Decker. Nueva York, pp. 169 – 240.
- Martínez, M.** 1979. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D. F., México, p. 788.
- 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.
- Mc Clements, 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 – 1282.
-

-
- Medallion Laboratories.** 2004. Reference Daily Intakes/Daily Reference Values. Minneapolis, Minn. E. U. A.
- 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.
- Morrison, R. T.** y Boyd, R. N. 1970. Química orgánica. Fondo Educativo Interamericano S. A., México, pp. 49-50 636-677.
- Nawar, W. W.** 1993. Lípidos. En: Química de los Alimentos. Fennema, O. R. (Ed.) Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España, pp. 157 – 274.
- Niinivaara, F. P.** 1973. Grasas en la carne. En: Valor Nutritivo de la Carne. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España, pp. 59 – 87.
- 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.** y Tauber, F. W. 1984. Processed Meats. AVI Publishing Co. Westport, Westport, Connecticut, pp. 19 - 39 y 351 - 353.
- Pearson, D.** 1976. Técnicas de Laboratorio para el Análisis de Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 39 - 91.
- 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.
-

-
- Perlo, F.** 2000. Emulsiones cárnicas. 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. 253 – 274.
- Products and Technologies.** 2003. Understanding ORAC and the role it can play in ingredient development. *Food Technology*, **57**: 58.
- Quijano, C.** 2003. Teoría del color (Parte II). En: <http://www.octubre.com>.
- Quintero-Salazar, B.** 2001. Empleo de Cultivos Bioprotectores y Nisina sobre la Calidad Microbiológica y Fisicoquímica de Carne de Pollo Almacenada en Condiciones de Abuso de Temperatura. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- Quintín, J.** 1990. Tablas de Valores Nutritivos para Cálculos Dietéticos. Editorial Méndez Cervantes, México, pp. 5, 8 y 23.
- 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. Marcel Dekker, Nueva York, pp. 65 – 93.
- Rose, A. H.** 1969. Metabolismo productor de energía. En: Microbiología Química. Editorial Alhambra, S. A., Madrid, España, pp. 150 - 199.
- 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.
- Russell, A. D.** 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, **71**: 191 – 201.
- 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.
-

-
- Scopes, R. K.** 1994. Analysis-measurement of protein and enzyme activity. En: Protein Purification. Principles and practice. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 44 - 68.
- Shahidi, F.,** Janitha, P. K. y Wanasundara, P. D. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32**(1): 67-103.
- Shikama, K.** 1998. The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: a venerable puzzle. *Chemical Reviews*, **98** (4): 1357 – 1373.
- 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.
- 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.
- Thomas, T. D.,** McKay, L. L. y Morris, H. A. 1985. Lactate metabolism by *Pediococci* isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. **49**(4): 908 – 913.
- Verde, J. R.** 2002. 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.
- 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**: 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.
- 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

Tabla 13. Luminosidad en pastas almacenadas durante 72 horas (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO		
Temperatura ambiente con aire:	0.805	
Extracto de romero (cloroformo)		67.77 ^a (²) ± 5.80 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		70.26 ^a ± 2.29
Control		69.92 ^a ± 2.77
4°:	0.944	
Extracto de romero (cloroformo)		69.90 ^a ± 2.70
Peróxido de hidrógeno		70.67 ^a ± 1.70
Control		69.94 ^a ± 2.73
TIEMPO (HORAS)		
	0.0001	
0		71.88 ^b ± (N D) ⁽⁴⁾
72		67.63 ^a ± 2.02

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

⁽⁴⁾ N D – Desviación estándar no determinada

Tabla 14. Luminosidad en pastas almacenadas durante 72 horas con extracto de romero antioxidante (usando metanol como disolvente, aplicado después de almacenarlo 18 horas a 4°), de salvia (en etanol) y de romero prooxidante (usando metanol como disolvente, aplicado después de almacenarlo 2 días a 4°)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO		
Temperatura ambiente con aire:	0.686	
Extracto de romero (metanol)		70.18 ^{a(2)} ± 3.16 ⁽³⁾
Extracto de salvia (etanol)		69.98 ^a ± 3.33
BHA/BHT		70.48 ^a ± 3.45
Control		70.90 ^a ± 2.57
10°:	0.06	
Extracto de romero (metanol)		74.40 ^a ± 1.62
Extracto de salvia (etanol)		73.47 ^a ± 0.84
BHA/BHT		74.07 ^a ± 1.41
Control		74.41 ^a ± 1.60
4°:	0.0001	
Extracto de romero (metanol) antioxidante		72.45 ^a ± 0.47
Extracto de romero (metanol) prooxidante		76.84 ^b ± 0.76
Extracto de salvia (etanol)		73.04 ^a ± 3.79
BHA/BHT		73.03 ^a ± 3.36
Control		73.68 ^a ± 3.88
TIEMPO (HORAS)		
0	0.699	73.03 ^a ± 2.93
24		72.37 ^a ± 3.51
48		72.58 ^a ± 3.27
72		72.39 ^a ± 2.97

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 15. Luminosidad en pastas almacenadas durante 1 semana (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO		
30° con aire	0.963	
Extracto de salvia (cloroformo)		56.73 ^{a(2)} ± 12.95 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		55.56 ^a ± 14.35
Control		53.91 ^a ± 16.21
Temperatura ambiente:	0.525	
Extracto de salvia (cloroformo)		68.65 ^a ± 1.76
Peróxido de hidrógeno		67.83 ^a ± 0.81
Control		67.23 ^a ± 1.49
4°:	0.676	
Extracto de salvia (cloroformo)		66.65 ^a ± 2.06
Peróxido de hidrógeno		66.90 ^a ± 1.47
Control		65.59 ^a ± 3.30
TIEMPO (HORAS)		
0	0.002	67.93 ^b ± 0.99
168		58.15 ^a ± 11.32

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 16. Valor de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) (mg malonaldehído/kg de pasta) en pastas almacenadas durante 72 horas con romero prooxidante (usando metanol como disolvente, aplicado después de almacenarlo 2 días a 4°)

4°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol) prooxidante	BHA/BHT	Control
0	0.108 ^{A a(1)(3)} ± 0.005 ⁽²⁾	0.108 ^{A a} ± 0.005	0.108 ^{A a} ± 0.005
24	0.195 ^{A a} ± 0.062	0.116 ^{A a} ± 0.014	0.288 ^{A a} ± 0.069
48	3.009 ^{B b} ± 0.730	0.224 ^{A b} ± 0.030	3.708 ^{B b} ± 0.902
72	7.068 ^{C c} ± 0.557	0.679 ^{A c} ± 0.019	4.170 ^{B b} ± 0.023
Media	2.595 ^{B(3)} ± 3.049	0.282 ^A ± 0.250	2.068 ^{AB} ± 2.037

⁽¹⁾ Media de 2 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 17. Valor de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) (mg malonaldehído/kg de pasta) en pastas almacenadas durante 1 semana (cloroformo como disolvente)

30° con aire			
Tiempo (horas)	Salvia (cloroformo)	Peróxido de hidrógeno	Control
0	0.123 ^{Aa(1)(3)} ± 0.017(2)	0.123 ^{Aa} ± 0.017	0.123 ^{Aa} ± 0.017
24	1.156 ^{Bb} ± 0.072	0.281 ^{Aa} ± 0.065	0.381 ^{Aa} ± 0.036
48	8.196 ^{Cc} ± 0.343	1.217 ^{Ab} ± 0.137	4.336 ^{Bb} ± 0.115
72	11.824 ^{Cd} ± 0.268	1.769 ^{Ab} ± 0.315	8.765 ^{Bc} ± 0.134
168	15.425 ^{Be} ± 0.064	8.204 ^{Ac} ± 0.082	17.812 ^{Cd} ± 0.130
Media	7.345 ^{B(3)} ± 6.265	2.319 ^A ± 3.168	6.283 ^B ± 6.922

Temperatura ambiente			
Tiempo (horas)	Salvia (cloroformo)	Peróxido de hidrógeno	Control
0	0.123 ^{Aa} ± 0.017	0.123 ^{Aa} ± 0.017	0.123 ^{Ab} ± 0.017
24	0.215 ^{Aa} ± 0.038	0.148 ^{Aa} ± 0.019	0.173 ^{Ab} ± 0.008
48	0.164 ^{Ba} ± 0.003	0.082 ^{Aa} ± 0.015	0.065 ^{Aa} ± 0.001
72	0.388 ^{Ab} ± 0.042	0.437 ^{Aa} ± 0.234	0.289 ^{Ab} ± 0.064
168	0.716 ^{Ac} ± 0.052	0.390 ^{Aa} ± 0.234	0.140 ^{Ab} ± 0.082
Media	0.321 ^A ± 0.230	0.236 ^A ± 0.190	0.158 ^A ± 0.086

4°			
Tiempo (horas)	Salvia (cloroformo)	Peróxido de hidrógeno	Control
0	0.123 ^{Ab} ± 0.017	0.123 ^{Ab} ± 0.017	0.123 ^{Ab} ± 0.017
24	0.187 ^{Ab} ± 0.016	0.191 ^{Ab} ± 0.020	0.191 ^{Ab} ± 0.046
48	0.058 ^{Aa} ± 0.012	0.027 ^{Aa} ± 0.007	0.031 ^{Aa} ± 0.019
72	0.204 ^{Ab} ± 0.005	0.199 ^{Ab} ± 0.003	0.165 ^{Ab} ± 0.047
168	0.139 ^{Ab} ± 0.060	0.479 ^{Ac} ± 0.083	0.206 ^{Ab} ± 0.016
Media	0.142 ^A ± 0.058	0.204 ^A ± 0.161	0.143 ^A ± 0.070

(1) Media de 2 mediciones. (2) Desviación estándar. (3) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 18. Humedad (%) en pastas almacenadas durante 1 semana (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.554	
Extracto de salvia (cloroformo)		64.285 ^{a(2)} ± 2.177
Peróxido de hidrógeno		65.160 ^a ± 5.276
Control		63.862 ^a ± 4.549
TEMPERATURA	0.003	
30° con aire		61.683 ^a ± 5.698
Ambiente		66.086 ^b ± 1.783
4°		65.538 ^b ± 2.451
TIEMPO (HORAS)	0.022	
0		65.665 ^a ± 0.190
168		63.207 ^a ± 5.644

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 19. Cromaticidad en pastas almacenadas durante 72 horas (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO		
Temperatura ambiente con aire:	0.633	
Extracto de romero (cloroformo)		18.39 ^{a(2)} ± 0 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		17.21 ^a ± 1.12
Control		17.27 ^a ± 1.64
4°:	0.883	
Extracto de romero (cloroformo)		17.98 ^a ± 0.58
Peróxido de hidrógeno		17.57 ^a ± 0.59
Control		17.62 ^a ± 1.08
TIEMPO (HORAS)		
	0.005	
0		18.39 ^b ± (N D) ⁽⁴⁾
72		17.20 ^a ± 0.80

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

⁽⁴⁾ N D – Desviación estándar no determinada

Tabla 20. Cromaticidad en pastas almacenadas durante 72 horas con extracto de romero antioxidante (usando metanol como disolvente, aplicado después de almacenarlo 18 horas a 4°), de salvia (en etanol) y de romero prooxidante (usando metanol como disolvente, aplicado después de almacenarlo 2 días a 4°)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO		
Temperatura ambiente con aire:	0.064	
Extracto de romero (metanol)		15.70 ^{a(2)} ± 0.84 ⁽³⁾
Extracto de salvia (etanol)		15.57 ^a ± 1.15
BHA/BHT		15.11 ^a ± 1.06
Control		15.07 ^a ± 0.82
10°:	0.042	
Extracto de romero (metanol)		15.85 ^a ± 0.74
Extracto de salvia (etanol)		15.74 ^a ± 0.74
BHA/BHT		15.45 ^a ± 0.87
Control		15.35 ^a ± 0.95
4°:	0.0001	
Extracto de romero (metanol) antioxidante		16.53 ^c ± 0.65
Extracto de romero (metanol) prooxidante		13.94 ^a ± 0.33
Extracto de salvia (etanol)		15.83 ^{bc} ± 1.32
BHA/BHT		15.41 ^b ± 1.55
Control		15.18 ^b ± 1.67
TIEMPO (HORAS)		
0	0.0001	15.89 ^c ± 0.95
24		15.53 ^{bc} ± 1.17
48		15.20 ^{ab} ± 1.08
72		14.89 ^a ± 0.92

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 21. Cromaticidad en pastas almacenadas durante 1 semana (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO		
30° con aire	0.233	
Extracto de salvia (cloroformo)		17.58 ^{a(2)} ± 1.48 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		18.37 ^a ± 0.60
Control		18.40 ^a ± 0.65
Temperatura ambiente:	0.683	
Extracto de salvia (cloroformo)		16.93 ^a ± 1.09
Peróxido de hidrógeno		16.78 ^a ± 2.38
Control		17.36 ^a ± 1.72
4°:	0.535	
Extracto de salvia (cloroformo)		18.22 ^a ± 0.82
Peróxido de hidrógeno		16.10 ^a ± 2.36
Control		16.36 ^a ± 3.26
TIEMPO (HORAS)		
0	0.0001	18.82 ^b ± 0.47
168		16.36 ^a ± 1.77

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 22. Incremento en la tonalidad en pastas almacenadas durante 72 horas (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO		
Temperatura ambiente con aire:	0.997	
Extracto de romero (cloroformo)		7.15 ^{a(2)} ± 10.11 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		7.15 ^a ± 10.11
Control		7.29 ^a ± 11.15
4°:	0.971	
Extracto de romero (cloroformo)		2.76 ^a ± 3.91
Peróxido de hidrógeno		3.88 ^a ± 5.48
Control		3.11 ^a ± 4.40
TIEMPO (HORAS)		
0	0.0001	0 ^a
72		10.65 ^b ± 4.62

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 23. Incremento en la tonalidad en pastas almacenadas durante 72 horas con extracto de romero antioxidante (usando metanol como disolvente, aplicado después de almacenarlo 18 horas a 4°), de salvia (en etanol) y de romero prooxidante (usando metanol como disolvente, aplicado después de almacenarlo 2 días a 4°)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO		
Temperatura ambiente con aire:	0.765	
Extracto de romero (metanol)		17.66 ^{a(2)} ± 46.29 ⁽³⁾
Extracto de salvia (etanol)		30.59 ^a ± 61.84
BHA/BHT		31.47 ^a ± 60.31
Control		32.83 ^a ± 61.83
10°:	0.799	
Extracto de romero (metanol)		3.15 ^a ± 3.20
Extracto de salvia (etanol)		7.14 ^a ± 33.97
BHA/BHT		6.79 ^a ± 26.13
Control		7.40 ^a ± 26.24
4°:	0.028	
Extracto de romero (metanol) antioxidante		3.06 ^a ± 3.61
Extracto de romero (metanol) prooxidante		5.09 ^a ± 3.65
Extracto de salvia (etanol)		3.38 ^a ± 2.88
BHA/BHT		3.26 ^a ± 4.14
Control		3.70 ^a ± 4.50
TIEMPO (HORAS)		
	0.0001	
0		0 ^a
24		2.787 ^a ± 3.55
48		22.28 ^b ± 49.37
72		33.26 ^b ± 59.32

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 24. Valor de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) (mg malonaldehído/kg de pasta) en pastas almacenadas durante 72 horas con extracto de romero antioxidante (usando metanol como disolvente, aplicado después de almacenarlo 18 horas a 4°)

Temperatura ambiente con aire			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	0.124 ^{A a(1)(3)} ± 0.002 ⁽²⁾	0.124 ^{A a} ± 0.002	0.124 ^{A a} ± 0.002
24	1.172 ^{A ab} ± 0.309	0.106 ^{A a} ± 0.053	3.367 ^{B bc} ± 0.351
48	2.832 ^{B c} ± 0.329	0.099 ^{A a} ± 0.009	5.106 ^{B c} ± 0.717
72	1.572 ^{AB b} ± 0.282	0.131 ^{A a} ± 0.108	2.895 ^{B b} ± 0.356
Media	1.425 ^{AB(3)} ± 1.055	0.115 ^A ± 0.047	2.873 ^B ± 1.940
10°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	0.124 ^{A a(1)(3)} ± 0.002 ⁽²⁾	0.124 ^{A a} ± 0.002	0.124 ^{A a} ± 0.002
24	0.302 ^{B a} ± 0.012	0.140 ^{A a} ± 0.035	0.390 ^{B a} ± 0.004
48	0.055 ^{A a} ± 0.029	0.146 ^{A a} ± 0.072	1.231 ^{B b} ± 0.026
72	0.663 ^{A b} ± 0.144	0.081 ^{A a} ± 0.086	1.974 ^{B c} ± 0.251
Media	0.286 ^{AB(3)} ± 0.258	0.122 ^A ± 0.052	0.929 ^B ± 0.784
4°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol) antioxidante	BHA/BHT	Control
0	0.214 ^{A a(1)(3)} ± 0.005 ⁽²⁾	0.214 ^{A a} ± 0.005	0.214 ^{A a} ± 0.005
24	0.695 ^{B b} ± 0.022	0.201 ^{A a} ± 0.031	1.722 ^{C b} ± 0.040
48	1.392 ^{B c} ± 0.002	0.312 ^{A a} ± 0.021	3.654 ^{C c} ± 0.093
72	1.139 ^{A d} ± 0.014	0.154 ^{A a} ± 0.079	3.467 ^{B c} ± 0.304
Media	0.860 ^{B(3)} ± 0.480	0.220 ^A ± 0.070	2.264 ^B ± 1.505

(1) Media de 2 mediciones. (2) Desviación estándar. (3) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 25. Valor de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) (mg malonaldehído/kg de pasta) en pastas almacenadas durante 72 horas (etanol como disolvente)

Temperatura ambiente con aire			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	0.180 ^{A a(1)(3)} ± 0.001 ⁽²⁾	0.178 ^{A a} ± 0.001	0.179 ^{A a} ± 0.002
24	5.452 ^{B b} ± 0.382	0.198 ^{A a} ± 0.041	6.650 ^{B b} ± 0.052
48	6.758 ^{B c} ± 0.234	0.359 ^{A b} ± 0.007	8.939 ^{B b} ± 0.827
72	5.533 ^{AB b} ± 0.004	0.303 ^{A ab} ± 0.046	6.595 ^{B b} ± 1.656
Media	4.481 ^{B(3)} ± 2.716	0.259 ^A ± 0.083	5.591 ^B ± 3.559
10°			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	0.180 ^{A a(1)(3)} ± 0.001 ⁽²⁾	0.178 ^{A a} ± 0.001	0.179 ^{A a} ± 0.002
24	2.037 ^{A b} ± 0.562	0.235 ^{A a} ± 0.318	2.973 ^{A ab} ± 1.526
48	3.470 ^{B bc} ± 0.401	1.221 ^{A b} ± 0.007	4.379 ^{B ab} ± 0.258
72	4.101 ^{AB c} ± 0.158	1.411 ^{A b} ± 0.170	7.927 ^{B b} ± 1.510
Media	2.447 ^{AB(3)} ± 1.633	0.761 ^A ± 0.613	3.864 ^B ± 3.092
4°			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	0.214 ^{A a(1)(3)} ± 0.005 ⁽²⁾	0.214 ^{A a} ± 0.005	0.214 ^{A a} ± 0.005
24	0.646 ^{B b} ± 0.065	0.201 ^{A a} ± 0.031	1.722 ^{C b} ± 0.040
48	1.979 ^{B c} ± 0.032	0.312 ^{A a} ± 0.021	3.654 ^{C c} ± 0.093
72	2.937 ^{B d} ± 0.034	0.154 ^{A a} ± 0.079	3.467 ^{B c} ± 0.304
Media	1.444 ^{AB(3)} ± 1.155	0.220 ^A ± 0.070	2.264 ^B ± 1.505

(1) Media de 2 mediciones. (2) Desviación estándar. (3) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 26. Incremento en la tonalidad en pastas almacenadas durante 1 semana (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO		
30° con aire	0.395	
Extracto de salvia (cloroformo)		5 ^a (2) ± 5.78 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		1.81 ^a ± 2.10
Control		1.80 ^a ± 2.08
Temperatura ambiente:	0.908	
Extracto de salvia (cloroformo)		8.20 ^a ± 9.48
Peróxido de hidrógeno		6.72 ^a ± 6.68
Control		6.62 ^a ± 7.64
4°:	0.718	
Extracto de salvia (cloroformo)		3.80 ^a ± 4.64
Peróxido de hidrógeno		4.16 ^a ± 4.97
Control		1.90 ^a ± 2.30
TIEMPO (HORAS)		
0	0.0001	0 ^a
168		8.63 ^b ± 4.60

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 27. Actividad de agua en pastas almacenadas durante 1 semana (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.0001	
Extracto de salvia (cloroformo)		0.927 ^{b(2)} ± 0.055 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		0.937 ^c ± 0.047
Control		0.920 ^a ± 0.076
TEMPERATURA	0.0001	
30° con aire		0.875 ^a ± 0.080
Ambiente		0.955 ^b ± 0.084
4°		0.954 ^b ± 0.081
TIEMPO (HORAS)	0.0001	
0		0.948 ^b ± 0.001
168		0.928 ^a ± 0.080

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 28. Concentración de proteína (%) en pastas almacenadas durante 72 horas (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan)(1)
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.529	
Extracto de romero (cloroformo)		9.989 ^{a(2)} ± 0.483 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		9.715 ^a ± 0.991
Control		7.922 ^a ± 4.621
TEMPERATURA	0.284	
Ambiente con aire		10.109 ^a ± 0.473
4°		8.309 ^a ± 3.660
TIEMPO (HORAS)	0.345	
0		9.995 ^a (N D) ⁽⁴⁾
72		8.422 ^a ± 3.752
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.102	
Extracto de salvia (cloroformo) primera repetición		9.401 ^a ± 1.052
Peróxido de hidrógeno		8.586 ^a ± 0.342
Control		9.355 ^a ± 1.082
TEMPERATURA	0.408	
Ambiente con aire		9.266 ^a ± 1.240
Ambiente		9.091 ^a ± 0.748
4°		8.867 ^a ± 0.751
TIEMPO (HORAS)	0.033	
0		8.590 ^a (N D)
72		9.501 ^a ± 1.049
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE		
Extracto de salvia (cloroformo) segunda repetición	0.115	11.088 ^a ± 0.362
Peróxido de hidrógeno		10.619 ^a ± 0.972
Control		11.533 ^a ± 0.724
TEMPERATURA	0.172	
Ambiente con aire		11.517 ^a ± 0.723
Ambiente		11.006 ^a ± 0.467
4°		10.717 ^a ± 0.983
TIEMPO (HORAS)	0.479	
0		11.200 ^a (N D)
72		10.960 ^a ± 1.132

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

⁽⁴⁾ N D – Desviación estándar no determinada

Tabla 29. Concentración de proteína (%) en pastas almacenadas durante 72 horas (metanol y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.029	
Extracto de romero (metanol)		11.088 ^{a(2)} ± 1.384 ⁽³⁾
Extracto de salvia (etanol)		11.739 ^a ± 1.254
BHA/BHT		11.698 ^a ± 1.131
Control		11.640 ^a ± 1.012
TEMPERATURA	0.0001	
Ambiente con aire		12.036 ^b ± 1.448
10°		11.841 ^b ± 0.627
4°		10.812 ^a ± 0.958
TIEMPO (HORAS)	0.0001	
0		11.996 ^b ± 1.017
72		11.094 ^a ± 1.218

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 30. Concentración de proteína (%) en pastas almacenadas durante 1 semana (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.002	
Extracto de salvia (cloroformo)		12.013 ^{a(2)} ± 2.645 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		11.993 ^a ± 1.899
Control		13.253 ^b ± 4.866
TEMPERATURA	0.0001	
30° con aire		15.221 ^b ± 4.530
Ambiente		10.787 ^a ± 1.136
4°		11.252 ^a ± 0.811
TIEMPO (HORAS)	0.0001	
0		11.654 ^a ± 0.649
168		13.186 ^b ± 4.610

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 31. Humedad (%) en pastas almacenadas durante 72 horas (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.44	
Extracto de romero (cloroformo)		65.912 ^a ⁽²⁾ ± 1.427 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		66.715 ^a ± 3.155
Control		64.840 ^a ± 0.635
TEMPERATURA	0.187	
Ambiente con aire		64.996 ^a ± 0.465
4°		66.648 ^a ± 2.646
TIEMPO (HORAS)	0.469	
0		65.39 ^a (N D) ⁽⁴⁾
72		66.255 ^a ± 2.899
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.101	
Extracto de salvia (cloroformo) primera repetición		68.943 ^a ± 0.654
Peróxido de hidrógeno		70.462 ^a ± 2.358
Control		68.464 ^a ± 0.019
TEMPERATURA	0.634	
Ambiente con aire		69.217 ^a ± 1.285
Ambiente		70.034 ^a ± 2.539
4°		69.393 ^a ± 1.654
TIEMPO (HORAS)	0.012	
0		68.450 ^a (N D)
72		70.602 ^a ± 1.970
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE		
Extracto de salvia (cloroformo) segunda repetición	0.043	66.620 ^a ± 1.295
Peróxido de hidrógeno		68.926 ^a ± 2.683
Control		66.888 ^a ± 0.428
TEMPERATURA	0.491	
Ambiente con aire		66.860 ^a ± 1.764
Ambiente		67.844 ^a ± 2.163
4°		67.730 ^a ± 2.095
TIEMPO (HORAS)	0.029	
0		66.590 ^a (N D)
72		67.366 ^a ± 2.504

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

⁽⁴⁾ N D – Desviación estándar no determinada

Tabla 32. Humedad (%) en pastas almacenadas durante 72 horas (metanol y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.91	
Extracto de romero (metanol)		66.256 ^{a(2)} ± 0.956 ⁽³⁾
Extracto de salvia (etanol)		66.094 ^a ± 1.147
BHA/BHT		66.141 ^a ± 1.106
Control		66.232 ^a ± 1.083
TEMPERATURA	0.0001	
Ambiente con aire		66.092 ^a ± 1.198
10°		66.954 ^b ± 0.311
4°		65.606 ^a ± 0.947
TIEMPO (HORAS)	0.599	
0		66.243 ^a ± 1.084
72		66.119 ^a ± 1.048

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 33. Cenizas (%) en pastas almacenadas durante 72 horas (metanol y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.154	
Extracto de romero (metanol)		4.299 ^{a(2)} ± 0.169 ⁽³⁾
Extracto de salvia (etanol)		4.167 ^a ± 0.257
BHA/BHT		4.190 ^a ± 0.224
Control		4.212 ^a ± 0.225
TEMPERATURA	0.04	
Ambiente con aire		4.219 ^a ± 0.265
10°		4.140 ^a ± 0.244
4°		4.278 ^a ± 0.121
TIEMPO (HORAS)	0.77	
0		4.222 ^a ± 0.238
72		4.210 ^a ± 0.209

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 34. Cenizas (%) en pastas almacenadas durante 1 semana (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.014	
Extracto de salvia (cloroformo)		4.345 ^a (²) ± 0.064 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		4.177 ^a ± 0.296
Control		4.318 ^a ± 0.094
TEMPERATURA	0.452	
30° con aire		4.281 ^a ± 0.118
Ambiente		4.244 ^a ± 0.256
4°		4.315 ^a ± 0.191
TIEMPO (HORAS)	0.001	
0		4.370 ^b ± 0.020
168		4.191 ^a ± 0.244

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 35. Grasa (%) en pastas almacenadas durante 72 horas (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.728	
Extracto de romero (cloroformo)		50.795 ^{a(2)} ± 22.029 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		52.923 ^a ± 24.332
Control		47.222 ^a ± 24.950
TEMPERATURA	0.092	
Ambiente con aire		55.951 ^a ± 16.291
4°		44.675 ^a ± 26.296
TIEMPO (HORAS)	0.0001	
0		68.615 ^b (N D) ⁽⁴⁾
72		32.012 ^a ± 15.144
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.649	
Extracto de salvia (cloroformo) primera repetición		36.216 ^a ± 12.246
Peróxido de hidrógeno		40.176 ^a ± 2.932
Control		30.296 ^a ± 17.407
TEMPERATURA	0.352	
Ambiente con aire		39.858 ^a ± 3.173
Ambiente		41.499 ^a ± 1.337
4°		32.253 ^a ± 13.896
TIEMPO (HORAS)	0.002	
0		42.605 ^a (N D)
72		31.530 ^a ± 11.695
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.61	
Extracto de salvia (cloroformo) segunda repetición		38.986 ^a ± 6.972
Peróxido de hidrógeno		41.039 ^a ± 5.021
Control		40.387 ^a ± 2.964
TEMPERATURA	0.051	
Ambiente con aire		42.946 ^a ± 2.649
Ambiente		40.264 ^a ± 3.902
4°		37.202 ^a ± 6.570
TIEMPO (HORAS)	0.004	
0		43.118 ^b ± 1.541
72		37.156 ^a ± 5.559

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

⁽⁴⁾ N D – Desviación estándar no determinada

Tabla 36. Grasa (%) en pastas almacenadas durante 72 horas (metanol y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.097	
Extracto de romero (metanol)		39.923 ^a (2) ± 4.020 (3)
Extracto de salvia (etanol)		37.158 ^a ± 4.181
BHA/BHT		38.300 ^a ± 4.280
Control		38.188 ^a ± 4.191
TEMPERATURA	0.0001	
Ambiente con aire		39.121 ^b ± 4.565
10°		40.032 ^b ± 3.801
4°		36.220 ^a ± 3.309
TIEMPO (HORAS)	0.001	
0		39.722 ^b ± 3.529
72		37.014 ^a ± 4.460

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 37. Grasa (%) en pastas almacenadas durante 1 semana (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.288	
Extracto de salvia (cloroformo)		49.300 ^a ± 8.325
Peróxido de hidrógeno		50.201 ^a ± 8.483
Control		49.756 ^a ± 7.418
TEMPERATURA	0.0001	
30° con aire		46.222 ^a ± 10.562
Ambiente		50.979 ^b ± 5.737
4°		52.056 ^b ± 5.590
TIEMPO (HORAS)	0.0001	
0		56.210 ^b ± 0.802
168		43.295 ^a ± 6.194

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 38. Actividad de agua en pastas almacenadas durante 72 horas (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.707	
Extracto de romero (cloroformo)		0.959 ^a (²) ± 0.004 (³)
Peróxido de hidrógeno		0.961 ^a ± 0.004
Control		0.963 ^a ± 0.007
TEMPERATURA	0.289	
Ambiente con aire		0.959 ^a ± 0.005
4°		0.963 ^a ± 0.004
TIEMPO (HORAS)	0.885	
0		0.961 ^a ± 0.004
72		0.961 ^a ± 0.005
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE	0.551	
Extracto de salvia (cloroformo) primera repetición		0.956 ^a ± 0.011
Peróxido de hidrógeno		0.959 ^a ± 0.002
Control		0.957 ^a ± 0.002
TEMPERATURA	0.247	
Ambiente con aire		0.953 ^a ± 0.012
Ambiente		0.958 ^a ± 0.001
4°		0.957 ^a ± 0.004
TIEMPO (HORAS)	0.634	
0		0.959 ^a (N D) ⁽⁴⁾
72		0.957 ^a ± 0.010
ANTIOXIDANTE O PROXIDANTE		
Extracto de salvia (cloroformo) segunda repetición	0.163	0.960 ^a ± 0.005
Peróxido de hidrógeno		0.964 ^a ± 0.004
Control		0.964 ^a ± 0.010
TEMPERATURA	0.742	
Ambiente con aire		0.961 ^a ± 0.007
Ambiente		0.963 ^a ± 0.006
4°		0.962 ^a ± 0.008
TIEMPO (HORAS)	0.0001	
0		0.968 ^b ± 0.004
72		0.957 ^a ± 0.004

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

⁽⁴⁾ N D – Desviación estándar no determinada

Tabla 39. Actividad de agua en pastas almacenadas durante 72 horas (metanol y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.434	
Extracto de romero (metanol)		0.955 ^a ⁽²⁾ ± 0.007 ⁽³⁾
Extracto de salvia (etanol)		0.954 ^a ± 0.003
BHA/BHT		0.954 ^a ± 0.004
Control		0.953 ^a ± 0.004
TEMPERATURA	0.05	
Ambiente con aire		0.955 ^a ± 0.005
10°		0.955 ^a ± 0.006
4°		0.952 ^a ± 0.002
TIEMPO (HORAS)	0.004	
0		0.955 ^b ± 0.005
72		0.952 ^a ± 0.004

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 40. pH en pastas almacenadas durante 72 horas (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO	0.427	
Temperatura ambiente con aire:		
Extracto de romero (cloroformo)		6.060 ^{a(2)} ± 0 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		6.175 ^a ± 0.162
Control		6.140 ^a ± 0.113
4°:		
Extracto de romero (cloroformo)		5.925 ^a ± 0.190
Peróxido de hidrógeno		5.965 ^a ± 0.134
Control		5.980 ^a ± 0.113
TIEMPO (HORAS)	0.652	
0		6.060 ^a ± (N D) ⁽⁴⁾
72		6.021 ^a ± 0.202
TRATAMIENTO	0.642	
Temperatura ambiente con aire:		
Extracto de salvia (cloroformo) segunda repetición		5.865 ^a ± 0.304
Peróxido de hidrógeno		5.620 ^a ± 0.042
Control		6.055 ^a ± 0.572
Temperatura ambiente:		
Extracto de salvia (cloroformo) segunda repetición		5.650 ^a ± 0
Peróxido de hidrógeno		5.570 ^a ± 0.113
Control		5.630 ^a ± 0.028
4°:		
Extracto de salvia (cloroformo) segunda repetición		5.775 ^a ± 0.176
Peróxido de hidrógeno		5.785 ^a ± 0.190
Control		5.780 ^a ± 0.183
TIEMPO (HORAS)	0.07	
0		5.650 ^a ± (N D)
72		5.845 ^a ± 0.302

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

⁽⁴⁾ N D – Desviación estándar no determinada

Tabla 41. Valor de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) (mg malonaldehído/kg de pasta) en pastas almacenadas durante 72 horas (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO	0.241	
Temperatura ambiente con aire:		
Extracto de romero (cloroformo)		0.394 ^a ⁽²⁾ ± 0.303 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		0.751 ^a ± 0.561
Control		0.910 ^a ± 0.829
4°:		
Extracto de romero (cloroformo)		0.143 ^a ± 0.061
Peróxido de hidrógeno		0.316 ^a ± 0.186
Control		0.701 ^a ± 0.517
TIEMPO (HORAS)	0.005	
0		0.108 ^a (N D) ⁽⁴⁾
24		0.368 ^{ab} ± 0.158
48		0.650 ^{ab} ± 0.380
72		1.018 ^b ± 0.686
TRATAMIENTO	0.373	
Temperatura ambiente con aire:		
Extracto de romero seco, recién obtenido (cloroformo)		0.688 ^a ± 0.805
Control		1.126 ^a ± 1.017
4°:		
Extracto de romero seco, recién obtenido (cloroformo)		0.223 ^a ± 0.031
Control		0.310 ^a ± 0.166
TIEMPO (HORAS)	0.12	
0		0.229 ^a (N D)
24		0.397 ^a ± 0.348
96		1.135 ^a ± 0.954

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

⁽⁴⁾ N D – Desviación estándar no determinada

Tabla 42. pH en pastas almacenadas durante 72 horas con extracto de romero antioxidante (usando metanol como disolvente, aplicado después de almacenarlo 18 horas a 4°)

Temperatura ambiente con aire				
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	5.660 ^{A c (1)(3)} ± 0.056 ⁽²⁾	5.615 ^{A c} ± 0.007	5.615 ^{A c} ± 0.005	5.595 ^{A c} ± 0.005
24	4.920 ^{A ab} ± 0.084	4.910 ^{A b} ± 0	4.870 ^{A ab} ± 0.011	4.885 ^{A b} ± 0.051
48	4.980 ^{A b} ± 0.014	4.925 ^{A b} ± 0.007	4.890 ^{A b} ± 0.057	4.760 ^{A b} ± 0
72	4.675 ^{A a} ± 0.063	4.675 ^{A a} ± 0.007	4.605 ^{A a} ± 0.075	4.560 ^{A a} ± 0.011
Media	5.058 ^A ± 0.393	5.031 ^A ± 0.375	4.995 ^A ± 0.403	4.950 ^A ± 0.417

10°				
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	5.425 ^{A b(1)(3)} ± 0.007 ⁽²⁾	5.420 ^{A b} ± 0	5.475 ^{B c} ± 0.005	5.435 ^{A b} ± 0.005
24	5.355 ^{A b} ± 0.007	5.355 ^{A b} ± 0.007	5.355 ^{A b} ± 0.017	5.275 ^{A ab} ± 0.040
48	5.170 ^{A a} ± 0.014	5.170 ^{A a} ± 0.014	5.190 ^{A a} ± 0.042	5.125 ^{A a} ± 0.035
72	5.160 ^{A a} ± 0.056	5.160 ^{A a} ± 0.056	5.095 ^{A a} ± 0.007	5.075 ^{A a} ± 0.063
Media	5.277 ^A ± 0.125	5.276 ^A ± 0.123	5.278 ^A ± 0.152	5.227 ^A ± 0.154

4°				
Tiempo (horas)	Romero (metanol) antioxidante	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	6.175 ^{A b(1)(3)} ± 0.035 ⁽²⁾	6.150 ^{A b} ± 0.071	6.060 ^{A a} ± 0.028	6.145 ^{A b} ± 0.007
24	5.895 ^{A a} ± 0.077	5.935 ^{A a} ± 0.021	5.885 ^{A a} ± 0.007	5.910 ^{A a} ± 0
48	6.120 ^{A ab} ± 0.042	6.100 ^{A ab} ± 0.042	6.150 ^{A a} ± 0.028	6.160 ^{A b} ± 0.014
72	5.910 ^{A a} ± 0.014	5.945 ^{A a} ± 0.007	5.920 ^{A a} ± 0.127	5.940 ^{A a} ± 0.070
Media	6.025 ^A ± 0.137	6.032 ^A ± 0.105	6.003 ^A ± 0.124	6.038 ^A ± 0.125

⁽¹⁾ Media de 2 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 43. Concentración de ácido acético (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 72 horas (metanol y etanol como disolventes)

Temperatura ambiente con aire				
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	130.58 ⁽¹⁾ (N D) ⁽²⁾⁽⁴⁾	143.85 (N D)	130.04 (N D)	130.38 (N D)
24	108.01 (N D)	144.84 (N D)	110.55 (N D)	134.18 (N D)
48	124.52 (N D)	146.96 (N D)	119.27 (N D)	143.43 (N D)
72	222.55 ± 19.58	229.22 ± 24.76	231.05 ± 8.05	220.61 ± 31.20
Media	179.04 ^{A(3)} ± 55.18	187.22 ^A ± 48.61	175.50 ^A ± 61.37	178.30 ^A ± 50.54

10°				
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	186.98 ± 16.13	163.23 ± 12.21	174.10 ± 10.90	182.46 ± 9.03
24	178.87 (N D)	156.50 (N D)	147.72 (N D)	159.42 (N D)
48	200.07 (N D)	155.49 (N D)	206.83 (N D)	163.17 (N D)
72	213.04 (N D)	177.77 (N D)	215.63 (N D)	167.70 (N D)
Media	188.62 ^A ± 16.21	163.25 ^A ± 10.79	182.08 ^A ± 25.87	172.94 ^A ± 12.17

4°				
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	68.97 ± 2.25	73.28 ± 5.86	73.93 ± 4.16	66.29 ± 2.21
24	79.53 ± 16.82	69.70 ± 26.06	83.14 ± 11.65	76.13 ± 9.85
48	81.65 ± 6.74	79.84 ± 8.48	84.67 ± 4.02	80.48 ± 11.81
72	72.35 ± 1.85	89.10 ± 18.38	89.31 ± 2.95	84.22 ± 1.13
Media	75.63 ^A ± 9.50	77.98 ^A ± 16.24	82.76 ^A ± 8.14	76.78 ^A ± 9.65

⁽¹⁾ Media de 5 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes). ⁽⁴⁾ N D – Desviación estándar no determinada.

Tabla 44. Concentración de ácido láctico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 72 horas (metanol y etanol como disolventes)

Temperatura ambiente con aire				
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	156.14 ^{c(1)} ± 4.57 ⁽²⁾	160.42 ^c ± 8.12	154.46 ^c ± 1.70	155.84 ^c ± 15.70
24	138.10 ^b ± 2.05	136.64 ^b ± 4.14	140.40 ^b ± 2.15	136.27 ^b ± 2.19
48	139.13 ^b ± 9.01	133.17 ^b ± 8.34	131.29 ^b ± 8.31	129.73 ^b ± 2.58
72	54.75 ^a ± 2.53	56.50 ^a ± 3	55.66 ^a ± 5.06	56.85 ^a ± 5.83
Media	122.03 ^{A(3)} ± 40.81	121.71 ^A ± 40.48	120.45 ^A ± 39.57	119.67 ^A ± 39.28
10°				
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	401.29 ^c ± 58.49	392.11 ^c ± 24.90	390.29 ^b ± 76.50	386.01 ^a ± 64.69
24	297.66 ^b ± 6.198	337.90 ^b ± 43.31	352.25 ^b ± 57.18	364.90 ^a ± 23.67
48	267.74 ^b ± 35.61	295.55 ^b ± 14.77	253.08 ^a ± 28.93	257.84 ^b ± 19.35
72	199.62 ^a ± 4.87	188.34 ^a ± 6.16	210.51 ^a ± 8.62	199.82 ^b ± 5.72
Media	291.58 ^A ± 80.94	303.47 ^A ± 80.39	301.50 ^A ± 87.56	302.07 ^A ± 85.19
4°				
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	50.12 ^c ± 1.03	50.35 ^b ± 1.98	51.78 ^a ± 4.10	50.24 ^b ± 2.87
24	34.90 ^b ± 4.13	42.82 ^{ab} ± 5.19	40.09 ^a ± 14.55	46.36 ^b ± 6.80
48	37.66 ^b ± 2.50	42.30 ^{ab} ± 8.53	39.45 ^a ± 4.69	39.80 ^{ab} ± 8.68
72	27.49 ^A ^a ± 1.60	37.26 ^{Ba} ^a ± 1.48	36.60 ^B ^a ± 1.79	34.62 ^B ^a ± 0.72
Media	37.54 ^A ± 8.70	43.18 ^A ± 6.73	41.98 ^A ± 9.43	42.75 ^A ± 8.08

(1) Media de 5 mediciones. (2) Desviación estándar. (3) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Nota: los tratamientos donde no aparecen superíndices en letras mayúsculas no son significativamente diferentes.

Tabla 45. pH en pastas almacenadas durante 72 horas con extracto de romero prooxidante (usando metanol como disolvente, aplicado después de almacenarlo 2 días a 4°)

4°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol) prooxidante	BHA/BHT	Control
0	5.495 ^{A a (1)(3)} ± 0.070 ⁽²⁾	5.555 ^{B a} ± 0.007	5.585 ^{B a} ± 0.007
24	5.830 ^{A b} ± 0.014	5.800 ^{A b} ± 0.042	5.830 ^{A b} ± 0.028
48	5.930 ^{A c} ± 0.028	5.910 ^{A c} ± 0.014	5.865 ^{A bc} ± 0.021
72	5.940 ^{A c} ± 0.014	6 ^{A c} ± 0.014	5.980 ^{A c} ± 0.042
Media	5.798 ^A ± 0.193	5.816 ^A ± 0.179	5.815 ^A ± 0.155

(1) Media de 2 mediciones. (2) Desviación estándar. (3) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 46. pH en pastas almacenadas durante 1 semana (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO	0.0001	
30° con aire:		
Extracto de salvia (cloroformo)		5.342 ^{b(2)} ± 0.292 ⁽³⁾
Peróxido de hidrógeno		5.932 ^e ± 0.390
Control		5.380 ^b ± 0.248
Temperatura ambiente:		
Extracto de salvia (cloroformo)		5.242 ^a ± 0.407
Peróxido de hidrógeno		5.242 ^a ± 0.408
Control		5.225 ^a ± 0.428
4°:		
Extracto de salvia (cloroformo)		5.697 ^d ± 0.120
Peróxido de hidrógeno		5.577 ^c ± 0.026
Control		5.672 ^d ± 0.089
TIEMPO (HORAS)	0.0001	
0		5.595 ^b ± 0.005
168		5.363 ^a ± 0.488

(1) Superíndices iguales no son significativamente diferentes. (2) Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. (3) Desviación estándar.

Tabla 47. Areas obtenidas para ácido mirístico

Concentración de ácido mirístico (mg/ml)	Area (Unidades de área)
0.2	1217
0.2	1270
0.6	5117
0.6	6751
0.9	10899
0.9	10516
1.2	17405
1.2	18818

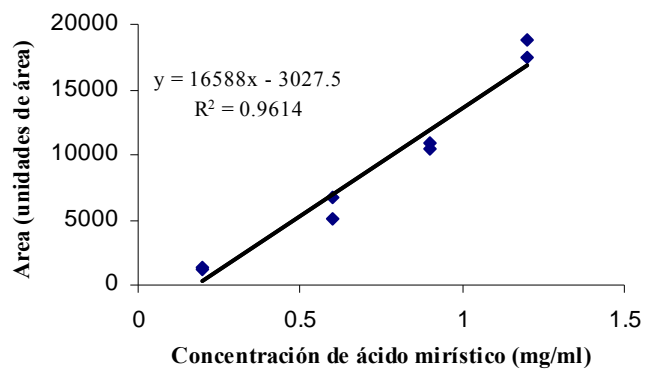
**Figura 39.** Curva patrón para ácido mirístico

Tabla 48. Areas obtenidas para ácido palmitoleico

Concentración de ácido palmitoleico (mg/ml)	Area (Unidades de área)
0.1	1147
0.1	1650
0.3	2891
0.3	2712
0.5	7985
0.5	9299
0.7	14925
0.7	15443
1	18450
1	17238
1.3	22784
1.3	21456
1.6	35512
1.6	32775

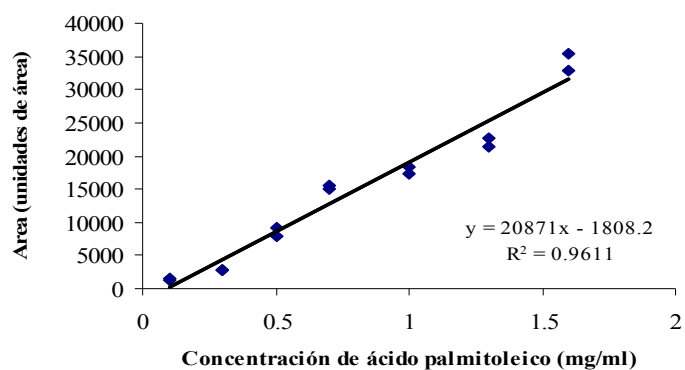
**Figura 40.** Curva patrón para ácido palmitoleico

Tabla 49. Areas obtenidas para ácido palmítico

Concentración de ácido palmítico (mg/ml)	Area (Unidades de área)
0.4	1330
0.4	1998
2	65739
2	70784
3.5	176328
3.5	206432
5	211478
5	231448
6.5	309512
6.5	324589

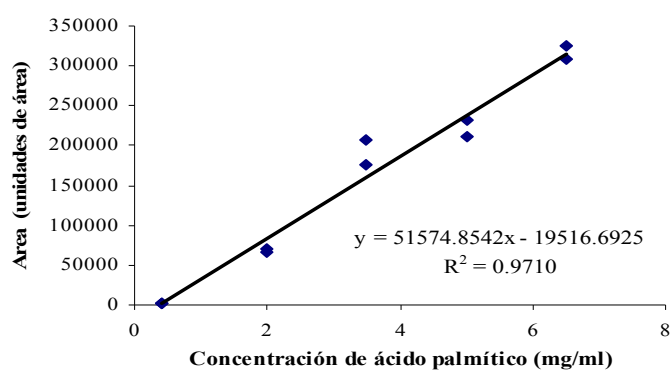
**Figura 41.** Curva patrón para ácido palmítico

Tabla 50. Areas obtenidas para ácido oleico

Concentración de ácido oleico (mg/ml)	Area (Unidades de área)
1.35	2110
1.35	3023
5	257865
5	204523
10	305976
10	320910
15	472566
15	462566
20	810895
20	778655

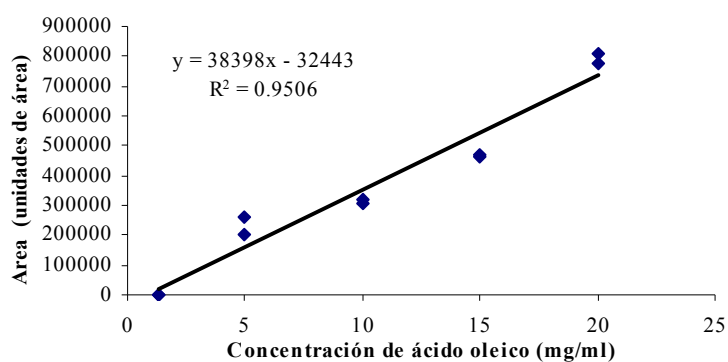
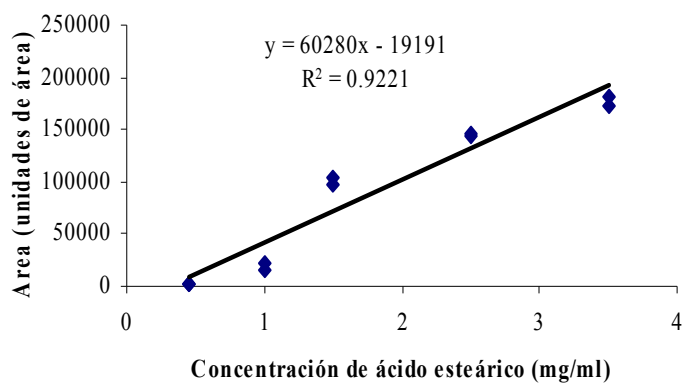
**Figura 42.** Curva patrón para ácido oleico

Tabla 51. Areas obtenidas para ácido esteárico

Concentración de ácido esteárico (mg/ml)	Area (Unidades de área)
0.45	3210
0.45	2050
1	15781
1	21739
1.5	97678
1.5	103726
2.5	143245
2.5	145897
3.5	173327
3.5	180456

**Figura 43.** Curva patrón para ácido esteárico

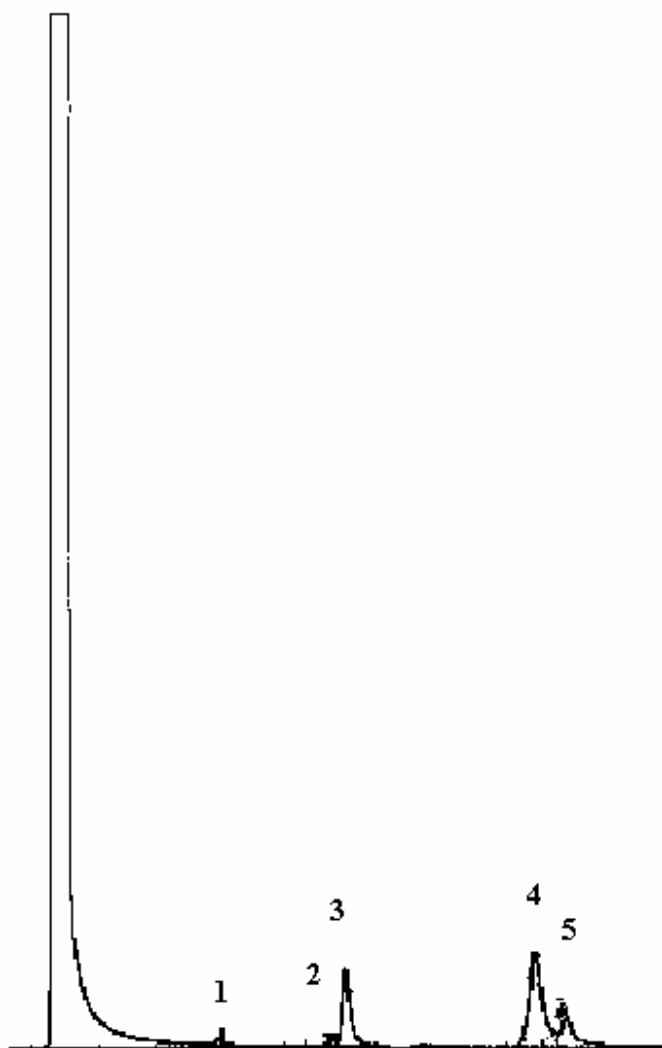


Figura 44. Cromatograma de ácidos grasos libres de cadena larga estudiados. 1) ácido mirístico ($t_R=2.187$ min); 2) ácido palmitoleico ($t_R=2.507$ min); 3) ácido palmítico ($t_R=2.545$ min); 4) ácido oleico ($t_R=3.079$ min); 5) ácido esteárico ($t_R=3.165$ min)

Tabla 52. Concentración de ácido mirístico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 72 horas (metanol como disolvente)

Temperatura ambiente con aire			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	141.74 ^{A a(1)(3)} ± 8.54 ⁽²⁾	141.74 ^{A a} ± 8.54	141.74 ^{A a} ± 8.54
24	181.09 ^{A b} ± 16.97	185.33 ^{A b} ± 15.90	171.77 ^{A ab} ± 18.83
48	181.74 ^{A b} ± 26.77	185.74 ^{A b} ± 18.30	200.55 ^{A b} ± 17.48
72	175.84 ^{A ab} ± 17.12	146.77 ^{A a} ± 13.86	284.43 ^{B c} ± 37.17
Media	170.10 ^{AB(3)} ± 24.01	164.89 ^A ± 25.12	199.62 ^B ± 58.51

10°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a
24	106.63 ^{A b} ± 4.42	122.16 ^{A b} ± 21.60	121.78 ^{A b} ± 19.99
48	149.53 ^{A c} ± 12.76	117.47 ^{A b} ± 5.05	126.55 ^{A b} ± 25.98
72	95.40 ^{A b} ± 23.61	112.56 ^{A b} ± 61.68	100.35 ^{A b} ± 9.91
Media	92.35 ^A ± 56.31	85.32 ^A ± 59.48	86.48 ^A ± 56.28

(¹) Media de 5 mediciones. (²) Desviación estándar. (³) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 53. Concentración de ácido palmítoico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 72 horas (metanol como disolvente)

Temperatura ambiente con aire			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	136.24 ^{A a(1)(3)} ± 22.51 ⁽²⁾	136.24 ^{A a} ± 22.51	136.24 ^{A a} ± 22.51
24	187.26 ^{A a} ± 43.56	204.43 ^{A b} ± 36.05	178.61 ^{A a} ± 29.68
48	185.41 ^{A a} ± 29.57	194.78 ^{A b} ± 39.10	215.28 ^{A a} ± 37.18
72	172.92 ^{A a} ± 38.23	123.36 ^{A a} ± 22.48	333.09 ^{B b} ± 74.53
Media	170.46 ^{A (3)} ± 37.95	164.70 ^A ± 46.09	215.81 ^A ± 86.03
10°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a
24	76.10 ^{A b} ± 11.12	97.20 ^{A c} ± 29.74	103.57 ^{A b} ± 32.02
48	152.98 ^{A c} ± 20.56	92.24 ^{A c} ± 9.22	112.61 ^{A b} ± 45.20
72	87.33 ^{A b} ± 35.79	40.96 ^{A b} ± 15.61	88.19 ^{A b} ± 9.56
Media	83.04 ^A ± 58.60	62.94 ^A ± 44.59	79.65 ^A ± 52.30
4°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	82.05 ^{A a} ± 28.39	82.05 ^{A a} ± 28.39	82.05 ^{A a} ± 28.39
24	83.36 ^{A a} ± 24.77	97.24 ^{A ab} ± 25.06	104.22 ^{A ab} ± 14.11
48	125.51 ^{A a} ± 38.12	172.60 ^{A c} ± 27	139.50 ^{A b} ± 40.52
72	108.26 ^{A a} ± 19.63	130.30 ^{AB bc} ± 9.22	143.07 ^{B b} ± 7.73
Media	99.79 ^A ± 32.13	120.55 ^A ± 41.76	117.21 ^A ± 35.30

⁽¹⁾ Media de 5 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 54. Concentración de ácido palmítico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 72 horas (metanol como disolvente)

Temperatura ambiente con aire			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	553.65 ^{A a(1)(3)} ± 89.88 ⁽²⁾	553.65 ^{A a} ± 89.88	553.65 ^{A a} ± 89.88
24	760.10 ^{A a} ± 171.52	824.95 ^{A b} ± 144.71	729.88 ^{A a} ± 116.19
48	755.63 ^{A a} ± 125.06	807.23 ^{A b} ± 175.99	901.32 ^{A a} ± 161.40
72	715.43 ^{A a} ± 149.76	509.66 ^{A a} ± 91.21	1373.74 ^{B b} ± 292.81
Media	696.20 ^{A (3)} ± 152.83	673.87 ^A ± 189.65	889.65 ^A ± 355.26
10°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	125.69 ^{A a} ± 4.31	125.69 ^{A a} ± 4.31	125.69 ^{A a} ± 4.31
24	287.28 ^{A b} ± 39.78	358.83 ^{A b} ± 110.83	379.05 ^{A b} ± 107.39
48	541.50 ^{A c} ± 71.25	332.84 ^{A b} ± 33.37	416.68 ^{A b} ± 156.65
72	327.77 ^{A b} ± 134.03	192.61 ^{A a} ± 12.73	327.50 ^{A ab} ± 40.78
Media	330.98 ^A ± 168.09	267 ^A ± 115.73	321.74 ^A ± 146.47
4°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	469.26 ^{A a} ± 225.64	469.26 ^{A a} ± 225.64	469.26 ^{A a} ± 225.64
24	448.40 ^{A a} ± 158.17	619.46 ^{A a} ± 203.72	657.23 ^{A ab} ± 126.46
48	703.10 ^{A a} ± 235.07	1175.88 ^{A b} ± 202.53	890.38 ^{A ab} ± 313.06
72	710.18 ^{A a} ± 157.24	831.14 ^{A ab} ± 103.34	1088.53 ^{A b} ± 328.80
Media	582.73 ^A ± 221.47	773.93 ^A ± 323.14	776.35 ^A ± 339.26

(¹) Media de 5 mediciones. (²) Desviación estándar. (³) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 55. Concentración de ácido oleico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 72 horas (metanol como disolvente)

Temperatura ambiente con aire			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	1865.85 ^{A a(1)(3)} ± 405.67 ⁽²⁾	1865.85 ^{A ab} ± 405.67	1865.85 ^{A a} ± 405.67
24	1931.16 ^{A a} ± 612.75	2223.67 ^{A b} ± 546.02	1818.40 ^{A a} ± 347.57
48	1829.42 ^{A a} ± 318.25	2065.52 ^{A ab} ± 663.08	2251.65 ^{A a} ± 546.28
72	1697.88 ^{A a} ± 539.32	1130.29 ^{A a} ± 353.74	3615.65 ^{B b} ± 1030.02
Media	1831.08 ^{A(3)} ± 451.52	1821.33 ^A ± 633.09	2387.89 ^A ± 951.25
10°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	276.09 ^{A a} ± 6.64	276.09 ^{A a} ± 6.64	276.09 ^{A a} ± 6.64
24	639.83 ^{A ab} ± 151.48	846.41 ^{A b} ± 364.50	936.47 ^{A ab} ± 353.97
48	1483.73 ^{A c} ± 214.25	775.89 ^{A b} ± 166.60	1091.79 ^{A b} ± 533.31
72	913.99 ^{A b} ± 412.65	421.42 ^{A ab} ± 75.75	910.65 ^{A ab} ± 142.61
Media	854.34 ^A ± 505.78	616.48 ^A ± 318.50	827.12 ^A ± 444.08
4°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	1151.55 ^{A a} ± 668.63	1151.55 ^{A a} ± 668.63	1151.55 ^{A a} ± 668.63
24	1317.33 ^{A a} ± 672.59	1766.84 ^{A ab} ± 619.37	1901.52 ^{A ab} ± 371.61
48	2045.78 ^{A a} ± 647.81	3558.65 ^{A c} ± 570.34	2600.75 ^{A b} ± 912.67
72	2066.23 ^{A a} ± 458.19	2447.42 ^{AB b} ± 328.72	2896.43 ^{B b} ± 434.79
Media	1645.22 ^A ± 709.36	2231.11 ^A ± 1051.48	2137.56 ^A ± 903.80

(1) Media de 5 mediciones. (2) Desviación estándar. (3) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 56. Concentración de ácido esteárico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 72 horas (metanol como disolvente)

Temperatura ambiente con aire			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	345.27 ^{A a(1)(3)} ± 64.68 ⁽²⁾	345.27 ^{A ab} ± 64.68	345.27 ^{A a} ± 64.68
24	351.84 ^{A a} ± 98.08	393.83 ^{A b} ± 84.03	340.18 ^{A a} ± 53.26
48	340.91 ^{A a} ± 50.67	373.52 ^{A ab} ± 108.61	415.79 ^{A a} ± 91.18
72	322.13 ^{A a} ± 86.15	226.67 ^{A a} ± 55.70	623.67 ^{B b} ± 163.19
Media	340.04 ^{A (3)} ± 71.67	334.82 ^A ± 99.60	431.23 ^{A (3)} ± 150.89
10°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a
24	146.68 ^{A b} ± 22.37	170.93 ^{A b} ± 48.97	182.58 ^{A b} ± 44.11
48	249.62 ^{A c} ± 29.64	159.39 ^{A b} ± 21.98	197.36 ^{A b} ± 74.57
72	183.41 ^{A ab} ± 58.95	117.51 ^{A b} ± 10.71	181.37 ^{A b} ± 20.60
Media	150.84 ^A ± 97.03	117.89 ^A ± 75.01	145.84 ^A ± 91.22
4°			
Tiempo (horas)	Romero (metanol)	BHA/BHT	Control
0	257.16 ^{A a} ± 123.84	257.16 ^{A a} ± 123.84	257.16 ^{A a} ± 123.84
24	279.76 ^{A a} ± 90.87	433.82 ^{A ab} ± 159.90	411.05 ^{A ab} ± 62.28
48	430.26 ^{A a} ± 140.17	734.23 ^{A c} ± 175.55	558.07 ^{A b} ± 175.46
72	482.41 ^{A a} ± 83.38	529.88 ^{A bc} ± 73.72	594.79 ^{A b} ± 96.31
Media	362.40 ^A ± 142.41	488.77 ^A ± 217.84	455.27 ^A ± 176.70

(1) Media de 5 mediciones. (2) Desviación estándar. (3) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 57. Concentración de ácido palmítoleico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 72 horas (etanol como disolvente)

Temperatura ambiente con aire			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	71.37 ^{A a(1)(3)} ± 3.07 ⁽²⁾	71.37 ^{A a} ± 3.07	71.37 ^{A b} ± 3.07
24	56.42 ^{A a} ± 14.73	63.41 ^{A a} ± 3.45	51.06 ^{A ab} ± 5.52
48	55.78 ^{A a} ± 11.20	66.86 ^{A a} ± 12.69	49.28 ^{A a} ± 18.52
72	121.06 ^{A b} ± 11.50	111.51 ^{A b} ± 19.75	113.22 ^{A c} ± 11.43
Media	76.16 ^{A (3)} ± 29.16	78.29 ^A ± 22.72	71.23 ^A ± 28.39
10°			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	97.54 ^{A a} ± 5.96	97.54 ^{A a} ± 5.96	97.54 ^{A a} ± 5.96
24	107.73 ^{A a} ± 14.43	98.58 ^{A a} ± 12.94	105.28 ^{A a} ± 15.29
48	91.38 ^{A a} ± 7.48	85.43 ^{A a} ± 29.08	101.88 ^{A a} ± 2.07
72	91.99 ^{A a} ± 11.59	78.34 ^{A a} ± 3.33	84.10 ^{A a} ± 20.41
Media	97.16 ^{A (3)} ± 11.69	89.97 ^A ± 17.28	97.20 ^A ± 14.60
4°			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a
24	44.04 ^{A ab} ± 2.83	84.24 ^{B b} ± 7.83	50.85 ^{A b} ± 15.89
48	95.03 ^{A b} ± 10.70	120.57 ^{A b} ± 69.75	93.71 ^{A c} ± 24.38
72	92.08 ^{A b} ± 80.50	61.11 ^{A ab} ± 13.91	74.78 ^{A bc} ± 14.58
Media	57.79 ^A ± 54.71	66.48 ^A ± 55.69	54.83 ^A ± 39

⁽¹⁾ Media de 5 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 58. Concentración de ácido palmítico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 72 horas (etanol como disolvente)

Temperatura ambiente con aire			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	344.91 ^{A a(1)(3)} ± 46.93 ⁽²⁾	344.91 ^{A a} ± 46.93	344.91 ^{A a} ± 46.93
24	264.20 ^{A a} ± 49.80	378.43 ^{B a} ± 52.77	253.15 ^{A a} ± 29.36
48	249.62 ^{A a} ± 62.54	380.47 ^{A a} ± 100.37	246.55 ^{A a} ± 134.85
72	798.90 ^{A b} ± 108.32	668.54 ^{A b} ± 163.47	712.54 ^{A b} ± 119.29
Media	414.41 ^{A(3)} ± 239.87	443.09 ^A ± 163.83	389.29 ^A ± 213.83
10°			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	597.21 ^{A a} ± 72.50	597.21 ^{A a} ± 72.50	597.21 ^{A a} ± 72.50
24	664.51 ^{A a} ± 124.03	574.80 ^{A a} ± 74.64	641.14 ^{A a} ± 128.57
48	563.50 ^{A a} ± 85.61	514.89 ^{A a} ± 227.81	591.23 ^{A a} ± 21.44
72	520.78 ^{A a} ± 60.32	450.54 ^{A a} ± 27.95	481.56 ^{A a} ± 171.68
Media	586.50 ^{A(3)} ± 97.78	534.36 ^A ± 129.57	577.79 ^A ± 120.53
4°			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	701.50 ^{A ab} ± 151.61	701.50 ^{A a} ± 151.61	701.50 ^{A a} ± 151.61
24	565.44 ^{A a} ± 167.07	1175.34 ^{B b} ± 132.02	918.44 ^{B b} ± 116.61
48	1051.72 ^{A b} ± 160.13	1304.17 ^{A b} ± 256.07	1011.18 ^{A b} ± 102.23
72	697.75 ^{A ab} ± 388.16	818.30 ^{A a} ± 172.94	965.51 ^{A b} ± 52.32
Media	754.10 ^A ± 286.48	999.83 ^A ± 305.25	899.16 ^A ± 159.11

(¹) Media de 5 mediciones. (²) Desviación estándar. (³) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 59. Concentración de ácido oleico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 72 horas (etanol como disolvente)

Temperatura ambiente con aire			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	660.48 ^{A a(1)(3)} ± 158.90 ⁽²⁾	660.48 ^{A a} ± 158.90	660.48 ^{A a} ± 158.90
24	671.91 ^{A a} ± 117.14	753.11 ^{B a} ± 67.85	635.16 ^{A a} ± 88.27
48	689.26 ^{A a} ± 279.05	1023.17 ^{A a} ± 345.89	579.68 ^{A a} ± 393
72	2251.30 ^{A b} ± 318.75	1919.31 ^{A b} ± 617.04	2049.64 ^{A b} ± 350.10
Media	1068.24 ^{A(3)} ± 732.94	1089.02 ^A ± 610.09	981.24 ^A ± 683.14
10°			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	1684 ^{A a} ± 273.40	1684 ^{A a} ± 273.40	1684 ^{A a} ± 273.40
24	1899.16 ^{A a} ± 425.92	1704.25 ^{A a} ± 220.17	1874.05 ^{A a} ± 399.56
48	1653.80 ^{A a} ± 256.21	1537.56 ^{A a} ± 757.99	1738.33 ^{A a} ± 99.76
72	1481.03 ^{A a} ± 175.51	1318.64 ^{A a} ± 114.78	1381.41 ^{A a} ± 570.36
Media	1679.50 ^{A(3)} ± 312.21	1561.11 ^A ± 417.92	1669.45 ^A ± 392.53
4°			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	1680.21 ^{A a} ± 673.91	1680.21 ^{A a} ± 673.91	1680.21 ^{A a} ± 673.91
24	1842.85 ^{A a} ± 625.76	4291.30 ^{B b} ± 409.89	2971.84 ^{B ab} ± 585.47
48	3792.08 ^{A b} ± 603.73	4465.28 ^{A b} ± 1643.44	4828.64 ^{A c} ± 1056
72	2742.70 ^{A ab} ± 1589.41	2960.91 ^{A ab} ± 582.90	3154.55 ^{A b} ± 452.71
Media	2514.46 ^A ± 1237.63	3349.43 ^A ± 1450.93	3158.81 ^A ± 1328.15

⁽¹⁾ Media de 5 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 60. Concentración de ácido esteárico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 72 horas (etanol como disolvente)

Temperatura ambiente con aire			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	202.58 ^{A a(1)(3)} ± 33.64 ⁽²⁾	202.58 ^{A a} ± 33.64	202.58 ^{A a} ± 33.64
24	200.09 ^{A a} ± 60.42	212.54 ^{A a} ± 60.09	185.95 ^{A a} ± 47.73
48	190.09 ^{A a} ± 52.68	241.16 ^{A a} ± 66.85	161.09 ^{A a} ± 64.71
72	501.30 ^{A b} ± 49.02	406.07 ^{A b} ± 81.64	454.86 ^{A b} ± 48.64
Media	273.52 ^{A (3)} ± 142.56	265.59 ^A ± 102.36	251.12 ^A ± 129.96
10°			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	390.17 ^{A a} ± 52.14	390.17 ^{A a} ± 52.14	390.17 ^{A a} ± 52.14
24	413.47 ^{A a} ± 68.48	392.93 ^{A a} ± 35.84	395.90 ^{A a} ± 80.83
48	375.36 ^{A a} ± 41.29	313.41 ^{A a} ± 119.70	383.25 ^{A a} ± 21.32
72	331.72 ^{A a} ± 45.84	286.40 ^{A a} ± 39.30	277.96 ^{A a} ± 96.65
Media	377.68 ^A ± 57.41	345.73 ^A ± 80.57	361.82 ^A ± 80.61
4°			
Tiempo (horas)	Salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	117.01 ^{A ab} ± 3.94	117.01 ^{A a} ± 3.94	117.01 ^{A a} ± 3.94
24	113.10 ^{A a} ± 5.31	129.78 ^{B ab} ± 3.65	122.35 ^{B ab} ± 4.56
48	127.86 ^{A b} ± 6.04	134.30 ^{A b} ± 10.27	134.11 ^{A b} ± 9.21
72	119.30 ^{A ab} ± 11.49	117.99 ^{A a} ± 6.50	117.81 ^{A a} ± 8.72
Media	119.32 ^A ± 8.69	124.77 ^A ± 9.78	122.82 ^A ± 9.52

(¹) Media de 5 mediciones. (²) Desviación estándar. (³) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 61. Areas obtenidas para ácido láctico

Concentración de ácido láctico (mg/ml)	Area (Unidades de área)
0.16	101776
0.3125	140221
0.625	301320
0.9	846850
1.25	977765

Tabla 62. Areas obtenidas para ácido acético

Concentración de ácido acético (mg/ml)	Area (Unidades de área)
0.0812	9345
0.0812	7123
0.1625	18851
0.1625	13694
0.325	33473
0.325	36599
0.65	69351
0.65	66164
0.9	114356
0.9	116896
1.3	154218
1.3	164432
1.6	214578
1.6	215841

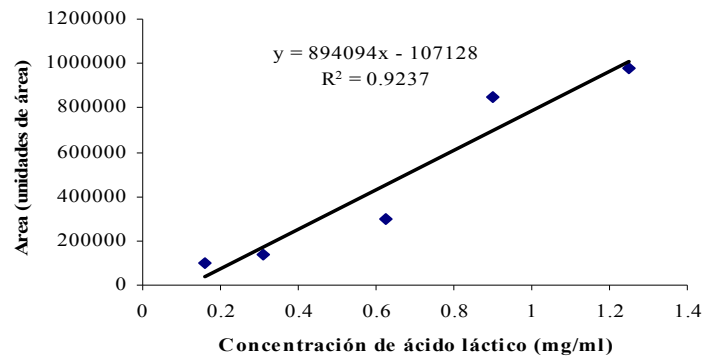


Figura 45. Curva patrón para ácido láctico

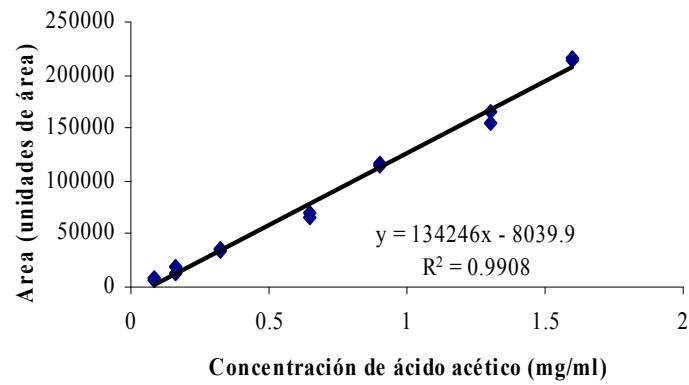


Figura 46. Curva patrón para ácido acético



Figura 47. Cromatograma de los ácidos de cadena corta estudiados: 1) ácido láctico ($t_R = 1.124$ min); 2) ácido acético ($t_R = 1.305$ min)

Tabla 63. Valor de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) (mg malonaldehído/kg de pasta) en pastas almacenadas durante 72 horas (cloroformo como disolvente)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
TRATAMIENTO	0.082	
Temperatura ambiente con aire:		
Extracto de salvia (cloroformo) primera repetición		0.223 ^a ± 0.143
Peróxido de hidrógeno		0.570 ^a ± 0.504
Temperatura ambiente:		
Extracto de salvia (cloroformo) primera repetición		0.194 ^a ± 0.150
Peróxido de hidrógeno		0.235 ^a ± 0.156
4°:		
Extracto de salvia (cloroformo) primera repetición		0.182 ^a ± 0.160
Peróxido de hidrógeno		0.084 ^a ± 0.052
Control		0.067 ^a ± 0.033
TIEMPO (HORAS)	0.055	
0		0.020 ^a (N D) ⁽⁴⁾
24		0.223 ^a ± 0.141
48		0.370 ^a ± 0.395
72		0.275 ^a ± 0.184
TRATAMIENTO	0.011	
Temperatura ambiente con aire:		
Extracto de salvia (cloroformo) segunda repetición		5.314 ^b ± 3.833
Peróxido de hidrógeno		1.931 ^{ab} ± 1.572
Control		3.296 ^{ab} ± 3.332
Temperatura ambiente:		
Extracto de salvia (cloroformo) segunda repetición		1.244 ^a ± 0.934
Peróxido de hidrógeno		1.135 ^a ± 0.893
Control		1.354 ^b ± 1.159
4°:		
Extracto de salvia (cloroformo) segunda repetición		0.273 ^a ± 0.129
Peróxido de hidrógeno		0.226 ^a ± 0.120
Control		0.316 ^a ± 0.172
TIEMPO (HORAS)	0.035	
0		0.332 ^a ± (N D)
24		0.909 ^a ± 1.336
48		2.477 ^a ± 2.755
72		2.989 ^a ± 2.868

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

⁽⁴⁾ N D – Desviación estándar no determinada

Tabla 64. Luminosidad en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.0001	
Extracto de romero (cloroformo)		67.78 ^{a(2)} ± 0.75 ⁽³⁾
Extracto de salvia (etanol)		69.07 ^b ± 0.85
Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)		69.03 ^b ± 0.57
BHA/BHT		69.45 ^b ± 0.88
Control		71.66 ^c ± 1.33
TIEMPO (DIAS)	0.001	
0		70.44 ^{bc} ± 1.25
3		69.51 ^a ± 1.65
7		69.59 ^a ± 2.01
10		69.72 ^{ab} ± 1.92
14		70.60 ^c ± 2.62
17		69.91 ^{abc} ± 1.43
21		69.52 ^a ± 1.57
24		70.22 ^{abc} ± 1.76

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 65. Valor de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) (mg malonaldehído/kg pasta) en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Tiempo (días)	Romero (cloroformo)	Salvia (etanol)	Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	0.734 ^{A b(1)(3)} ± 0 ⁽²⁾	0.734 ^{A ab} ± 0	0.734 ^{A a} ± 0	0.734 ^{A a} ± 0	0.734 ^{A a} ± 0
3	0.208 ^{A a} ± 0.040	0.261 ^{A a} ± 0.143	0.172 ^{A a} ± 0.024	0.438 ^{A a} ± 0.184	0.890 ^{B a} ± 0.036
7	0.198 ^{A a} ± 0.048	1.595 ^{A bc} ± 0.343	0.390 ^{A a} ± 0.059	0.507 ^{A a} ± 0.193	1.549 ^{A a} ± 1.247
10	0.260 ^{A a} ± 0.043	2.799 ^{B d} ± 0.032	0.329 ^{A a} ± 0.217	0.361 ^{A a} ± 0.042	1.869 ^{B a} ± 0.509
14	0.229 ^{A a} ± 0.012	2.265 ^{B cd} ± 0.416	0.547 ^{A a} ± 0.138	0.521 ^{A a} ± 0.102	2.811 ^{B a} ± 0.156
17	0.370 ^{A a} ± 0.180	1.674 ^{B bc} ± 0.270	0.500 ^{A a} ± 0.240	0.394 ^{A a} ± 0.053	2.393 ^{B a} ± 0.473
21	0.252 ^{A a} ± 0.127	1.641 ^{A bc} ± 0.468	0.349 ^{A a} ± 0.004	0.488 ^{A a} ± 0.031	1.909 ^{A a} ± 1.185
24	0.198 ^{A a} ± 0.025	1.544 ^{B bc} ± 0.420	0.428 ^{A a} ± 0.053	0.489 ^{A a} ± 0.052	1.753 ^{B a} ± 0.352
Media	0.306 ^{A (3)} ± 0.185	1.564 ^B ± 0.801	0.431 ^A ± 0.186	0.491 ^A ± 0.133	1.738 ^B ± 0.831

⁽¹⁾ Media de 2 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 66. Cromaticidad en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.001	
Extracto de romero (cloroformo)		15.81 ^{b(2)} ± 0.89 ⁽³⁾
Extracto de salvia (etanol)		14.78 ^a ± 0.73
Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)		14.97 ^a ± 0.68
BHA/BHT		15.03 ^a ± 0.84
Control		14.73 ^a ± 0.63
TIEMPO (DIAS)	0.001	
0		16.48 ^c ± 0.52
3		15.74 ^b ± 0.74
7		15.09 ^a ± 0.68
10		14.82 ^a ± 0.75
14		14.71 ^a ± 0.55
17		14.67 ^a ± 0.56
21		14.86 ^a ± 0.39
24		14.62 ^a ± 0.44

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 67. Incremento en la tonalidad en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.806	
Extracto de romero (cloroformo)		74.67 ^{a(2)} ± 79.43 ⁽³⁾
Extracto de salvia (etanol)		106.27 ^a ± 83.01
Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)		95.16 ^a ± 84.62
BHA/BHT		96.27 ^a ± 82.70
Control		106.84 ^a ± 81.11
TIEMPO (DIAS)	0.001	
0		0 ^a
3		52.54 ^{ab} ± 79.24
7		117.51 ^b ± 76.78
10		87.38 ^b ± 84.36
14		134.96 ^b ± 66.61
17		134.52 ^b ± 68.66
21		134.94 ^b ± 66.49
24		105.06 ^b ± 81.24

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 68. Concentración de proteína (%) en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.887	
Extracto de romero (cloroformo)		10.052 ^a (²) ± 0.772(³)
Extracto de salvia (etanol)		9.989 ^a ± 0.848
Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)		10.202 ^a ± 0.690
BHA/BHT		10.308 ^a ± 0.708
Control		10.192 ^a ± 0.576
TIEMPO (DIAS)	0.004	
0		10.762 ^b ± 0.825
7		10.431 ^{ab} ± 0.342
14		9.772 ^a ± 0.278
21		9.629 ^a ± 0.509

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 69. Humedad (%) en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.083	
Extracto de romero (cloroformo)		65.694 ^a (²) ± 0.396(³)
Extracto de salvia (etanol)		65.723 ^a ± 0.639
Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)		65.744 ^a ± 0.487
BHA/BHT		65.270 ^a ± 0.595
Control		65.757 ^a ± 0.611
TIEMPO (DIAS)	0.009	
0		65.329 ^a ± 0.772
7		65.981 ^b ± 0.269
14		65.629 ^{ab} ± 0.412
21		65.610 ^{ab} ± 0.517

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 70. Cenizas (%) en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.208	
Extracto de romero (cloroformo)		4.188 ^{a(2)} ± 0.116 ⁽³⁾
Extracto de salvia (etanol)		4.319 ^a ± 0.158
Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)		4.344 ^a ± 0.110
BHA/BHT		4.296 ^a ± 0.130
Control		4.289 ^a ± 0.170
TIEMPO (DIAS)	0.009	
0		4.407 ^b ± 0.125
7		4.319 ^{ab} ± 0.183
14		4.206 ^a ± 0.073
21		4.216 ^a ± 0.057

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 71. Grasa (%) en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.004	
Extracto de romero (cloroformo)		41.176 ^b ± 4.371
Extracto de salvia (etanol)		38.588 ^{ab} ± 0.904
Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)		39.825 ^{ab} ± 4.084
BHA/BHT		36.592 ^a ± 2.241
Control		37.420 ^a ± 1.469
TIEMPO (DIAS)	0.0001	
0		41.323 ^c ± 3.947
7		39.623 ^{bc} ± 2.269
14		37.768 ^{ab} ± 1.360
21		36.166 ^a ± 2.601

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 72. Actividad de agua en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Fuente de variación	p>	Comparación múltiple de medias (por prueba de Duncan) ⁽¹⁾
ANTIOXIDANTE	0.978	
Extracto de romero (cloroformo)		0.954 ^{a(2)} ± 0.002 ⁽³⁾
Extracto de salvia (etanol)		0.953 ^a ± 0.002
Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)		0.953 ^a ± 0.0007
BHA/BHT		0.953 ^a ± 0.0008
Control		0.953 ^a ± 0.002
TIEMPO (DIAS)	0.002	
0		0.952 ^a ± 0.001
7		0.953 ^{ab} ± 0.0006
14		0.954 ^b ± 0.0014
21		0.954 ^b ± 0.002

⁽¹⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes. ⁽²⁾ Para cada fuente de variación se confundieron los otros efectos. ⁽³⁾ Desviación estándar.

Tabla 73. pH en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Tiempo (días)	Romero (cloroformo)	Salvia (etanol)	Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	5.835 ^{A c(1)(3)} ± 0.007 ⁽²⁾	5.870 ^{A c} ± 0.014	5.860 ^{A de} ± 0	5.835 ^{A bc} ± 0.021	5.825 ^{A c} ± 0.007
3	5.710 ^{C ab} ± 0	5.690 ^{BC a} ± 0.014	5.665 ^{B a} ± 0.007	5.695 ^{BC a} ± 0.007	5.605 ^{A a} ± 0.007
7	5.755 ^{A b} ± 0.007	5.725 ^{A ab} ± 0.063	5.725 ^{A b} ± 0.035	5.720 ^{A a} ± 0.028	5.635 ^{A a} ± 0.035
10	5.750 ^{A b} ± 0.014	5.720 ^{A ab} ± 0.014	5.730 ^{A b} ± 0.028	5.740 ^{A a} ± 0.028	5.670 ^{A ab} ± 0.014
14	5.660 ^{A a} ± 0	5.740 ^{A ab} ± 0.028	5.720 ^{A ab} ± 0.014	5.770 ^{A ab} ± 0.042	5.725 ^{A b} ± 0.007
17	5.700 ^{A ab} ± 0	5.805 ^{B bc} ± 0.021	5.810 ^{B cd} ± 0	5.850 ^{B bc} ± 0.014	5.830 ^{B c} ± 0.028
21	5.725 ^{A ab} ± 0.007	5.880 ^{B c} ± 0.014	5.875 ^{B e} ± 0.007	5.915 ^{B c} ± 0.021	5.890 ^{B c} ± 0.014
24	5.715 ^{A ab} ± 0.063	5.820 ^{A bc} ± 0.028	5.790 ^{A c} ± 0	5.875 ^{A c} ± 0.007	5.875 ^{A c} ± 0.021
Media	5.731 ^{A (3)} ± 0.052	5.781 ^{CD} ± 0.073	5.771 ^{BC} ± 0.072	5.800 ^D ± 0.079	5.756 ^B ± 0.109

(1) Promedio de 2 mediciones. (2) Desviación estándar. (3) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 74. Concentración de ácido acético (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Tiempo (días)	Romero (cloroformo)	Salvia (etanol)	Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	74.09 ^{B a (1)(3)} ± 1.76 ⁽²⁾	109.38 ^{D b} ± 3.25	90.92 ^{C b} ± 1.82	67.98 ^{A ab} ± 0.36	95 ^{C b} ± 0.16
3	81.57 ^{A a} ± 2.41	78.20 ^{A ab} ± 2.91	80.46 ^{A b} ± 2.87	86.72 ^{A ab} ± 4.64	83.16 ^{A b} ± 3.77
7	77.11 ^{A a} ± 1.67	84.98 ^{A ab} ± 1.45	85.27 ^{A b} ± 7.90	82.20 ^{A ab} ± 2.62	85.94 ^{A b} ± 2.83
10	628.47 ^{A d} ± 127.14	637.90 ^{A d} ± 82.42	657.04 ^{A e} ± 29.99	649.75 ^{A e} ± 119.64	939.66 ^{B e} ± 86.10
14	434.92 ^{A c} ± 48.08	334.12 ^{A c} ± 26.72	390.06 ^{A d} ± 77.69	286.53 ^{A c} ± 23.87	380.88 ^{A d} ± 20.56
17	416.99 ^{B c} ± 8.45	266.60 ^{A c} ± 63.20	226.35 ^{A c} ± 12.38	408.19 ^{B d} ± 12.71	378.78 ^{B d} ± 24.58
21	219.42 ^{C b} ± 13.15	101.28 ^{A b} ± 21.35	148.66 ^{AB b} ± 2.17	170.81 ^{BC b} ± 33.80	191.79 ^{BC c} ± 15.86
24	173.22 ^{B ab} ± 1.85	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Media	263.22 ^{B (3)} ± 201.87	201.56 ^A ± 200.48	209.84 ^A ± 208	219.02 ^A ± 212.44	269.40 ^B ± 292.69

⁽¹⁾ Media de 5 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 75. Concentración de ácido palmitoleico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Tiempo (días)	Romero (cloroformo)	Salvia (etanol)	Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
3	83.48 ^{AB b(1)(3)} ± 29.49 ⁽²⁾	51.69 ^{A b} ± 4.07	56.89 ^{AB b} ± 14.84	86.51 ^{AB c} ± 21.83	95.96 ^{C cd} ± 26.51
7	79.28 ^{B b} ± 9.71	66.15 ^{AB bc} ± 21.75	84.51 ^{B c} ± 20.96	49.35 ^{A b} ± 5.69	67.95 ^{AB b} ± 9.66
10	71.80 ^{A b} ± 7.70	80.64 ^{A cd} ± 14.77	54.22 ^{A b} ± 11.01	76.53 ^{A c} ± 10.99	70.50 ^{A b} ± 13.97
14	113.18 ^{B c} ± 24.90	119.06 ^{B ef} ± 3.06	167.89 ^{C d} ± 13.06	82.07 ^{A c} ± 12.62	105.98 ^{AB cd} ± 10.43
17	98.76 ^{AB bc} ± 11.16	131.53 ^{C f} ± 12.33	89.35 ^{A c} ± 12.94	88.60 ^{A c} ± 7.29	111.23 ^{B d} ± 9.68
21	97.14 ^{A bc} ± 9.04	100.25 ^{A de} ± 16.94	86.06 ^{A c} ± 14.42	98.15 ^{A c} ± 16.74	88.15 ^{A bcd} ± 6.73
24	76.65 ^{B b} ± 8.25	97.32 ^{B de} ± 10.46	46.39 ^{A b} ± 4.52	89.31 ^{B c} ± 16.62	83.84 ^{B bc} ± 13.36
Media	77.54 ^{A(3)} ± 35.30	80.83 ^A ± 41.28	73.16 ^A ± 47.09	71.31 ^A ± 32.82	77.95 ^A ± 35.30

(¹) Media de 5 mediciones. (²) Desviación estándar. (³) Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 76. Concentración de ácido palmítico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Tiempo (días)	Romero (cloroformo)	Salvia (etanol)	Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	701.50 ^{A ab(1)(3)} ± 151.61 ⁽²⁾	701.50 ^{A b} ± 151.61	701.50 ^{A b} ± 151.61	701.50 ^{A ab} ± 151.61	701.50 ^{AB ab} ± 151.61
3	749.13 ^{AB ab} ± 245.26	423.75 ^{A a} ± 66.81	445.05 ^{A a} ± 73.73	752.13 ^{AB b} ± 185.34	839.74 ^{B ab} ± 215.92
7	807.53 ^{BC ab} ± 183.04	937.70 ^{C cd} ± 82.06	767.42 ^{BC b} ± 163.27	447.46 ^{A a} ± 48.83	609.75 ^{AB a} ± 115
10	629.72 ^{AB a} ± 149.82	734.59 ^{B b} ± 94.95	468.97 ^{A a} ± 88.49	673.63 ^{AB ab} ± 125.29	614.01 ^{AB a} ± 103.50
14	1027.50 ^{B b} ± 258.70	1112.36 ^{B de} ± 86.50	1471.20 ^{C c} ± 151.39	635.14 ^{A ab} ± 149.95	942.78 ^{B b} ± 127.86
17	880.89 ^{A ab} ± 91.20	1136.22 ^{B e} ± 118.99	744.98 ^{A b} ± 122.35	741.52 ^{A b} ± 77.56	962.41 ^{AB b} ± 162.68
21	878.04 ^{A ab} ± 96.16	847.47 ^{A bc} ± 135.62	727.19 ^{A b} ± 168.09	859.47 ^{A b} ± 163.70	899.41 ^{A ab} ± 225.43
24	632.89 ^{B a} ± 164.66	780.53 ^{B bc} ± 95.48	308.45 ^{A a} ± 31.22	759.78 ^{B b} ± 202.67	611.94 ^{B a} ± 132.72
Media	788.40 ^{BC(3)} ± 206.66	834.26 ^C ± 240.78	704.35 ^{AB} ± 354.02	696.33 ^A ± 175.21	772.699 ^{ABC} ± 206.29

⁽¹⁾ Media de 5 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 77. Concentración de ácido oleico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Tiempo (días)	Romero (cloroformo)	Salvia (etanol)	Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	1680.21 ^{A a(1)(3)} ± 673.91 ⁽²⁾	1680.21 ^{A a} ± 673.91	1680.21 ^{A ab} ± 673.91	1680.21 ^{A ab} ± 673.91	1680.21 ^{A a} ± 673.91
3	2667.01 ^{A abc} ± 939.37	1530 ^{A a} ± 353.28	1748.57 ^{A abc} ± 632.68	2764.84 ^{A c} ± 645.98	3001.51 ^{A bcd} ± 836.48
7	3080.52 ^{B bc} ± 882.22	2724.02 ^{AB b} ± 726.89	2737.87 ^{AB c} ± 538.54	1611.81 ^{A a} ± 305.75	2139.12 ^{AB ab} ± 251.90
10	2158.37 ^{AB ab} ± 555.50	2579.90 ^{B b} ± 447.23	1683.15 ^{A ab} ± 289.60	2442.73 ^{AB abc} ± 398.30	1994.12 ^{AB ab} ± 361.22
14	3856.75 ^{B c} ± 1056.60	4265.58 ^{B c} ± 442.14	5593.59 ^{C d} ± 699.61	2431.75 ^{A abc} ± 521.99	3402.05 ^{AB cd} ± 430.33
17	3177.84 ^{A bc} ± 450.34	4244.68 ^{B c} ± 436.11	2659.10 ^{A bc} ± 476.57	2664.85 ^{A bc} ± 352.20	3451.85 ^{AB d} ± 497.41
21	3199.93 ^{A bc} ± 286.31	3142.54 ^{A b} ± 523.50	2611.29 ^{A bc} ± 597.94	3145.78 ^{A c} ± 676.32	3061.72 ^{A bcd} ± 1168.61
24	2143.69 ^{B ab} ± 560.67	2750.68 ^{B b} ± 282.83	905.43 ^{A a} ± 136.37	2666.22 ^{B bc} ± 617.17	2224.45 ^{B abc} ± 450.65
Media	2745.54 ^{AB(3)} ± 940.51	2864.70 ^B ± 1066.98	2452.40 ^A ± 1429.98	2426.02 ^A ± 702.90	2619.38 ^{AB} ± 876.04

⁽¹⁾ Media de 5 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 78. Concentración de ácido esteárico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Tiempo (días)	Romero (cloroformo)	Salvia (etanol)	Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	117.01 ^{A a(1)(3)} ± 3.94 ⁽²⁾	117.01 ^{A ab} ± 3.94	117.01 ^{A abc} ± 3.94	117.01 ^{A ab} ± 3.94	117.01 ^{A a} ± 3.94
3	117.85 ^{AB a} ± 7.12	109.77 ^{A a} ± 0.80	111.81 ^{AB ab} ± 3.64	119.80 ^{AB ab} ± 6.75	122.22 ^{B a} ± 6.26
7	118.18 ^{AB a} ± 4.39	121.21 ^{B abc} ± 4.49	121.43 ^{B bc} ± 8.10	109.12 ^{A a} ± 1.47	112.49 ^{AB a} ± 4.37
10	115.15 ^{A a} ± 2.32	120.05 ^{A abc} ± 8.77	109.63 ^{A ab} ± 2.46	116.70 ^{A ab} ± 6.17	114.50 ^{A a} ± 6.83
14	142.72 ^{A b} ± 20.63	146.95 ^{A de} ± 14.38	175.54 ^{B d} ± 15.39	123.20 ^{A b} ± 8.61	135.74 ^{A b} ± 8.71
17	131.37 ^{A ab} ± 12.24	156.03 ^{B e} ± 9.43	127.04 ^{A c} ± 8.06	125.58 ^{A b} ± 8.02	136.96 ^{A b} ± 13.32
21	130.94 ^{A ab} ± 7.81	133.39 ^{A cd} ± 12.83	127.85 ^{A c} ± 10.37	138.64 ^{A c} ± 8.36	122.92 ^{A a} ± 2.69
24	119.52 ^{B a} ± 7.67	130.53 ^{B bc} ± 4.16	105.96 ^{A a} ± 1.09	126.03 ^{B b} ± 9.86	119.33 ^{B a} ± 2.50
Media	124.09 ^{A(3)} ± 12.91	129.37 ^B ± 16.79	124.53 ^A ± 22.13	122.01 ^A ± 10.48	122.65 ^A ± 10.73

⁽¹⁾ Media de 5 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas son entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).

Tabla 79. Concentración de ácido láctico (mg/100 g) en pastas almacenadas durante 24 días (cloroformo y etanol como disolventes)

Tiempo (días)	Romero (cloroformo)	Salvia (etanol)	Extractos de romero (cloroformo) y de salvia (etanol)	BHA/BHT	Control
0	23.55 ^{A a(1)(3)} ± 0.48 ⁽²⁾	31.44 ^{C a} ± 4.82	27.51 ^{ABC a} ± 3.15	24.55 ^{AB a} ± 2.40	29.43 ^{BC a} ± 2.03
3	19.13 ^{A a} ± 1.17	26.07 ^{B a} ± 2.17	26.85 ^{B a} ± 2.12	27.15 ^{B a} ± 1.75	24.98 ^{B a} ± 1.27
7	17.11 ^{A a} ± 1.16	24.86 ^{B a} ± 1.89	18.98 ^{A a} ± 1.07	16.98 ^{A a} ± 1.67	26.56 ^{B a} ± 0.81
10	148.75 ^{A c} ± 2.22	152.23 ^{AB c} ± 2.49	167.64 ^{C c} ± 2.75	159.42 ^{BC b} ± 7.86	152.85 ^{AB b} ± 7.09
14	182.40 ^{A e} ± 9.75	185.61 ^{A d} ± 14.71	190.89 ^{A d} ± 20.29	184.91 ^{A c} ± 13.28	205.24 ^{A d} ± 9.53
17	219.43 ^{AB f} ± 1.53	194.48 ^{A d} ± 14.45	216.27 ^{AB e} ± 21.11	228.07 ^{B d} ± 6.47	206.01 ^{AB d} ± 14.73
21	160.82 ^{BC d} ± 5.61	133.53 ^{A b} ± 14.45	138.85 ^{AB b} ± 12.93	146.68 ^{ABC b} ± 23.21	166.55 ^{C c} ± 3.43
24	124.72 ^{A b} ± 4.38	145.55 ^{B bc} ± 8.36	156.67 ^{B bc} ± 7.71	151.65 ^{B b} ± 13.34	174.26 ^{C c} ± 9.93
Media	111.99 ^{A (3)} ± 76.77	111.72 ^A ± 69.31	117.96 ^{BC} ± 77.25	117.43 ^B ± 78.65	123.23 ^C ± 77.71

⁽¹⁾ Media de 5 mediciones. ⁽²⁾ Desviación estándar. ⁽³⁾ Superíndices iguales no son significativamente diferentes (las mayúsculas on entre antioxidantes y las minúsculas dentro de los antioxidantes).