



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias



**ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS APLICABLES
AL DESARROLLO Y CONSERVACIÓN
DE PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS (PATÉS)
DURANTE EL ALMACENAMIENTO REFRIGERADO**



Tesis de Maestría

Lic. Cs. Bioquímicas Ana María Terrasa

Director

Dra. Mabel C. Tomás

Codirector

Dra. Marina Dello Staffolo

Año 2012

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Magister en Tecnología e Higiene de los Alimentos fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET) bajo la dirección de la Dra. Mabel Cristina Tomás y la codirección de la Dra. Marina Dello Staffolo.

Agradecimientos

Quiero agradecer a las personas e instituciones que han hecho posible el desarrollo de esta Tesis de Maestría:

- Al CIDCA por ofrecerme la oportunidad, el lugar y los medios para poder desarrollar el trabajo experimental
- A la Dra. Mabel Tomás por su apoyo y generosidad. Por la libertad con que me permitió llevar a cabo mi trabajo
- A la Dra. Marina Dello Staffolo por su dedicación y entusiasmo
- A la Dra. Viviana Sorrivas por las imágenes de microscopía electrónica de barrido
- A la Dra. Margarita Bravo por la determinación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa
- Al Ms. Sc. Leandro Langman y a la Lic. Livia Negri por su colaboración en la determinación de los perfiles de aroma con nariz electrónica y en la determinación de compuestos volátiles
- A mis compañeros de la Facultad de Cs. Veterinarias en especial a Margarita, Mónica y Mariana por sus consejos y aliento en los momentos difíciles
- A los docentes de la Maestría que me permitieron aprender muchas cosas
- A los compañeros de la Maestría por los momentos compartidos
- Al personal del CIDCA por su colaboración en mi trabajo
- A mis amigos de toda la vida con quien compartimos buenos y malos momentos
- A mi familia sin la cual mi existencia no tendría sentido

Ana María Terrasa

Resumen

Teniendo en cuenta la relación existente entre nutrición y salud así como la demanda creciente de los consumidores de productos más saludables, en este trabajo de Tesis se han diseñado productos a base de hígado de pollo (patés o pastas de hígado) en los cuales se realizaron modificaciones de la fase grasa tanto cualitativas como cuantitativas. En ese sentido, en productos procesados elaborados con carne o vísceras, una de las estrategias utilizadas para la obtención de productos más saludables consiste en la reformulación de los mismos con el propósito de disminuir el contenido de grasas saturadas y de colesterol cuyo exceso en la dieta constituye uno de los factores predisponentes para la ocurrencia de enfermedades cardiovasculares, principal causa de mortalidad en el mundo occidental.

En este trabajo se diseñaron productos de un menor contenido grasa en los cuales se redujo un 30% el nivel de fase grasa con respecto a las formulaciones tradicionales. Asimismo, se desarrollaron patés en los que se sustituyó la grasa de cerdo (tocino) por aceite de girasol, el cual aporta un mayor nivel de ácidos grasos poliinsaturados. De este modo, se han obtenido productos con un perfil de ácidos grasos más saludable.

Cabe señalar que los patés de hígado son productos de alto tenor grasa y contenido de hierro por lo tanto, son altamente susceptibles de sufrir fenómenos de oxidación de lípidos y de proteínas, lo que en conjunción con el deterioro microbiológico constituye una de las principales causas de la pérdida de calidad y de vida útil.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se ha implementado la adición de antioxidantes naturales, uno de ellos rico en diterpenos fenólicos (extracto de romero) y otro constituido principalmente por catequinas (extracto de té verde). Además, el empleo de antioxidantes naturales satisface otra de las demandas actuales de los consumidores que consideran que los mismos aportan efectos benéficos para la salud. Asimismo, contempla la sustitución de antioxidantes sintéticos, cuyos efectos toxicológicos negativos han sido demostrados.

Los productos desarrollados fueron caracterizados a través de su composición centesimal, valor calórico y composición de ácidos grasos. El deterioro

oxidativo y el efecto de la adición de antioxidantes naturales mencionados fueron estudiados mediante la determinación de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), carbonilos proteicos, hierro hemínico y el perfil de compuestos volátiles asociados al proceso de oxidación lipídica durante el almacenamiento refrigerado a 4 ± 1 °C.

La calidad higiénico-sanitaria de los patés desarrollados se constató a través del análisis microbiológico durante el almacenamiento refrigerado.

Ahora bien, dado que la fase grasa contribuye a las propiedades organolépticas y que la reducción y/o sustitución de la misma puede modificar las características del producto, la evolución de los parámetros de color, textura y microestructura fue determinada durante el almacenamiento refrigerado. Por último, se realizó el análisis sensorial de los productos obtenidos, el cual incluyó la prueba del triángulo, a fin de discernir si las distintas formulaciones eran diferenciadas por los consumidores, así como ensayos de aceptabilidad global para determinar si la composición de la fase grasa o la adición de antioxidantes naturales produjo alguna modificación de los principales atributos sensoriales. Se estudió el perfil de aroma mediante el empleo de una Nariz Electrónica para obtener información acerca de la influencia de la formulación y el tiempo de almacenamiento en este atributo inherente a la calidad organoléptica de los productos estudiados.

INDICE GENERAL

Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Productos cárnicos.....	2
1.1.1. Estrategias para diseñar productos cárnicos saludables....	4
1.1.2. Influencia del tipo y cantidad de materia grasa en las características de los productos cárnicos.....	6
1.1.3. Patés o pastas de hígado.....	9
1.2. Oxidación de lípidos en productos cárnicos.....	12
1.2.1. Mecanismo de la oxidación lipídica.....	13
1.2.2. Métodos de evaluación de la oxidación lipídica.....	17
1.2.3. Control de la oxidación de lípidos.....	21
1.2.3.1. Antioxidantes sintéticos.....	23
1.2.3.2. Antioxidantes naturales.....	25
1.2.4. Factores que afectan la oxidación lipídica en sistemas multifase.....	37
1.3. Oxidación de proteínas en productos cárnicos.....	38
1.4. Degradación oxidativa del grupo hemo.....	41
1.5. Factores que afectan el deterioro oxidativo en patés de hígado.....	44
1.5.1. Procesamiento mecánico.....	45
1.5.2. Tratamiento térmico.....	45
1.5.3. Efecto de los aditivos utilizados en la elaboración de patés...	46
1.6. Objetivos	51

Capítulo 2. Materiales y Métodos.....	53
2.1. Formulación de los patés.....	54
2.2. Materias primas empleadas	54
2.3. Proceso de manufactura de los patés.....	55
2.4. Tratamiento térmico.....	56
2.5. Almacenamiento refrigerado.....	57
2.6. Diseño experimental.....	57
2.7. Ensayos realizados.....	58
2.7.1. Composición centesimal.....	59
2.7.1.1. Humedad.....	59
2.7.1.2. Lípidos.....	59
2.7.1.3. Proteínas.....	60
2.7.1.4. Cenizas.....	62
2.7.1.5. Hidratos de carbono.....	62
2.7.1.6. Valor calórico.....	62
2.7.1.7. Determinación de la composición de ácidos grasos...	63
2.7.1.8. Determinación de tocoferoles.....	64
2.7.2. Evaluación del deterioro oxidativo.....	64
2.7.2.1. Determinación de la oxidación de lípidos.....	64
2.7.2.2. Determinación de la oxidación de proteínas.....	66
2.7.2.3. Determinación de hierro hemínico.....	68
2.7.2.4. Determinación de compuestos volátiles derivados de	

la oxidación oxidación lipídica.....	68
2.7.3. Análisis microbiológico.....	70
2.7.4. Análisis organoléptico.....	73
2.7.4.1. Determinación del color.....	73
2.7.4.2. Análisis del Perfil de Textura (TPA).....	74
2.7.4.3. Determinación de la microestructura.....	76
2.7.4.4. Evaluación sensorial.....	78
2.7.4.5. Perfil de aroma.....	81
2.8. Análisis Estadístico.....	83
Capítulo 3. Resultados y discusión.....	85
3.1. Composición centesimal.....	86
3.2. Perfil de ácidos grasos.....	88
3.3. Evaluación del deterioro oxidativo.....	96
3.3.1. Oxidación de lípidos	96
3.3.2. Oxidación de proteínas.....	101
3.3.3. Determinación de hierro hemínico.....	103
3.3.4. Compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica.....	105
3.4. Análisis microbiológico.....	112
3.5. Análisis organoléptico.....	112
3.5.1. Color.....	112

3.5.1.1. Color Superficial.....	114
3.5.1.1.1. Luminosidad.....	114
3.5.1.1.2. Parámetro a*.....	116
3.5.1.1.3. Parámetro b*.....	118
3.5.1.1.4. Croma.....	120
3.5.1.1.5. Ángulo Hue.....	122
3.5.1.2. Color Interno.....	123
3.5.1.2.1. Luminosidad.....	124
3.5.1.2.2. Parámetro a*.....	125
3.5.1.2.3. Parámetro b*.....	126
3.5.1.2.4. Croma.....	127
3.5.1.2.5. Ángulo Hue.....	128
3.5.2. Análisis del Perfil de Textura (TPA).....	130
3.5.3. Microestructura.....	136
3.5.4. Análisis Sensorial.....	140
3.5.5. Perfil de aroma.....	141
Conclusiones.....	149
Difusión de resultados.....	154
Bibliografía.....	156

Listado de Abreviaturas

a*	componente rojo-verde (sistema CIE de determinación de color)
ADN	ácido desoxirribonucleico
a _w	actividad acuosa
b	componente amarillo-azul (sistema CIE de determinación de color)
BHA	terbutil-4-hidroxianisol
BHT	2,6-diterbutil p-hidroxitolueno
C	croma (sistema CIE de determinación de color)
CAA	Código Alimentario Argentino
CEPA	Cámara de Empresarios Productores Avícolas
CLA	ácido linoleico conjugado
COPs	productos de oxidación del colesterol
DNPH	dinitrofenilhidrazina
EC	epicatequina
ECG	galato de epicatequina
EGC	epigalocatequina
EGCG	galato de epigalocatequina
FAMEs	ésteres metílicos de ácidos grasos
FID	detector de ionización de llama
GC-MS	cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masa
Gir28	paté 28% p/p de aceite de girasol
Gir28-R	paté 28% p/p de aceite de girasol con 1000 pm de extracto de romero
Gir28-T	paté 28% p/p de aceite de girasol con 500 ppm de extracto de té verde
Gir40	paté 40% p/p de aceite de girasol
Gir40-R	paté 40% p/p de aceite de girasol con 1000 pm de extracto de romero

Gir40-T	paté 40% p/p de aceite de girasol con 500 ppm de extracto de té verde
GRAS	generalmente reconocido como seguro
H°	ángulo Hue (sistema CIE de determinación de color)
HACCP	análisis de peligros y puntos críticos de control
HI	hierro hemínico
HO·	radical hidroxilo
HS	espacio de cabeza
L*	luminosidad
L·	radical lipídico
LDL	lipoproteínas de baja densidad
LO·	radical lipídico alcoxilo
LOO·	radical lipídico peroxilo
LOOH	hidroperóxido lipídico
MDA	malondialdehído
MUFAs	ácidos grasos monoinsaturados
NHI	hierro no hemínico
O ₂ ^{-·}	anión superóxido
¹ O ₂	oxígeno singulete
³ O ₂	oxígeno triplete
OMS	Organización Mundial de la Salud
O/W	emulsión aceite en agua
P·	radical proteico
<i>p</i> -An	índice de <i>p</i> -anisidina
PG	galato de propilo
PO·	radical proteico alcoxilo
POO·	radical proteico peroxilo

POOH	hidroperóxido proteico
PUFAs	ácidos grasos poliinsaturados
PV	índice de peróxidos
ROS	especies reactivas al oxígeno
SEM	microscopía electrónica de barrido
SFAs	ácidos grasos saturados
SOD	enzima superóxido dismutasa
SPME	microextracción en fase sólida
TBA	ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico
TBHQ	terbutilhidroquinona
TCA	ácido tricloroacético
Toc28	paté 28% p/p de tocino
Toc28-R	paté 28% p/p de tocino con 1000 ppm de extracto de romero
Toc28-T	paté 28% p/p de tocino con 500 ppm de extracto de té verde
Toc40	paté 40% p/p de tocino
Toc40-R	paté 40% p/p de tocino con 1000 ppm de extracto de romero
Toc40-T	paté 40% p/p de tocino con 500 ppm de extracto de té verde
TPA	análisis del perfil de textura
UFC	unidades formadoras de colonias
WHC	capacidad de retención de agua
WOF	“warmed over flavor”

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Productos cárnicos

Los productos cárnicos o las carnes procesadas surgen por la necesidad de preservar las carnes desde tiempos remotos. Los embutidos fermentados ya se conocían en la antigua Grecia, Roma y Babilonia. Así, luego de la faena de los animales, el remanente que no se consumía inmediatamente se procesaba para su preservación y posterior consumo (Vandendriessche, 2008).

En los últimos años pueden considerarse tres periodos en los que el conocimiento científico se orienta hacia diferentes aspectos: a) periodo en el que se prioriza la calidad, estandarizada en las normas ISO 9000; b) periodo en el que se pone principal atención en la calidad y seguridad con la introducción de los sistemas de Análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) en una línea de productos "ready to eat" (listos para comer) y c) tendencias actuales en las que además de la calidad y la seguridad se pone especial atención en la relación existente entre la nutrición y la salud.

Los productos cárnicos se pueden clasificar en cuatro categorías:

- I) Productos a base de músculo entero tratados por calor, como por ejemplo jamón cocido
- II) Productos picados tratados por calor "luncheon meat" (salchichas, paté)
- III) Productos a base de músculo no tratados por calor (jamón crudo)
- IV) Productos procesados no tratados por calor o embutidos fermentados (chorizo, salame)

La tecnología de preservación para los productos del tipo I y II se basa en la aplicación de tratamiento térmico. En cambio, en los productos tipo III y IV se logra incrementar la vida útil por secado o salado debido a la reducción de la actividad acuosa (a_w) o por un efecto combinado de reducción de a_w y disminución del pH (productos secos fermentados).

Los productos cárnicos son componentes esenciales de la dieta humana. El valor nutricional de los mismos se debe principalmente a la energía que aportan, el alto valor biológico de sus proteínas ricas en aminoácidos esenciales, el aporte de vitaminas del complejo B (B_1 , B_2 , B_6 , B_{12}), siendo además fuente de elementos traza de gran importancia como el hierro hemínico -de gran biodisponibilidad- y el cinc.

Sin embargo, existe una serie de aspectos negativos relacionados con el

consumo de productos cárnicos ya que éstos suelen contener altos niveles de grasa, colesterol y una alta proporción de ácidos grasos saturados. Además, dichos productos contienen altos niveles de sodio, carecen de calcio y fibras, pudiendo contener aminas biógenas y nitrosaminas. Por esta razón, se ha relacionado el consumo de productos cárnicos con el desarrollo de obesidad, hipertensión, hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Arihara, 2006).

Actualmente, se considera que un excesivo consumo de productos cárnicos formulados tradicionalmente no es recomendado especialmente para ciertos grupos de consumidores (Estévez y col., 2005a). Así, los altos niveles de colesterol y la baja relación existente entre ácidos grasos poliinsaturados/saturados (PUFA/SFA), son características no deseadas en lo que se refiere al posible desarrollo de ciertas patologías cardiovasculares (Muguerza y col., 2001, 2003).

En este sentido, la OMS sugiere limitar el consumo de grasas y de colesterol con el objeto de prevenir la obesidad y la hipercolesterolemia, los cuales son considerados factores predisponentes de enfermedades crónicas del sistema circulatorio, constituyendo una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Dicha organización recomienda que las grasas deben representar entre el 15 y 30% del total de la energía de la dieta. Con respecto a los ácidos grasos específicos expresados como una proporción del total las calorías de la dieta, no más del 10% deberían corresponder a los ácidos grasos saturados (SFAs), los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) deberían aportar del 6 al 10% (n-6, 5-8%; n-3, 1-2%), mientras que del 10 al 15% deberían ser provistas por los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y menos del 1% por los ácidos grasos *trans*. También se recomienda limitar a 300 mg/día la ingesta de colesterol (WHO, 2003).

Por otra parte, la exposición de los alimentos que contienen colesterol al calor, aire o irradiación puede incrementar la generación de productos de oxidación del colesterol (COPs) (Ahn y col., (2001). El tratamiento térmico, principal etapa tecnológica en la elaboración y preservación de productos cocidos como el paté y otros, es una de las principales causas de su síntesis. Los COPs (7 α y 7 β -hidroxicolesterol y 7-cetocolesterol) han recibido considerable atención

en los últimos años debido a sus actividades biológicas asociadas con enfermedades cardiovasculares. Los COPs de la dieta poseen muchos efectos biológicos indeseables ya que son citotóxicos, mutagénicos, carcinogénicos, angiotóxicos, aterogénicos y producen daños en las membranas celulares (Echarte y col., 2004).

Según Hu y col. (2001), la sustitución de grasas saturadas por insaturadas es más efectiva para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares que la mera reducción de las grasas totales. La relación PUFA/SFA debe hallarse entre 0,4 - 1 y la relación n-6/n-3 no debería exceder de 4 (Jiménez-Colmenero, 2007).

Además, se han realizado estudios metabólicos que han demostrado que diferentes clases de ácidos grasos saturados tienen distintos efectos sobre los niveles de lípidos plasmáticos y de lipoproteínas. Los ácidos grasos más aterogénicos son los ácidos mirístico y palmítico y en menor grado, el ácido láurico. El ácido esteárico por su conversión en ácido oleico -una vez absorbido- no eleva la colesterolemia (WHO, 2003, Muguerza y col., 2003).

Actualmente, muchos consumidores exhiben un mayor interés y preocupación por la composición de su dieta y las implicancias que la misma puede tener sobre su salud. Esto ha generado una demanda creciente de productos cárnicos reducidos en grasa, bajos en grasa y extra magros. En ese sentido, la industria alimentaria se encuentra desarrollando diversas alternativas a fin de poder satisfacer estas demandas, ofreciendo productos más saludables.

Uno de los objetivos de la industria cárnica en la actualidad es desarrollar productos con un menor contenido graso, un mejor perfil de ácidos grasos y con la incorporación de ingredientes saludables, tratando de evitar la presencia de productos de oxidación considerados riesgosos para la salud.

1.1.1. Estrategias para diseñar productos cárnicos saludables

Dentro de las estrategias aplicables por la industria, pueden mencionarse:

a) Modificación de la composición de las carnes

Se han realizado investigaciones a nivel de la producción animal donde modificando la dieta de los animales (cerdo, pollo, etc.) se han logrado introducir cambios en el perfil de ácidos grasos de sus carnes. Sin embargo, esto es altamente variable porque la absorción e incorporación puede diferir

sustancialmente entre los distintos individuos. Jeun-Horng y col. (2002) estudiaron la composición de ácidos grasos, oxidación lipídica y propiedades sensoriales de salchichas de pollo elaboradas con carnes obtenidas de animales que habían recibido aceite de pescado en su dieta. La composición de ácidos grasos de los productos obtenidos presentó un mayor porcentaje de ácidos grasos n-3 (ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico) y un menor contenido de ácidos grasos n-6. Los niveles de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) y la intensidad de flavor a pescado determinado por evaluación sensorial, no se vieron afectados.

Enser y col. (2000) incrementaron el contenido de PUFAs n-3 en diferentes tejidos (músculo, tejido adiposo, hígado) de cerdos que recibieron dietas suplementadas con aceite de semillas de lino.

Por otra parte, Du y col. (2000) estudiaron la influencia de la administración dietaria de ácido linoleico conjugado (CLA) sobre la oxidación lipídica, la composición de ácidos grasos, el color y el perfil de compuestos volátiles de carne de pollo cruda irradiada. Dichos investigadores observaron que la incorporación de este ácido graso, de efectos benéficos para la salud en la dieta de los animales, puede afectar las características sensoriales de la carne.

b) Reformulación de los productos cárnicos

La reformulación de los productos cárnicos es una de las estrategias que ha permitido desarrollar nuevos productos con beneficios nutricionales y con características funcionales. Los productos cárnicos pueden ser modificados por adición de ingredientes considerados beneficiosos para la salud o bien por eliminación o reducción de ciertos componentes que son considerados perjudiciales (Fernández-Ginés y col., 2005; Ayo y col., 2007; Cofrades y col., 2008).

En este sentido, reviste una gran importancia considerar la posibilidad de reducir el contenido graso, modificar el perfil de ácidos grasos, disminuir el tenor de colesterol, el valor calórico, el contenido de sodio, de nitritos así como también incorporar ingredientes funcionales o compuestos bioactivos (Jiménez-Colmenero y col., 2001; Arihara, 2006; Martin y col., 2008, Lee y col., 2006a).

El reemplazo de grasas animales por aceites vegetales ha sido reconocido como una interesante vía para modificar el perfil de ácidos grasos y disminuir la presencia de colesterol (Muguerza y col., 2004; Jiménez-Colmenero, 2007). Los aceites vegetales aportan ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) por lo que su incorporación puede tener efectos positivos sobre la salud de los consumidores. Además, los aceites vegetales son también una fuente importante de tocoferoles y fitoesteroles. Así, una gran variedad de aceites vegetales (oliva, lino, girasol, soja, maíz, canola, palta) se han incorporado en productos cárnicos tales como salchichas, hamburguesas, embutidos fermentados, embutidos cocidos, etc. (Bloukas y col., 1997; Pappa y col., 2000; Valencia y col., 2006; Yilmaz y col., 2002; Rueda-Lugo y col., 2006; Choi y col., 2009 y 2010; Rodríguez-Carpena y col., 2012).

Con el objeto de obtener productos enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 se han incorporado aceites de origen marino (aceites de pescado y de algas) en diferentes tipos de productos cárnicos (Muguerza y col., 2004; Cáceres y col., 2008; Pennisi Forell y col., 2010; Lee y col., 2006b; Andrés y col., 2009).

No obstante, uno de los problemas a considerar cuando se adicionan aceites ricos en PUFAs en las formulaciones de productos cárnicos es la alta susceptibilidad de dichos ácidos grasos a la oxidación.

Ahora bien, un aspecto importante a tener en cuenta es que los aceites vegetales por presentar una composición diferente de ácidos grasos que las grasas animales, poseen diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales, las que pueden afectar las características del producto cárnico.

1.1.2. Influencia del tipo y cantidad de materia grasa en las características de los productos cárnicos

Los aspectos a considerar en la reformulación de productos cárnicos referidos a la fracción lipídica son: cualitativos (modificación de la composición de ácidos grasos) y cuantitativos (reducción de grasa). El tipo y cantidad de grasa utilizada afecta las características sensoriales, nutricionales y tecnológicas del producto manufacturado (Jiménez-Colmenero, 2000).

a) Factores sensoriales: La reducción de grasas en productos cárnicos puede modificar las características organolépticas, particularmente en productos de alto contenido graso (salchichas, hamburguesas, patés).

Las grasas en los productos cárnicos cumplen un rol importante en la estabilización de las emulsiones cárnicas y en la reducción de las pérdidas por cocción, proporcionando una adecuada capacidad de retención de agua (WHC).

Se ha demostrado además, que la grasa tiene una gran influencia en el aroma característico de los productos cárnicos. La mayoría de los componentes volátiles responsables del flavor son liposolubles y el equilibrio entre la generación y la liberación de dichos compuestos desde la matriz del alimento tiene un impacto decisivo en la sensación olfativa. Los lípidos influyen en la estabilidad fisicoquímica del flavor, por lo que la disminución del contenido de grasa puede resultar en la reducción de la intensidad del flavor característico de dichos alimentos (Estévez y col., 2005a). Así, el tipo y concentración de la materia grasa puede ejercer su influencia en las características del producto, modificando su perfil de aroma, ya que algunos de los compuestos volátiles son generados por la oxidación lipídica y su interacción con otros componentes de los alimentos. Los productos bajos en grasa suelen no tener el mismo grado de aceptabilidad, en términos de palatabilidad y apariencia. Por ello, los nuevos productos deben ofrecer buenos atributos de calidad, al menos similares a los del producto al cual los consumidores están habituados.

b) Factores nutricionales: Desde el punto de vista fisiológico, las grasas desempeñan funciones de vital importancia como fuente de energía, proporcionan ácidos grasos esenciales y son el vehículo de las vitaminas liposolubles. Los ácidos grasos esenciales (ácidos linoleico y linolénico) son necesarios como constituyentes de las membranas biológicas y precursores de otros compuestos tales como las prostaglandinas, las cuales regulan un gran número de funciones fisiológicas (Lee y col., 2006b).

c) Factores de seguridad: La mayor actividad acuosa de los productos con bajo tenor graso puede ser un potencial factor de crecimiento microbiano. La adición de agua e ingredientes no cárnicos implica un incremento de la humedad por lo tanto, la reducción de grasas está sujeta a limitaciones microbiológicas y puede incidir en la vida útil del producto. El mayor nivel de humedad en estos

productos implica además que se requiere un mayor tiempo de cocción para alcanzar la misma temperatura interna y garantizar la seguridad del alimento (Jiménez Colmenero, 2000).

d) Factores tecnológicos: Desde el punto de vista tecnológico, la grasa es un ingrediente importante en los productos cárnicos procesados ya que influye en la textura, jugosidad, palatabilidad y apariencia general, contribuyendo además a las propiedades reológicas del producto y a la formación de emulsiones estables (Totosaus y Pérez-Chabela, 2009; Jiménez Colmenero, 2000). El reemplazo de grasas saturadas por otras insaturadas, si bien proporciona ventajas nutricionales, producirá modificaciones en las propiedades fisicoquímicas del producto final.

Las posibilidades de la reducción de la fase grasa dependen de la naturaleza del producto (corte magro, sistemas gel/emulsión, grado de desintegración, coexistencia de estructuras de distinta granulación), de su composición, del tipo de procesamiento requerido (emulsificantes, tratamiento térmico, curado, secado, ahumado). La reducción de grasas en patés está limitada a la untabilidad requerida para este tipo de productos.

Las grasas vegetales incorporadas a los productos cárnicos pueden ser aceites líquidos o grasas plásticas. Las características de la grasa son determinantes de las propiedades texturales del producto. La utilización de “shortenings” de palma en la elaboración de salchichas de pollo fue realizada por Tan y col. (2006). A fin de obtener emulsiones estables es necesario considerar que los aceites, fluyen fácilmente y se incorporan rápidamente a las mismas, mientras que las grasas requieren una mayor cantidad de energía para lograr su dispersión. Además, deben contemplarse diversos aspectos durante el procesamiento como temperatura, tiempo, utilización de agentes emulsionantes, para evitar la ruptura de dichas emulsiones.

Asimismo, la utilización de ingredientes no cárnicos puede contribuir a las características texturales deseadas. Entre los principales sustitutos de grasa (“fat replacers”) se encuentran proteínas, carbohidratos o compuestos sintéticos (Bloukas y Paneras, 1993).

Cuando la grasa es reemplazada por agua, el producto de mayor humedad tendrá afectadas sus propiedades texturales y sensoriales por lo cual, suelen utilizarse otros ingredientes a fin de lograr resguardar las características del

producto original (Yang y col., 2007). Los hidrocoloides macromoleculares o gomas se han utilizado como agentes modificantes de la textura (goma xántica, carrageninas, pectinas de bajo metoxilo, goma garrofín, maltodextrina) para prevenir la pérdida de agua, por ejemplo en salchichas de bajo contenido graso (Crehan y col., 2000). También varios tipos de fibras se han utilizado en la formulación de productos cárnicos reducidos en grasa (Gigelmo-Miguel y col., 1999; Fernández-Ginés y col., 2003).

Las proteínas han sido utilizadas como sustitutos de grasa en una variedad de productos cárnicos. Las proteínas no cárnicas se utilizan para preemulsificar las grasas y aportan importantes propiedades funcionales tales como la capacidad de retención de agua (WHC) brindando estabilidad a la emulsión durante la cocción. Estas proteínas permiten lograr una distribución más uniforme de los glóbulos de grasa, lo que aumenta la estabilidad térmica, evitando la separación de agua y grasa durante el calentamiento. Su y col. (2000) estudiaron las características fisicoquímicas y la microestructura de salchichas reducidas en grasa y con distintos contenidos de NaCl utilizando diferentes proteínas no cárnicas como emulsificantes y estabilizantes (caseinato de sodio, proteínas de soja o de poroto).

Muguerza y col. (2001, 2002) utilizaron aislado proteico de soja como sustituto de grasa y agente emulsificante en embutidos fermentados reemplazando parcialmente la grasa de cerdo por aceite de oliva, obteniendo productos con ventajas nutricionales en relación a la reducción del colesterol y cambios en el perfil de ácidos grasos.

Viana y col. (2005) desarrollaron patés de jamón con reducido contenido de grasas utilizando globina y plasma sanguíneo porcino como sustitutos de grasa.

1.1.3. Patés o pastas de hígado

El paté es un producto cárnico cocido con una importante tradición gastronómica. Es considerado un producto con valor agregado por sus cualidades nutricionales y sensoriales, el cual puede elaborarse con diferentes ingredientes. En algunos países, principalmente de la Unión Europea, los patés o pastas de hígado son productos tradicionales y “gourmet” con altos niveles de consumo. Los

principales países de Europa donde es habitual su consumo son España, Francia, Alemania y Dinamarca (Fernández-López y col., 2004).

Las pastas de hígado constituyen una fuente relativamente económica de proteínas de alto valor biológico, vitaminas tales como B₁, B₁₂, ácido fólico y nutrientes inorgánicos tales como el hierro (Brito y col., 2006).

Generalmente, las pastas de hígado pueden ser consideradas como similares al "foie grass". Este vocablo de origen francés, cuya traducción literal es «hígado graso», se refiere al hígado de ganso, oca o pato hipertrofiado por sobrealimentación. El "foie-grass", aunque tiene ingredientes comunes, presenta diferencias tanto en su composición como en la elaboración de patés o pastas de hígado, cuyos componentes principales son hígado y grasa. Además, pueden adicionarse otros ingredientes tales como carnes magras, especias (pimienta negra, ají molido, cebolla), almidón, gelificantes, proteínas lácteas, sal, condimentos y otros aditivos (Brito y col., 2006; Doolaege y col., 2012). La presencia de varios componentes implica una gran variabilidad en las propiedades exhibidas por estos productos. Generalmente, la apariencia final es la de una pasta emulsificada con o sin pequeños trozos visibles de los ingredientes previamente citados. Estos derivados cárnicos obtenidos mediante tratamiento térmico se presentan a los consumidores en diferentes formas y tipos de envase: vidrio, plástico, cerámica, metálico ferroso y metálico no ferroso (Echarte y col., 2004).

Tradicionalmente, el paté se elabora con hígado y grasa de cerdo o bovino presentando un alto porcentaje de lípidos (30-40%) y un alto valor energético (300-400 kcal/100 g).

En los últimos años se han lanzado al mercado muchos productos incluyendo aquéllos elaborados con pescado (salmón, anchoas, abadejo) debido a las ventajas nutricionales asociadas a los mismos previamente comentadas. Así, Aquerreta y col., (2002) desarrollaron patés con subproductos de bajo costo de la industria del pescado tales como hígado de atún y caballa, utilizando tocino como fase grasa.

Según el Código Alimentario Argentino (CAA). Artículo 416 -"Se entiende por Pasta de hígado (Paté de foie), a la conserva elaborada con pasta de hígado, grasa, carne vacuna, pudiendo contener leche, huevos y almidón. Estos

productos pueden recibir denominaciones tales como puré de hígado, mousse de hígado”.

Artículo 417 “Cuando estos productos están elaborados con mezcla de hígados de diversas especies a los que pueden agregarse diversos productos, podrán recibir denominaciones tales como “rouleau”, “bloc supreme”, “terrinerie” de hígado”.

Se han realizado diversos estudios con el propósito de reducir el contenido graso y mejorar el perfil de ácidos grasos en patés. Estévez y col. (2005a), estudiaron las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad oxidativa de patés de hígado de cerdo con alto, medio y bajo contenido graso.

Hong y col. (2004) desarrollaron embutidos a base de hígado con 30-32% de grasas utilizando aceite de soja. Martin y col. (2008) obtuvieron patés de hígado con 24-29% de grasas reemplazando parcialmente el tocino por ácido linoleico conjugado (CLA) y/o aceite de oliva. Más recientemente, Delgado-Pando y col., (2011) utilizaron una mezcla de aceites saludables constituida por aceites de lino, oliva y de pescado para elaborar patés bajos en grasa.

Otras investigaciones se orientaron a modificar la dieta de los animales con el objeto de modificar la composición de ácidos grasos de las materias primas empleadas en la elaboración de los patés. Así, D'Arrigo y col. (2004) obtuvieron patés de hígado de cerdo con una saludable relación de PUFAs n-6/n-3 utilizando carne y grasa de cerdos alimentados con dietas enriquecidas en aceite de lino como fuente de n-3 PUFAs. Russell y col. (2003), obtuvieron patés de hígado de pato y estudiaron la efectividad de la administración supranutricional (por encima de los requerimientos nutricionales) de α -tocoferol acetato y distintos tipos de aceites (oliva, girasol, o lino) a los animales sobre la estabilidad oxidativa y el color de los patés obtenidos.

Por otra parte, la industria avícola genera subproductos tales como las vísceras, las cuales generalmente son subutilizadas (ej. hígado de pollo) para la elaboración de productos con cierto valor agregado.

En los últimos años, se ha registrado en Argentina un incremento muy relevante en la producción y en el consumo de carne aviar. Actualmente el consumo de carne avícola es de 39 kg anuales por habitante según datos de la Cámara de Empresarios Productores Avícolas (CEPA, 2012). Las proyecciones

de CEPA para el año 2012 son de una producción total de 1.860.000 toneladas de pollo, un 6% más que en 2010.

Actualmente, el pollo es utilizado en la manufactura de una gran variedad de productos procesados, los que tradicionalmente se elaboraban con carne vacuna o de cerdo. Paralelamente, se ha observado una tendencia hacia un mayor aprovechamiento de sustratos subutilizados, mediante la incorporación de menudos, entre ellos el hígado de pollo, con el objetivo de lograr una mayor utilidad económica. Cabe destacar que la presencia de un alto contenido de proteínas de tejido conectivo en el hígado lo hace apto para la preparación de emulsiones, dado que las mismas contribuyen a la retención de agua e incorporación de fase grasa.

1.2. Oxidación de lípidos en productos cárnicos

Los lípidos son componentes estructurales y funcionales de los alimentos. Los principales componentes lipídicos de los alimentos son los triacilgliceroles, los cuales comúnmente se definen como grasas o aceites. Estos compuestos no sólo contribuyen al flavor, color y textura sino que también le confieren palatabilidad a los alimentos.

Además del deterioro microbiológico, la oxidación de lípidos es el principal factor que reduce la calidad y aceptabilidad de los productos cárnicos con alto tenor graso. El deterioro oxidativo de los lípidos es una de las mayores preocupaciones de los tecnólogos de alimentos debido a las pérdidas de calidad asociados con dichos procesos (Du y col., 2000).

La oxidación de lípidos es un proceso complejo donde los PUFAs son degradados, vía formación de radicales libres, generando numerosos productos secundarios tales como malonaldehído (MDA) y compuestos volátiles derivados de lípidos causando deterioro de las propiedades nutricionales y sensoriales de los alimentos (Estévez y Cava, 2004).

El desarrollo de rancidez lleva a la formación de numerosos compuestos que tienen efectos adversos sobre los atributos de calidad (olor, sabor, color, textura) y el valor nutritivo, ya que involucra la pérdida de ácidos grasos esenciales y vitaminas, generando además compuestos tóxicos, razón por la cual este proceso puede afectar la vida útil de las carnes procesadas (Estévez y Cava,

2006).

La oxidación lipídica en productos cárnicos es un proceso complejo y su dinámica depende de numerosos factores incluyendo la composición química del producto, el procedimiento tecnológico empleado en la manufactura, el acceso a la luz y al oxígeno, la temperatura de almacenamiento. Por lo tanto, puede ocurrir en las materias primas, durante el procesamiento o en el producto final durante su almacenamiento (Frankel, 2005). Por ello, la industria alimentaria necesita controlar los factores que pueden incidir en la oxidación durante el procesamiento y conservación para minimizar su impacto en la calidad de los alimentos.

1.2.1. Mecanismo de la oxidación lipídica

La oxidación de los lípidos puede ocurrir por dos tipos de procesos: autooxidación o fotooxidación.

a) Autooxidación

La oxidación de los lípidos ocurre por un mecanismo de radicales libres que consta de varias etapas: iniciación, propagación y terminación (**Figura 1.1**).

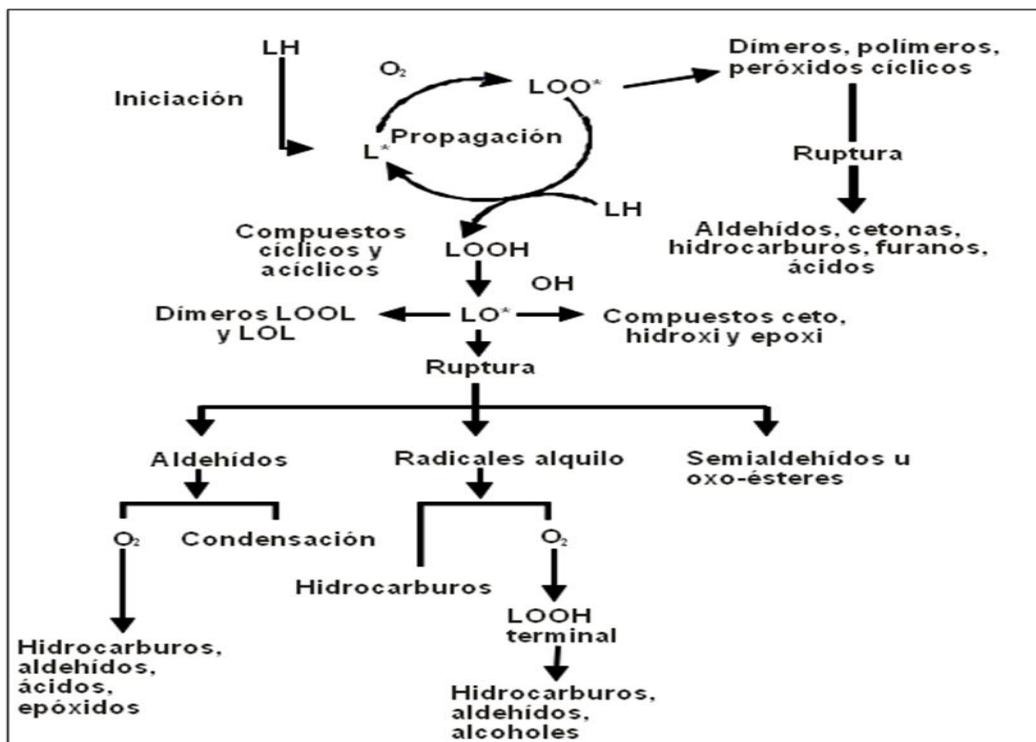


Figura 1.1. Esquema general del proceso de autooxidación lipídica (Nawar, 1996)

1. Iniciación: El mecanismo de autooxidación implica la reacción con la forma más estable del oxígeno molecular, el oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$). Este proceso es termodinámicamente desfavorable ya que la reacción implicaría el ataque sobre los dobles enlaces de los ácidos grasos que se encuentran en estado singulete, no cumpliéndose la regla de conservación del spin. Por esta razón, el proceso requiere la presencia de iniciadores (I) que generen los primeros radicales libres lipídicos.

En presencia de dichos factores de iniciación, los lípidos insaturados (LH) pierden un radical hidrógeno (H^\cdot) de la posición α con respecto al doble enlace generando radicales libres lipídicos (L^\cdot) de acuerdo a la siguiente ecuación:



Los iniciadores se pueden generar por disociación térmica de hidroperóxidos preformados (LOOH) presentes como impurezas o por descomposición de los mismos catalizada por iones metálicos (Me) como hierro y cobre para generar radicales alcoxilo (LO^\cdot) o peroxilo (LOO^\cdot), según las siguientes reacciones:



2. Propagación: Los radicales alquílicos de los lípidos, generados en la etapa de iniciación, reaccionan rápidamente con el oxígeno molecular para generar radicales peroxilo de acuerdo la siguiente ecuación:



Posteriormente, el radical peroxilo reacciona con otra molécula de un lípido insaturado para generar un nuevo radical alquílico y un hidroperóxido que es el principal producto primario de la oxidación.



Cabe señalar que la primera reacción ocurre a mayor velocidad que la segunda.

Debido a la estabilización por resonancia de los radicales alquílicos (L^\cdot) se

generan diversos hidroperóxidos isómeros.

La tasa relativa de autooxidación de los diferentes ácidos grasos y sus ésteres depende del grado de insaturación de los mismos. La susceptibilidad de los lípidos a la autooxidación depende de la disponibilidad de hidrógenos alílicos.

El ácido linoleico (18:2 n-6) es 40 veces más reactivo que el ácido oleico (18:1 n-9) y el ácido linolénico (18:3 n-3) es 2,4 veces más reactivo que el ácido linoleico. La oxidabilidad de los PUFAs se relaciona con el número de grupos metileno presentes entre los dobles enlaces.

La sustracción de hidrógenos del carbono 8 u 11 del ácido oleico produce radicales que se deslocalizan dando la posibilidad de generar cuatro hidroperóxidos en iguales proporciones: trans-9-OOH, cis-11-OOH, trans-10-OOH y cis-8-OOH.

La autooxidación del ácido linoleico ocurre por sustracción de hidrógenos del grupo metileno (C11) produciendo radicales que se estabilizan por resonancia, dichos radicales al reaccionar con el oxígeno generan una mezcla de 9 y 13 hidroperóxidos dienos conjugados (Choe y Min, 2006).

3. Terminación: La etapa de terminación implica una serie de reacciones en las cuales los diferentes radicales generados en las etapas de iniciación y propagación pueden reaccionar entre sí generando productos no radicalarios como se esquematiza en las siguientes reacciones:

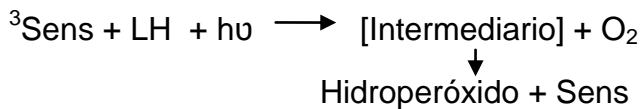


b) Fotooxidación

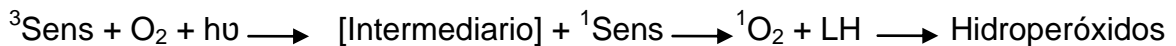
La oxidación de los ácidos grasos insaturados es acelerada por exposición a la luz. La fotooxidación se debe a la producción de radicales libres por irradiación ultravioleta, la cual cataliza la descomposición de hidroperóxidos. Este tipo de reacción en cadena de radicales libres puede ser inhibida por antioxidantes (“chain-breaking”) o por desactivadores de la radiación UV que absorben la radiación sin formación de radicales.

La fotooxidación es una vía que genera hidroperóxidos a partir de ácidos grasos insaturados en presencia de oxígeno, energía lumínica y fotosensibilizantes. Los pigmentos que inician la oxidación fotosensibilizada en alimentos incluyen clorofila, hemopigmentos y riboflavina. Hay dos tipos de sensibilizantes:

Tipo I: el sensibilizante en estado triplete, reacciona con el sustrato lipídico y por transferencia de H o e⁻ forma radicales intermediarios que reaccionan con el oxígeno de acuerdo a la siguiente reacción:



Tipo II: el sensibilizante en estado triplete interacciona con el oxígeno y por transferencia de energía forma el oxígeno singulete (¹O₂) que es altamente electrofílico y reacciona directamente con los dobles enlaces de los lípidos insaturados por un mecanismo diferente al de autooxidación:



Los hidroperóxidos generados por el oxígeno singulete juegan un rol muy importante en la iniciación de la oxidación por radicales libres. Este tipo de reacciones no son inhibidas por antioxidantes tipo “chain-breaking”.

Los carotenoides (β-caroteno, luteína, licopeno) son los más importantes inhibidores de la oxidación fotosensibilizada interfiriendo en la activación del ³O₂ a ¹O₂. El α-tocoferol es altamente reactivo con el ¹O₂ inhibiendo la oxidación fotosensibilizada por “quenching” de ¹O₂ (Frankel, 2005).

c) Descomposición de hidroperóxidos

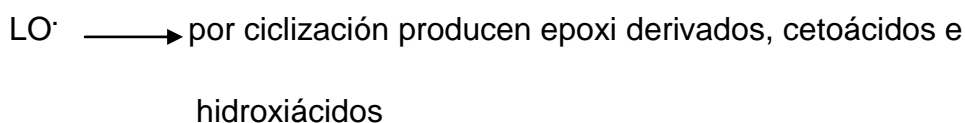
Los lipohidroperóxidos formados durante la fase de propagación son inestables y se rompen en presencia de elementos traza para dar un rango de nuevos radicales libres y otros compuestos no radicalarios que incluyen aldehídos, cetonas y compuestos carboxílicos, los cuales afectan la textura, el color, el flavor, el valor nutritivo y la calidad de los productos cárnicos.

La velocidad de formación de hidroperóxidos en los primeros estadios de la autooxidación es mayor que la velocidad de descomposición de los mismos, situación que se revierte hacia el final del proceso (Frankel, 2005).

La ruptura de los hidroperóxidos por β escisión homolítica genera radicales alcoxilo y ruptura de la cadena hidrocarbonada para formar varios productos secundarios de oxidación tales como aldehídos, hidrocarburos, cetonas, alcoholes. Estas reacciones generan radicales adicionales, los cuales promueven la lipoperoxidación y producen productos de bajo peso molecular que son volátiles y generan olores rancios.

En alimentos complejos, la interacción de hidroperóxidos lipídicos y productos secundarios de oxidación con proteínas y otros componentes puede causar desnaturalización, pérdida de la actividad biológica, de la solubilidad y de las propiedades funcionales (capacidad de emulsificación, gelación, etc.).

Cada hidroperóxido da lugar a un conjunto característico de productos de degradación. Entre los productos de oxidación secundarios monoméricos se destacan los cetoácidos, dihidroxiácidos, epoxiácidos, endoperóxidos cíclicos, etc.



Por sustracción de H pueden generar alcoholes y un nuevo radical lipídico



Los productos volátiles contribuyen al flavor y pueden afectar la seguridad del alimento ya que muchos de ellos son altamente tóxicos.

1.2.2. Métodos de evaluación de la oxidación lipídica

Existen varios métodos para evaluar la oxidación lipídica en alimentos. Se pueden monitorear cambios en las propiedades físicas, químicas u organolépticas para medir la extensión de la oxidación. Sin embargo no hay un método uniforme, estándar, para detectar cambios oxidativos en todos los sistemas alimenticios. Los métodos disponibles para monitorear la oxidación de lípidos en alimentos se dividen en dos grupos, los que miden cambios primarios y aquellos vinculados a cambios secundarios:

a) Cambios primarios: Pérdida de reactantes (ácidos grasos insaturados), captación de oxígeno, formación de productos primarios (hidroperóxidos), dienos conjugados.

Índice de peróxidos (PV): en la etapas iniciales de la oxidación lipídica, la velocidad de formación de hidroperóxidos supera la velocidad de descomposición de los mismos, situación que se revierte hacia el final del proceso. El monitoreo de los cambios en la concentración de hidroperóxidos en función del tiempo permite predecir en qué etapa se encuentra el proceso.

Método del oxígeno activo: Es un método de oxidación acelerada utilizado para determinar la estabilidad oxidativa de grasas y aceites. La oxidación se acelera por aireación a altas temperaturas. Existen versiones automatizadas (Rancimat, Oxidograph, OSI) que miden los cambios de conductividad causados por los ácidos volátiles (principalmente ácido fórmico) que se originan cuando se someten los lípidos a un tratamiento térmico exhaustivo con burbujeo de una corriente de aire.

Dienos conjugados: estos compuestos se determinan por el incremento de absorción a 234 nm.

b) Cambios secundarios: Compuestos carbonílicos (formación de hidrazonas con dinitrofenilhidrazina), malonaldehído y otros aldehídos (Ensayo de 2-TBA), hidrocarburos (etano o pentano), compuestos fluorescentes (derivados 1-amino-3-imino propano) (Shahidi, 1997).

La determinación de productos secundarios de oxidación como índice de la oxidación lipídica es más apropiada debido a que estos productos son los que están asociados a la generación de flavors indeseables.

Ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA): este ensayo es uno de los métodos más antiguos y frecuentemente utilizados para evaluar la oxidación lipídica en alimentos. El malonaldehído (MDA) es un producto de oxidación de PUFAs que reacciona con el TBA para producir un complejo coloreado. Otros aldehídos tales como alquenes y 2,4-alcadienales también reaccionan por lo que es más adecuado utilizar la denominación “sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico” (TBARS). La conversión de los hidroperóxidos en TBARS u otros aldehídos es catalizada por el hierro hemínico y no hemínico. El ensayo del TBA puede realizarse sobre el extracto ácido, el destilado o el exudado

desproteínizado del alimento. Existen limitaciones al uso de este ensayo para evaluar el estado oxidativo debido a su complejidad química y a la presencia de compuestos que interfieren en la reacción; sin embargo, provee una herramienta útil para evaluar el estatus oxidativo de un sistema que puede verse afectado por el procesamiento o el almacenamiento. Varios estudios se han realizado para establecer la relación entre los valores de TBARS y el desarrollo de sabores desagradables (Shahidi, 1997).

Valor de *p*-anisidina: Este método permite determinar el contenido de aldehídos (principalmente 2-alquénales y 2,4-alcadienales) que forman productos de coloración amarilla. Existe una alta correlación entre el valor de *p*-anisidina (*p*-An) y la aceptabilidad del sabor (Frankel, 2005).

Índice TOTOX: El índice TOTOX combina la contribución relacionada con los cambios primarios y secundarios de la oxidación lipídica.

Compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica: El análisis de los compuestos volátiles en productos cárnicos brinda una información objetiva de gran valor relacionada con las características del aroma particular del producto estudiado y su relación con la aceptabilidad general por parte del consumidor. En ese sentido, el deterioro de carnes y productos cárnicos durante el almacenamiento y manipulación puede evaluarse analizando los compuestos volátiles generados como resultado de alteraciones bioquímicas, microbiológicas y enzimáticas (Estévez y col. 2003). No obstante, es necesario tener en cuenta la generación de compuestos volátiles durante la cocción y manufactura de los productos cárnicos a fin de lograr el aroma específico y deseable de los mismos.

La mayoría de los compuestos volátiles son generados como resultado del desarrollo de reacciones químicas entre los componentes (grasas, proteínas e hidratos de carbono) de los tejidos empleados en la elaboración del producto. Los compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica incluyen alcoholes tales como el 1-hexanol, aldehídos (hexanal, heptanal, octanal, nonanal), cetonas (1-octen-3-ona, 2-nonanona). En patés de hígado de cerdo, Estévez y col., (2005b) detectaron más de 100 compuestos volátiles constituidos por derivados de la oxidación lipídica y por otros productos tales como aldehídos provenientes de las reacciones de degradación de Strecker (3-metil butanal, benzaldehído), compuestos derivados de las reacciones de Maillard nitrogenados (piridinas,

pirazinas) y azufrados (tiofenos y tiazoles). Otros compuestos encontrados estuvieron relacionados con la adición de especias y hierbas. Además, se detectaron gran cantidad de terpenos volátiles, compuestos que por su bajo umbral sensorial definen las características aromáticas de los productos en los que se encuentran.

La oxidación de lípidos genera mezclas complejas de productos primarios y secundarios, los cuales se descomponen en una diversidad de compuestos de alto y bajo peso molecular. Estas mezclas varían en naturaleza y composición de acuerdo a las condiciones y extensión del deterioro oxidativo. El deterioro del flavor en los alimentos grasos es causado principalmente por la presencia de productos de oxidación volátiles los cuales en muy bajas concentraciones (del orden de partes por billón) tienen un gran impacto en el flavor.

Dentro de los aromas desagradables encontrados en productos cárnicos cocidos puede citarse el “warmed-over flavor” o WOF. Este término es utilizado para describir el flavor oxidado que pueden desarrollar los productos cárnicos obtenidos mediante tratamiento térmico durante su posterior almacenamiento refrigerado. El WOF incluye olores y sabores descritos como “stale” (viejo, no fresco), “cardboard like” (simil cartón), rancio, amargo, ácido, agrio, entre otros (Grigioni y col., 2000).

Los compuestos volátiles de bajo peso molecular generados por oxidación de los PUFAs son los responsables del desarrollo del WOF. Dichos compuestos volátiles dependen del tipo de ácidos grasos presentes en el alimento y tienen diferente impacto en el flavor. Los compuestos volátiles con aromas más intensos incluyen el hexanal, cis-2-octenal, trans-2-octenal, trans-2-nonenal, 1-octen-3-ona y 3-octen-2-ona (Shahidi, 1997).

Los productos generados durante la lipoperoxidación también son considerados nocivos para la salud humana, por ejemplo los productos secundarios tales como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal son citotóxicos y mutagénicos (Sasaki y col., 2001).

Los principales productos secundarios de oxidación del ácido oleico son el decanal, 2-undecenal, nonanal, octano, octanal y heptano. Los compuestos volátiles derivados del ácido linoleico son pentanal, hexanal, 2-heptenal, 2-octenal, 2-nonenal, 3-nonenal, 2,4-decadienal y 2-pentilfurano.

Los productos de descomposición de los hidroperóxidos derivados del ácido linoleico se caracterizan por su aroma intenso y gran impacto en el flavor. El hexanal, principal producto de degradación de este ácido graso y de otros ácidos de la familia n-6, es el compuesto volátil más importante responsable del WOF.

Una herramienta muy útil para determinar los productos secundarios de oxidación de naturaleza volátil es la microextracción en fase sólida (SPME) a partir del espacio de cabeza (HS) y su posterior análisis por cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masa (GC-MS). El fundamento de la técnica de SPME es la partición de los compuestos volátiles de la muestra en un soporte sólido, lo cual se logra exponiendo una fibra con un recubrimiento especial a los vapores del espacio cabeza de la muestra. Posteriormente, la fibra es insertada en el inyector del cromatógrafo gaseoso donde los compuestos volátiles son desorbidos. A fin de favorecer el equilibrio de partición espacio de cabeza-muestra de los compuestos de naturaleza volátil se somete a la misma a un tratamiento térmico. Una de las fibras más utilizadas es DVB/CAR/PDMS (divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano), ya que ofrece los límites más bajos de detección. El alto grado de resolución y sensibilidad del método permite la detección de los productos volátiles de oxidación a muy bajas concentraciones lo que representa una ventaja frente a las técnicas tradicionales.

1.2.3. Control de la oxidación de lípidos

El deterioro oxidativo es un serio problema en la industria alimentaria. La oxidación de lípidos puede ser controlada por una variedad de métodos de preservación.

Las estrategias para controlar la oxidación lipídica generan importantes beneficios nutricionales y económicos ya que proporcionan seguridad, protección de compuestos esenciales tales como vitaminas y PUFAs además de reducir las pérdidas por deterioro durante el almacenamiento. Los métodos de control incluyen: inactivación de metales prooxidantes, envasado para minimizar la exposición al aire y a la humedad, protección de la exposición a la luz y el empleo de antioxidantes.

Los antioxidantes se pueden definir como sustancias que pueden inhibir o retrasar procesos de oxidación, aunque sin lograr su completa prevención

(Shahidi, 1997). La industria cárnica utiliza diversos antioxidantes para reducir el deterioro oxidativo de los lípidos.

Los antioxidantes utilizados en alimentos deben ser seguros desde el punto de vista toxicológico, no impartir olor, color ni flavor, deben ser efectivos a bajas concentraciones, permanecer en el alimento luego del procesamiento y ser estables en el producto final (Shahidi, 1997).

En cuanto al mecanismo de acción, los antioxidantes pueden actuar a través de distintos mecanismos: 1) disminuyendo la concentración de oxígeno, 2) interceptando el oxígeno singulete, 3) atrapando radicales libres (“free radical scavenger”), 4) quelando metales prooxidantes, 5) favoreciendo la descomposición de compuestos primarios a productos no radicalarios, 6) interrumpiendo las etapas de iniciación o propagación, por transferencia de átomos de hidrógeno a radicales lipídicos ($L\cdot$) y peroxilos ($LOO\cdot$) (Shahidi, 1997).

Asimismo, los antioxidantes pueden clasificarse como:

a) *Antioxidantes preventivos*: Muchas sustancias actúan como quelantes de metales es decir, forman complejos de coordinación estables con los metales que catalizan la etapa de iniciación de la peroxidación lipídica y la descomposición de hidroperóxidos. Entre las sustancias que actúan como antioxidantes preventivos pueden mencionarse los ácidos cítrico, fosfórico, tartárico, fítico, EDTA, polifosfatos y proteínas como lactoferrina, albúmina y ceruloplasmina

b) *Agentes de descomposición de hidroperóxidos*: inhiben la oxidación porque inducen la descomposición de hidroperóxidos a alcoholes estables o inactivan productos por procesos no radicalarios que involucran la reducción o donación de hidrógenos (tocoferoles y su derivado carboxílico Trolox)

c) *Desactivadores de fotoiniciadores*: absorben energía lumínica sin formación de radicales

d) *Sinergistas*: En sistemas multicomponentes los antioxidantes pueden reforzarse por efectos cooperativos. Ciertas combinaciones de antioxidantes son más efectivas que la suma de sus actividades protectoras individuales. Un ejemplo es el caso de la combinación de α -tocoferol y ácido ascórbico ya que éste último regenera el α -tocoferol a partir del radical tocoferilo.

Debido a la influencia de diversos factores sobre la capacidad de los antioxidantes de inhibir la oxidación lipídica, se han observado grandes

variaciones de la actividad antioxidante en distintos sistemas alimentarios. Algunos antioxidantes retardan la oxidación lipídica en ciertas condiciones pero la promueven en otras, actuando como prooxidantes. Uno de los factores a considerar es la polaridad de los antioxidantes y las propiedades fisicoquímicas del alimento.

Diversos estudios han realizado la evaluación comparativa de la capacidad de varios antioxidantes para inhibir la oxidación lipídica en aceites y en emulsiones de aceite en agua (O/W).

Según Chaiyasit y col. (2005), los antioxidantes polares son más efectivos en aceites mientras que los no polares lo son en emulsiones O/W. Este fenómeno es conocido como “paradoja polar”. Se ha postulado que este hecho se debe a la retención de los antioxidantes no polares en la fase lipídica de las emulsiones y a la tendencia de los antioxidantes polares de concentrarse en la interfase aceite/aire, donde tienen lugar los fenómenos de peroxidación.

Los antioxidantes pueden ser:

- a) *Antioxidantes sintéticos*: compuestos fenólicos con distinto grado de sustitución (grupos alquilo) (BHA, BHT, TBHQ, PG).
- b) *Antioxidantes naturales*: compuestos fenólicos, quinonas, lactonas, polifenoles, etc.

Las ventajas de los antioxidantes sintéticos son su efectividad y bajo costo. Sin embargo, los antioxidantes sintéticos comúnmente empleados en la industria alimentaria, han sido asociados con potenciales riesgos para la salud por lo cual existe una tendencia generalizada a minimizar su utilización (Pinho y col., 2000).

Además, se ha demostrado que el consumo de antioxidantes naturales en la dieta está relacionado con la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares y degenerativas, por lo cual sus efectos benéficos para la salud son actualmente ampliamente investigados.

1.2.3.1. Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos *terbutil-4-hidroxianisol* (BHA); *2,6-diterbutil-p-hidroxitolueno* (BHT); *terbutil hidroquinona* (TBHQ) y *galato de propilo* (PG) han

sido utilizados ampliamente para inhibir la peroxidación lipídica y retardar el desarrollo de rancidez en alimentos (**Figura 1.2**).

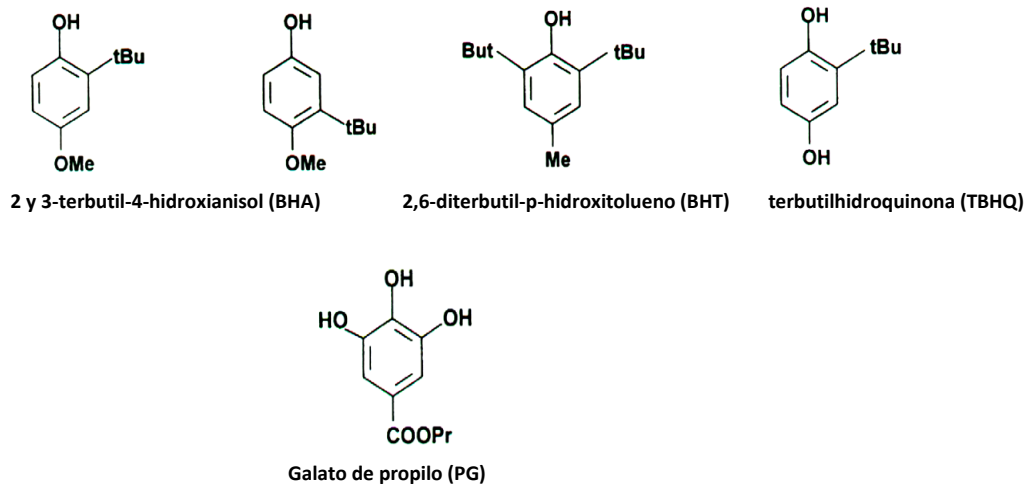


Figura 1.2. Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos poseen estructuras fenólicas con sustituyentes en las posiciones *orto* y *para* y los radicales fenoxilo, con electrones desapareados que derivan de ellos, se estabilizan por deslocalización de los electrones en el anillo aromático. (**Figura 1.3**).

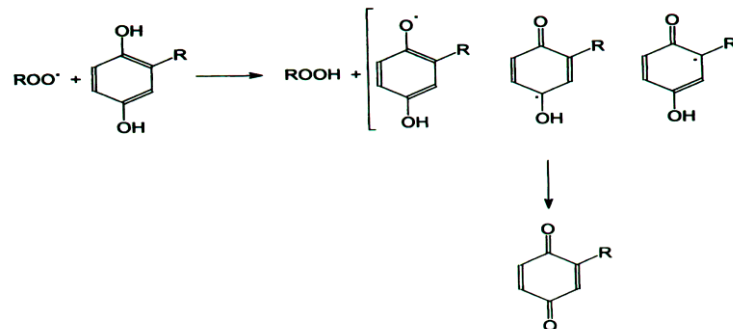
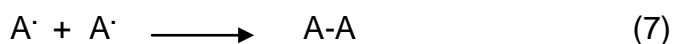


Figura 1.3. Estabilización por resonancia de los radicales fenoxilo

Las siguientes reacciones indican el mecanismo de acción de los antioxidantes (A).





Estos antioxidantes producen radicales relativamente estables, los que reaccionan lentamente con los sustratos lipídicos (LH) y rápidamente con los radicales peroxilo, de acuerdo a la ecuación (4). La reacción (5) es poco importante a presión atmosférica porque en presencia de oxígeno $\text{L}\cdot$ tiene corta vida media y reacciona rápidamente con el oxígeno, reacción (2). La reacción (5) tiene mayor importancia a baja presión de oxígeno y elevadas temperaturas. El radical antioxidante ($\text{A}\cdot$) reacciona con el radical peroxilo para formar peróxidos estables (6) o se dimeriza con otro radical antioxidante (7).

Los antioxidantes también pueden inhibir las reacciones de descomposición de hidroperóxidos para dar productos secundarios de oxidación por diferentes mecanismos, donando hidrógeno a radicales alcoxilo para formar hidroxiácidos estables (8) o atrapando radicales alcoxilo (9).



Bajo ciertas condiciones los antioxidantes fenólicos son menos efectivos y tienen tendencia a actuar como “chain-carriers” generando nuevos radicales transformándose en agentes prooxidantes.

La mayoría de los métodos para medir actividad antioxidante miden los eventos iniciales de la lipoperoxidación (absorción de O_2 , formación de hidroperóxidos, índice de peróxidos); pocos estudios evalúan el efecto de antioxidantes sobre los productos de descomposición de hidroperóxidos. Sin embargo, la formación de compuestos volátiles es relevante desde el punto de vista del deterioro del flavor.

1.2.3.2. Antioxidantes naturales

Los antioxidantes naturales son generalmente reconocidos como seguros

(GRAS). No obstante se continúan realizando estudios para evaluar en forma integral su toxicidad, dado que la concentración de los componentes activos puede variar según la fuente, el método de extracción, pudiendo generar en algunos casos efectos no deseables sobre el flavor y el color de los alimentos. Si bien poseen una intensa actividad “*in vitro*” y los estudios epidemiológicos apoyan sus beneficios nutricionales, su actividad “*in vivo*” aún requiere una mayor confirmación (Frankel, 2005).

Tocoferoles

Los tocoferoles son antioxidantes naturales liposolubles muy abundantes en los aceites vegetales (**Figura 1.4**). Su carácter hidrofóbico les confiere alta potencialidad como antioxidantes en sistemas lipídicos donde actúan secuestrando oxígeno y radicales libres. De este modo, protegen a los PUFAs al interferir en las reacciones de propagación de la oxidación lipídica

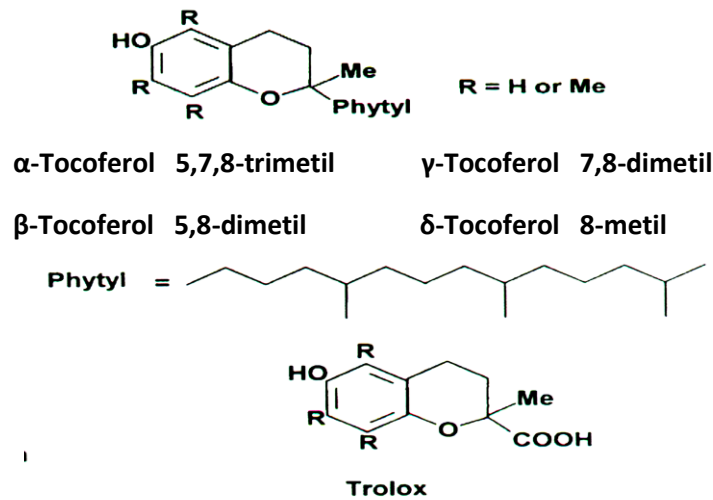


Figura 1.4. Vitamina E (diferentes vitámeros) y su derivado carboxílico Trolox (Frankel, 2005)

Los tocoferoles actúan por dos mecanismos: a) “chain-breaking” aceptor (incluyendo quenching de $^1\text{O}_2$ o reacción con $^1\text{O}_2$ para dar una variedad de productos tales como tocoferil hidroperoxidienona).

b) “chain-breaking” donador de electrones, ya que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo (más rápidamente que lo que lo hace el sustrato), el radical tocoferilo se estabiliza por resonancia:





La concentración de tocoferoles en los tejidos animales responde a la captación dietaria. La vitamina E es un elemento nutricional ampliamente utilizado como alternativa a los antioxidantes sintéticos y ha demostrado tener una fuerte actividad antioxidante en diversos tipos de carnes (bovino, cerdo, pollo). La suplementación dietaria con α -tocoferol es más eficiente que la adición de este antioxidante durante el procesamiento de los alimentos cárnicos. (Ahn y col., 2002; Houben y col., 2000; Phillips y col., 2001)

El tejido hepático tiene α -tocoferol como antioxidante endógeno; la concentración de α -tocoferol en hígado responde a la captación dietaria ya que este órgano juega un rol predominante en el metabolismo de los lípidos y las vitaminas liposolubles. Además, es posible modificar la composición de ácidos grasos del hígado modificando la composición dietaria (Sheely y col., 1991). Russell y col. (2003) investigaron el efecto de la modificación dietaria con grasas de distinto origen y suplementación con α -tocoferol acetato sobre la oxidación lipídica y la estabilidad del color de patés elaborados con hígado de patos durante el almacenamiento refrigerado. Estos autores sugieren que la suplementación de los animales con α -tocoferol a niveles superiores a los requerimientos nutricionales es más efectiva que la adición “post mortem”, ya que la vitamina puede posicionarse en el sitio de oxidación y en esta localización específica, el antioxidante funciona más eficientemente. Los resultados de este estudio mostraron que los patés de hígado de patos alimentados con aceites con altos niveles de PUFAs (lino y girasol) mostraron mayores valores del N° de TBA y que la suplementación con vitamina E aumentó su vida útil.

Ácido L-ascórbico

El ácido ascórbico es un antioxidante natural con múltiples efectos. Debido a su carácter hidrofílico, es más efectivo en aceites que en emulsiones debido a que se orienta en la interfase aceite-aire, lugar donde se desarrollan los fenómenos de peroxidación (**Figura 1.5**). Por el contrario, su derivado lipofílico, el palmitato de ascorbilo, es más efectivo en emulsiones ya que se localiza en la interfase aceite-agua (paradoja polar).

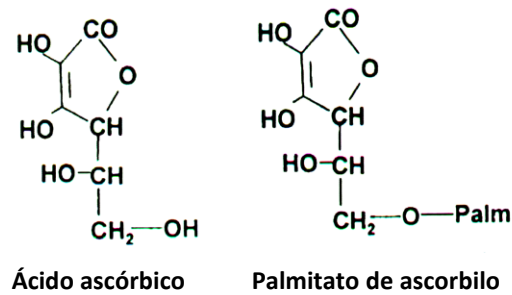
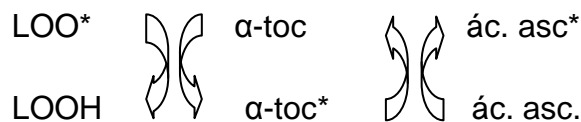


Figura 1.5. Ácido ascórbico y el derivado lipofílico palmitato de ascorbilo

El ácido ascórbico actúa por diversos mecanismos: es donante de hidrógeno (agente reductor) regenerando otros antioxidantes y aumentando su efectividad. En las siguientes reacciones se muestra el sinergismo entre el ácido ascórbico y el α -tocoferol:



Además, el ácido ascórbico produce la inactivación de metales que participan en las etapas de iniciación y descomposición de hidroperóxidos; actúa como agente reductor sobre los hidroperóxidos, los cuales se transforman en alcoholes estables y es secuestrante de oxígeno en sistemas acuosos.

Este ácido es fácilmente oxidado por transferencia de un electrón para producir el radical ascorbilo, el cual rápidamente se dismuta para dar una mezcla de ácidos ascórbico y dihidroascórbico.

En medio acuoso el ácido ascórbico es antioxidante a niveles de concentración del orden de 1 mM y actúa como prooxidante a bajas concentraciones (0,01 mM), especialmente en presencia de iones metálicos. El ácido ascórbico puede quelar Fe^{3+} y reducirlo a Fe^{2+} , el cual es más activo en la iniciación y descomposición homolítica de los hidroperóxidos.

En productos cárnicos, las funciones del ácido ascórbico se relacionan con la retención del color en productos curados, la prevención del “off flavor”, la activación de antioxidantes primarios, la inactivación de prooxidantes y por actuar como atrapante del oxígeno. El ácido ascórbico reduce otros compuestos incluyendo ácido nitroso (HNO_2). La reducción del ácido nitroso con altas concentraciones de ácido ascórbico (> 1000 ppm) a óxido nítrico ocurre durante el

curado de las carnes y previene la formación de N-nitrosaminas, compuestos que son mutagénicos (Cheng y col., 2007).

Extracto de Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

Desde la prehistoria las hierbas y especias han sido utilizadas para saborizar los alimentos y por sus propiedades antisépticas y medicinales (Zheng y Wang 2001).

Si bien los aditivos sintéticos han sido ampliamente utilizados para inhibir los procesos oxidativos y el crecimiento microbiano, la tendencia actual está asociada a disminuir su utilización ya que los mismos se han relacionado con riesgos para la salud. Los consumidores demandan cada vez más productos saludables, razón por la cual se han hecho grandes esfuerzos para seleccionar extractos naturales con actividad antioxidante como alternativa a los antioxidantes sintéticos (Pinho y col., 2000).

El interés de la industria alimentaria en los extractos naturales está asociado a su actividad antioxidante, la cual permite incrementar la vida útil de los productos alimenticios. Además, estos compuestos también presentan importantes propiedades biológicas. Muchos procesos patológicos son consecuencia de la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS), por ejemplo la aterosclerosis, envejecimiento, formación de cataratas (asociado a la oxidación de proteínas) y algunos tipos de cáncer, como consecuencia del daño oxidativo del ADN. Los antioxidantes polifenólicos tienen efectos que pueden contrarrestar muchas de esas reacciones adversas debido a su participación en la etapa de terminación de las reacciones en cadena y secuestrar ROS. Sin embargo, el uso de antioxidantes polifenólicos para producir alimentos con efectos benéficos para la salud (alimentos funcionales) requiere estudios para determinar la concentración adecuada, pruebas de su efecto antioxidante "in vivo", biodisponibilidad y actividades biológicas.

Benincá y col. (2011) investigaron el efecto del extracto crudo de *R. officinalis* L y fracciones derivadas del mismo sobre la respuesta inflamatoria en un modelo de pleuresía inducida en ratones. Los extractos citados mostraron una importante actividad antiinflamatoria por su capacidad de inhibir la migración leucocitaria, el nivel de exudado pleural y disminuir los niveles de enzimas

proinflamatorias (mieloperoxidasa) y mediadores de la inflamación (interleukina IL-1 β y factor de necrosis tumoral TNF- α). Este estudio permitió confirmar las propiedades antiinflamatorias atribuidas a la presencia de algunos de sus componentes (carnosol, ácidos betulínico y ursólico) en dichos extractos.

En los últimos años se han incrementado las investigaciones referidas al uso de extractos de origen vegetal con el objeto de inhibir el deterioro oxidativo en productos cárnicos y prolongar su vida útil (Chen y col., 1999; Mc Carthy y col., 2001 a y b, Yu y col., 2002). Los antioxidantes son utilizados en carnes frescas y procesadas para prevenir la rancidez oxidativa y el deterioro del color (Ismail y col., 2009).

Muchas investigaciones han evaluado las propiedades antioxidantes de extractos vegetales obtenidos a partir de especies de la familia Labiatae como *Salvia officinalis* L. y *Rosmarinus officinalis* L. (**Figura 1.6**). El extracto de romero es la principal fuente de antioxidantes naturales usados comercialmente con el objeto de extender la vida útil, retardar la aparición de “off-flavor” y evitar la pérdida del color y del flavor característico de los alimentos. Asimismo, diversos estudios se han focalizado en el aislamiento e identificación de los componentes antioxidantes de distintos extractos obtenidos a partir del romero. Sin embargo, es difícil comparar sus actividades antioxidantes debido a la diversidad y complejidad de las mezclas naturales de compuestos fenólicos en los mismos (Zheng y Wang, 2001).



Figura 1.6. Inflorescencias de Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

Existe una importante información bibliográfica referida a la efectividad del romero para disminuir la oxidación lipídica en patés (Estévez y col., 2006 y 2007; Doolaege y col., 2012) y en otros productos cárnicos (Estévez y Cava., 2006;

Sánchez-Escalante y col., 2001; Yu y col., 2002). Dichas propiedades se atribuyen a los diterpenos fenólicos que contienen principalmente ácido carnósico y carnosol, considerados efectivos secuestrantes de radicales libres (Fernández-López y col., 2003). A su vez, varios autores han informado que algunos componentes presentes en el extracto de romero pueden poseer actividad antimicrobiana lo que permite mantener la calidad y extender la vida útil de los productos cárnicos procesados (Del Campo y col., 2000). Fernández-López y col. (2005) estudiaron las actividades antioxidantes y antibacterianas de extractos de romero disponibles comercialmente (soluble en agua y oleosoluble) aplicados a albóndigas de carne vacuna cocida. Ambos extractos mostraron actividad antioxidante y fueron capaces de inhibir el desarrollo de diversos microorganismos incluyendo los del género *Listeria*. Los compuestos fenólicos no polares presentes en mayor proporción en el extracto oleosoluble tuvieron la mayor actividad antimicrobiana. Pandit y Shelef (1994) indicaron que el extracto de romero tiene incidencia en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en embutidos de hígado de cerdo.

En el mercado se encuentran disponibles diversos extractos de romero para su uso en alimentos, algunos de ellos previamente blanqueados y desodorizados. El aceite esencial de romero se remueve por destilación o extracción con solventes; el residuo que contiene los componentes antioxidantes es tratado con hexano para remover las ceras y con etanol para extraer los antioxidantes; la preparación final carece de olor y color. Los extractos crudos y refinados están disponibles comercialmente en forma de polvos, pastas o líquidos con distintas concentraciones de sus componentes activos (Shahidi, 1997).

A fin de obtener una óptima estabilidad oxidativa de los productos cárnicos es indispensable una distribución uniforme del antioxidante lo que a menudo requiere la utilización de transportadores (“carriers”), tales como aceites comestibles, 1,2-propilenglicol, maltodextrina. En este sentido, Waszkowiak y Dolata (2007) evaluaron la aplicación de extracto de romero utilizando colágeno como carrier en salchichas de viena y embutidos de hígado.

La fuerte actividad antioxidante del romero se debe al alto contenido de compuestos fenólicos: diterpenos fenólicos (ácido carnósico, carnosol, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol), flavonoles y triterpenos ácidos (ácidos ursólico,

oleanólico y betulínico) (**Figura 1.7**). El extracto de romero también contiene otros constituyentes minoritarios con actividad antioxidante tales como rosmaridifenol, ácido rosmarínico y rosmariquinona (Riznar y col., 2006; Masuda y col., 2002).

El ácido carnósico y el carnosol representan el 90% de la actividad antioxidante del romero. El ácido carnósico tiene una estructura consistente en tres anillos de seis miembros incluyendo un anillo dihidrofenólico y un grupo carboxilo libre.

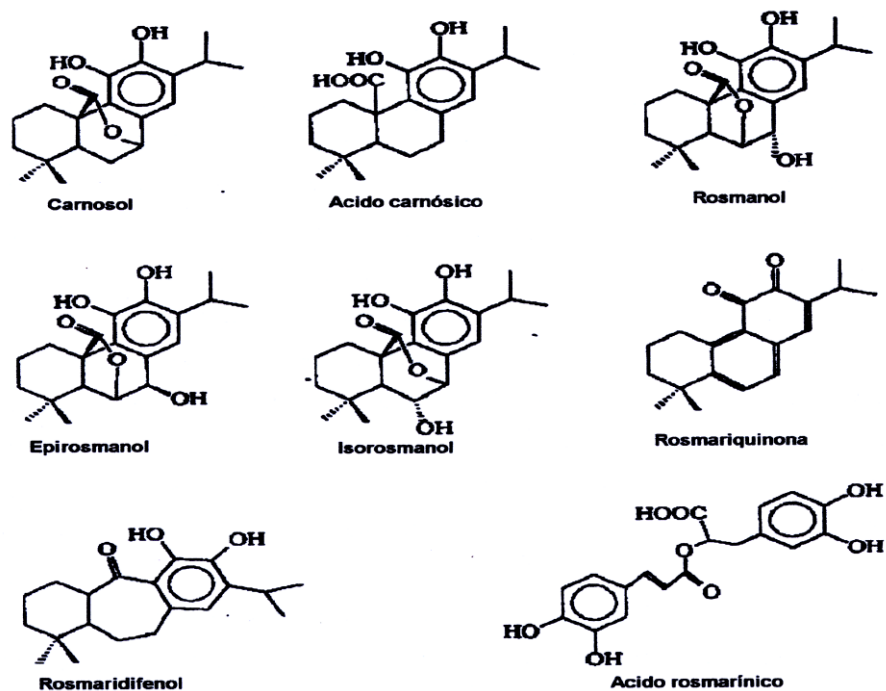


Figura 1.7. Componentes activos del extracto de romero

El ácido carnósico es relativamente inestable y se convierte en carnosol (más estable pero de menor actividad) durante los procesos tradicionales de producción de los extractos. Actualmente, los extractos se obtienen por extracción supercrítica -con CO₂ líquido-, proceso que evita estas reacciones.

La actividad antioxidante de los componentes del extracto de romero depende de la polaridad y estructura molecular de los mismos. El ácido rosmarínico, de mayor polaridad, se localiza en la fase acuosa de las emulsiones O/W por lo que, su interacción con los hidroperóxidos en la interfase raramente ocurren. En cambio, el ácido carnósico y carnosol de menor polaridad, se localizan en la interfase de las emulsiones O/W donde los hidroperóxidos se hallan en contacto con los agentes prooxidantes (Zheng y Wang, 2001).

El uso del extracto de romero como inhibidor de la oxidación lipídica en productos cárnicos ha sido profusamente documentada Djenane y col. (2003), Estévez y col. (2007), Mc Carthy y col. (2001 a y b), Ahn y col. (2002), Sebranek y col. (2005), Georgantelis y col. (2007). Riznar y col. (2006) determinaron el efecto de extracto de romero sobre la inhibición de la lipoperoxidación, el crecimiento microbiano y las propiedades sensoriales en salchichas de pollo.

Mc Carthy y col. (2001a), evaluaron la actividad antioxidante de diferentes extractos vegetales entre ellos extracto de romero y catequinas de té verde en hamburguesas crudas y cocidas de cerdo y compararon su efecto con antioxidantes sintéticos y vitamina E. Las concentraciones óptimas halladas por estos autores fueron de 0,1% para romero y 0,25% para extracto de té verde.

Estévez y col. (2006) estudiaron el efecto antioxidante del BHT y de aceites esenciales de salvia y romero sobre el almacenamiento refrigerado de patés de hígado de cerdo. Los aceites esenciales de salvia y romero son considerados GRAS y se adicionaron al 0,1%, concentración a la que exhiben la mayor actividad antioxidante.

Zheng y Wang (2001) han descrito la complejidad asociada al uso de hierbas y extractos vegetales como inhibidores de las reacciones oxidativas. El efecto de los compuestos fenólicos obtenidos a partir de diferentes hierbas y especias sobre la estabilidad oxidativa de alimentos es difícil de predecir ya que dicho efecto depende de las características de los lípidos presentes, las condiciones de la oxidación, la presencia de tocoferoles y otras sustancias activas que pueden llevar a efectos pro o antioxidantes.

Así, la actividad del extracto de romero puede verse afectada por los componentes de la matriz del alimento. Estévez y Cava (2006) estudiaron la efectividad del aceite esencial de romero como antioxidante en salchichas producidas con carne de cerdos ibéricos y cerdos blancos. El aceite esencial de romero inhibió el desarrollo de oxidación de lípidos en salchichas de cerdos ibéricos, mientras que en los productos obtenidos a partir de cerdos blancos se observó un efecto prooxidante. Estos autores concluyeron que las diferencias en cuanto a la composición de ácidos grasos y tocoferoles en los productos obtenidos a partir de los distintos tipos de animales podrían influir en la actividad desarrollada por el aceite esencial de romero.

Lee y col. (2006b) estudiaron el efecto de una mezcla de antioxidantes constituida por extracto de romero (secuestrante de radicales libres), citrato de sodio (quelante de metales) y eritorbato de sodio (agente reductor) sobre la oxidación lipídica en hamburguesas de pavo y embutidos de cerdo enriquecidos en ácidos grasos n-3. Estos autores observaron que la mencionada combinación de antioxidantes puede ser eficaz para minimizar la oxidación lipídica en dichos productos cárnicos.

Extracto de té verde (*Camellia sinensis* L.)

El extracto de té verde se obtiene de las hojas de *Camellia sinensis* L. (Figura 1.8). Los extractos de té verde contienen polifenoles con importantes propiedades medicinales. En China, el té verde se ha usado como hierba medicinal por más de 5000 años, no habiéndose informado efectos adversos (Yen y col., 1997).

Muchas investigaciones han sugerido que las propiedades antioxidantes de los polifenoles juegan un rol importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. El 93% del total de polifenoles del té verde está constituido por las catequinas, las cuales son flavonoides (Chen y col., 2009).



Figura 1.8. *Camellia sinensis* L.

Las catequinas del extracto de té verde actúan como secuestrantes de radicales libres, quelantes de metales e inhibidores de factores de transcripción y enzimas por lo que se han utilizado como antioxidantes, antivirales y antibacterianos. También se han descrito actividades anticarcinogénicas y antimutagénicas por lo que su utilización en alimentos, no sólo permite controlar la

oxidación sino que ofrece efectos benéficos para la salud. Poseen actividad biológica de quimioprotección sobre la iniciación y promoción de tumores (Higdon y Frei, 2003).

Los flavonoides son los más activos y diversos antioxidantes naturales. Su estructura básica está constituida por dos anillos bencénicos (A y B) combinados con un anillo piranósico (C). Los diferentes sustituyentes en el anillo C dan lugar a las distintas clases de flavonoides. Las catequinas son flavan-3-oles (con un hidroxilo en el C3 del anillo piranósico) que poseen además hidroxilos fenólicos en las posiciones 4' y 5' del anillo B, lo que proporciona actividad quelante de iones metálicos catalizadores de la oxidación lipídica y en las posiciones 5 y 7 del anillo A, actividad antioxidante (**Figura 1.9**).

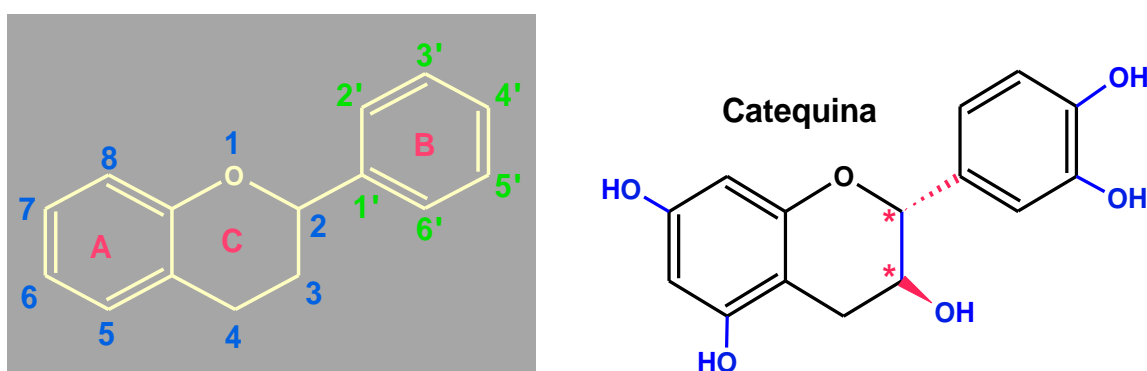


Figura 1.9. Estructura de las catequinas

Se han considerado varios mecanismos antioxidantes para los flavonoides, que pueden atrapar radicales libres ($\text{LOO}\cdot$ y $\text{LO}\cdot$) y especies reactivas de oxígeno ($\text{HO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$ y $^1\text{O}_2$), inactivar iones metálicos catalizadores y complejar proteínas. Exhiben sinergismo reduciendo y regenerando tocoferoles, ácido ascórbico y en emulsiones, se particionan de acuerdo a su polaridad. Las principales catequinas del té verde son galato de epigalocatequina (EGCG), epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG) y epicatequina (EC) (**Figura 1.10**).

La capacidad atrapante de radicales libres de las catequinas aumenta al aumentar el número de grupos hidroxilo en la molécula: EGCG > EGC > ECG > EC (Huang y Frankel, 1997). Las catequinas del té inhiben la formación de productos primarios de oxidación (hidroperóxidos) determinados mediante el índice de peróxidos (PV), siendo más efectivas que el α -tocoferol o el BHA.

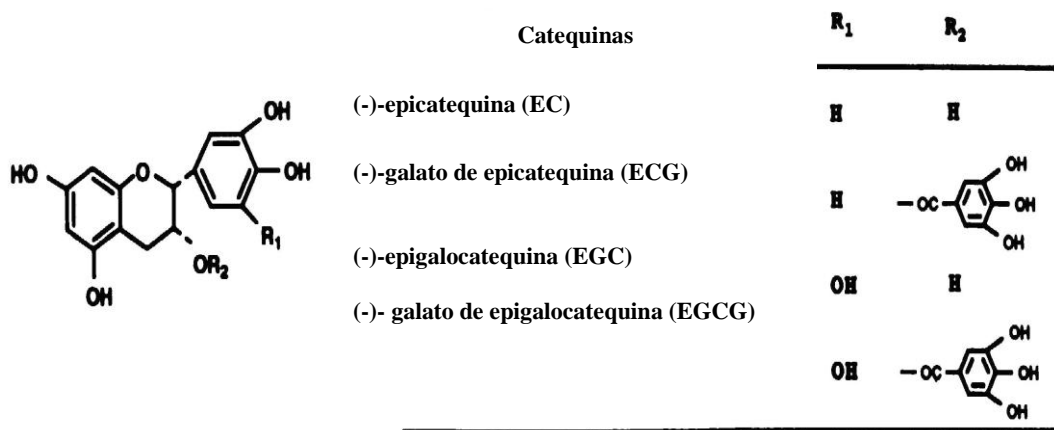


Figura 1.10. Catequinas del té verde (Shahidi, 1997)

Huang y Frankel (1997) han determinado que el efecto antioxidante de los compuestos fenólicos se ve influenciado por la composición característica del sistema alimentario y por la presencia de otras sustancias activas como los tocoferoles.

Los productos cárnicos procesados como salchichas y patés son muy complejos y el número y tipo de compuestos químicos presentes en la mezcla así como la particular combinación de dichos componentes puede ser diferente al comportamiento individual de los mismos. En sistemas con gran inestabilidad oxidativa la actividad de los compuestos fenólicos puede verse afectada ya que los mismos pueden experimentar oxidación y los productos de oxidación pueden actuar como prooxidantes. Además, la distinta composición de ácidos grasos afecta el estado físico de los lípidos y las características de textura, lo que puede influir sobre la dispersión y actividad antioxidante generando efectos diferentes.

El efecto antioxidante de la administración dietaria de catequinas de té verde sobre la peroxidación lipídica inducida por Fe, de músculo, hígado y corazón de pollo ha sido investigado por Tang y col. (2000). Dichos autores también evaluaron el efecto de la suplementación dietaria con catequinas sobre la calidad de la carne de pollo almacenada durante 9 meses a -20°C, registrando un impacto sobre su calidad comparable a la administración dietaria de α-tocoferol en iguales cantidades. Por ello, las catequinas de té verde son una alternativa para reemplazar la vitamina E como antioxidante dietario natural (Tang y col., 2001a). Asimismo, estudiaron el efecto antioxidante de la adición de catequinas de té

sobre la susceptibilidad a la lipoperoxidación de hamburguesas cocidas elaboradas con carne vacuna y porcina, carne de aves de corral (pollo, pavo y ñandú) y de pescado con 300mg/kg de catequinas de té. La susceptibilidad a la oxidación lipídica y el efecto antioxidante estuvieron estrechamente relacionados con el contenido de lípidos, el grado de insaturación de los mismos y el contenido de hierro de las carnes de las diferentes especies utilizadas (Tang y col., 2001b). Posteriormente Tang y col. (2006), evaluaron el efecto de la adición de catequinas de té verde en hamburguesas de carne vacuna almacenadas a 4 °C durante 7 días en condiciones aeróbicas y de atmósfera modificada (MAP), observando que las mismas fueron efectivas brindando estabilidad oxidativa en ambas condiciones de almacenamiento y logrando la estabilización del color, la que fue atribuida a la disminución de la oxidación de la mioglobina a metamioglobina.

El efecto del extracto de té verde sobre la calidad y seguridad de un embutido fermentado elaborado con carne de cordero y carne vacuna durante el periodo de maduración fue estudiado por Bozkurt (2006) quien observó que el extracto adicionado redujo los valores de TBARS, sin ocasionar variaciones de los parámetros de color.

1.2.4. Factores que afectan la oxidación lipídica en sistemas multifase

Los productos cárnicos procesados son sistemas multifase. La oxidación en dichos sistemas depende de la compleja interacción entre los constituyentes, los cuales pueden promocionar o inhibir la oxidación lipídica.

Las sustancias que catalizan la oxidación lipídica y los productos formados como resultado de este proceso están distribuidas entre las fases acuosa y lipídica. La localización de los antioxidantes dependerá de su solubilidad y polaridad. En sistemas multifase los antioxidantes particionan entre varios entornos incluyendo la fase acuosa, la fase lipídica y el entorno enriquecido en surfactante, de acuerdo a su relativa afinidad por dichas fases lo que modificará su efectividad.

La oxidación interfacial afecta gran número de alimentos que existen parcial o totalmente en forma de emulsiones. La oxidación de lípidos en alimentos multicomponentes es un fenómeno interfacial afectado por constituyentes pro y antioxidantes, el cual está fuertemente influenciado por las interacciones entre los

componentes lipídicos y acuosos y la interfase entre ellos. Se ha utilizado un gran número de sistemas modelo para estudiar la oxidación lipídica y su control; sin embargo, debe tenerse en cuenta que las interacciones interfaciales de los múltiples componentes en un alimento son sumamente complejas y es difícil extrapolar los resultados obtenidos en sistemas más simples. La oxidación interfacial es una reacción dependiente de la tasa de difusión de oxígeno y su interacción con lípidos insaturados, metales iniciadores, generadores de radicales y terminadores todos los que están distribuidos en los distintos compartimientos del sistema (Frankel, 2005)

1.3. Oxidación de proteínas en productos cárnicos

La oxidación de proteínas es un tópico emergente de creciente interés en las investigaciones referidas a productos cárnicos. Ha sido ampliamente estudiada en sistemas biológicos en relación a procesos patológicos y del envejecimiento (Dean y col., 1997; Dalle-Donne y col., 2003, Levine, 2002), pero en un grado muy limitado en relación a la calidad de los alimentos.

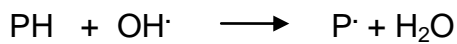
Los radicales de oxígeno están implicados en la modificación oxidativa de proteínas. Existen diversos tipos de modificación oxidativa de aminoácidos en proteínas, dentro de las cuales la formación de compuestos carbonílicos es reconocida como una de las modificaciones químicas más importantes de las proteínas oxidadas (Reznick y Packer, 1994).

Los mecanismos por los cuales las proteínas pueden ser afectadas por ROS son complejos y no están completamente dilucidados. Es escasa la información existente sobre la degradación oxidativa de proteínas y sus consecuencias en la calidad de los productos cárnicos y grasos. Por ello, el conocimiento de la oxidación de proteínas, los efectos adversos sobre la calidad de los productos cárnicos y la efectividad de las estrategias antioxidantes para prevenir la oxidación proteica requieren continuar siendo investigados.

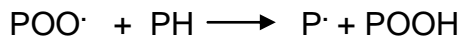
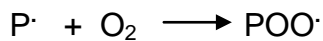
Con respecto al mecanismo de la oxidación de proteínas, numerosas ROS (anión superóxido, hidroxil radical, peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos) han sido reconocidos como potenciales iniciadores de la oxidación de proteínas. Otros componentes presentes en los tejidos animales tales como lípidos insaturados y

sus productos de oxidación, hemopigmentos y metales de transición son potenciales precursores o catalizadores de la formación de ROS y juegan así un rol relevante en la iniciación de la oxidación de proteínas (Estévez, 2011).

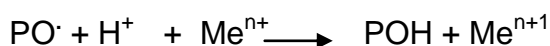
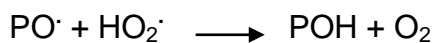
Las uniones peptídicas y los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos son generalmente el blanco de las ROS, como consecuencia de la sustracción de átomos de hidrógeno para formar radicales proteicos (P[•]).



La posterior reacción del radical proteico con el oxígeno genera radicales peroxilo (POO[•]), los que al reaccionar con otras moléculas proteicas generan nuevos radicales propagando la reacción en cadena de radicales libres y generando hidroperóxidos proteicos (POOH).



Los hidroperóxidos proteicos formados (POOH) pueden reaccionar con hidroxil radicales (HO₂[•]) o metales de transición (Fe²⁺ o Cu¹⁺) llevando a la formación de alcoxil radicales (PO[•]).



La oxidación de proteínas es un fenómeno complejo y tanto la ruta como la naturaleza química de los productos finales de oxidación dependen del sistema oxidante y de las condiciones de oxidación.

Las modificaciones oxidativas de las cadenas laterales de aminoácidos específicos y/o la ruptura de las cadenas peptídicas pueden conducir a la fragmentación de las cadenas peptídicas y a la formación de entrecruzamientos inter e intramoleculares (“cross-linking”) que son atribuidos a la formación de puentes disulfuro y de ditirosina (Lund y col., 2007).

Ciertos aminoácidos como cisteína y metionina son más fácilmente oxidables aún a bajas concentraciones de ROS, estos aminoácidos actúan

secuestrando ROS y protegiendo a otros aminoácidos susceptibles.

Los carbonilos (aldehídos y cetonas) se pueden formar por 4 rutas diferentes: a) la oxidación directa de las cadenas laterales de treonina, lisina, arginina y prolina, b) la glicosilación en presencia de azúcares reductores; c) la ruptura oxidativa de las uniones peptídicas y d) la unión covalente a compuestos carbonílicos derivados de la oxidación de lípidos como el malonaldehído o 4-hidroxinonenal (Oliver y col., 1987; Stadtman, 1993).

La formación de carbonil derivados a partir de treonina, lisina, arginina y prolina es atribuida a la oxidación catalizada por metales y conducen a la formación de ácido α -amino-3-cetobutírico, semialdehído aminoadípico y semialdehído γ -glutámico respectivamente que representan el 70 % del total de carbonilos proteicos en los productos cárnicos (Utrera y col., 2011).

Además de los metales de transición, otros compuestos naturales de los sistemas cárnicos tales como la mioglobina promueven la formación de compuestos carbonílicos. La metamioglobina en presencia de peróxido de hidrógeno forma especies hipervalentes, ferril-mioglobina (Fe IV), un iniciador de la oxidación de lípidos y de proteínas (Park y Xiong, 2007).

Además de la presencia de metales de transición, mioglobina y lípidos oxidados, la oxidación de proteínas es afectada por numerosos factores: pH, temperatura, actividad acuosa (a_w), luz, radiaciones y presencia de compuestos fenólicos.

Los compuestos carbonílicos generados por la oxidación de proteínas pueden participar en reacciones posteriores tales como la oxidación de los grupos aldehído a ácidos carboxílicos, la condensación aldólica con otros aldehídos, la formación de bases de Schiff con grupos ϵ -amino de lisina por lo cual, el incremento inicial de grupos carbonilos puede ir acompañado de un descenso posterior de los mismos por estas reacciones.

La cuantificación de carbonilos proteicos utilizando la técnica de dinitrofenilhidrazina (DNPH) es el método más frecuentemente utilizado para estudiar la oxidación de proteínas en productos cárnicos y sistemas biológicos (Levine y col., 1994).

Los cambios oxidativos de las proteínas pueden conducir a diversas alteraciones funcionales. Estudios en sistemas modelo y en alimentos han

mostrado que el daño oxidativo de proteínas puede afectar sus propiedades funcionales: solubilidad, estabilidad térmica, microestructura, capacidad de gelificación, capacidad de retención de agua (WHC), textura (Estévez y col., 2006; Estévez y Cava, 2006).

La oxidación de proteínas puede producir además la pérdida de aminoácidos esenciales (valor nutricional) y afectar las propiedades organolépticas del alimento. En productos cárnicos, la oxidación de proteínas reduce la calidad ya que disminuye la terneza, la jugosidad y aumenta el deterioro del flavor así como la pérdida de color.

Si bien muchos estudios confirman la actividad antioxidante de los extractos vegetales que contienen polifenoles sobre los lípidos en distintos sistemas alimenticios, su rol en relación a la oxidación de proteínas ha sido poco estudiada. Lund y col. (2007) estudiaron el efecto del extracto de romero (500 ppm, Guardian con 4,4% de fenólicos) y de una mezcla ascorbato:citrato 1:1 en hamburguesas almacenadas bajo atmósfera modificada. Los resultados obtenidos indicaron que ambos sistemas antioxidantes tuvieron un efecto protector estabilizando el color y aumentando la estabilidad oxidativa de los lípidos aunque sin modificaciones en la oxidación de proteínas. Estos hallazgos sugirieron que los radicales proteicos son más reactivos y que la oxidación de proteínas no sigue el mismo mecanismo que la oxidación de lípidos. El efecto de los antioxidantes sobre la oxidación de proteínas depende de la matriz del alimento, del tipo de proteínas presentes y de la presencia de iones metálicos.

1.4. Degradación oxidativa del grupo hemo

Los productos cárnicos son generalmente una excelente fuente de hierro, un nutriente esencial para el mantenimiento de la buena salud. El hierro es requerido para la síntesis de hemoglobina, mioglobina y ciertas enzimas, por lo que la captación dietaria es de suma importancia. El hierro está presente en la dieta en dos formas: Fe hemínico (HI) y Fe no hemínico (NHI). Los vegetales y productos lácteos contienen sólo NHI mientras que las carnes rojas, aves de corral y pescado contienen ambos tipos de hierro (Clark y col., 1997). La absorción de Fe dietario ocurre por distintos mecanismos según las diferentes formas del hierro. El HI se absorbe como un complejo intacto Fe-porfirina, luego el

Fe se libera dentro de las células de la mucosa intestinal por acción de la enzima hemoxygenasa. La absorción no es afectada por la composición de la dieta y es altamente disponible. La biodisponibilidad del NHI en cambio, es fuertemente influenciada por una variedad de sustancias que incrementan o inhiben su absorción, siendo su disponibilidad muy baja (Schricker y col., 1982).

Las etapas de procesamiento y conservación de los productos cárnicos (cocción, congelación, etc) puede alterar la relación entre estas formas del hierro en detrimento del hierro hemínico (Turhan y col., 2004, Ramos y col., 2009). La cocción causa la liberación del Fe de las hemoproteínas (Schricker y col., 1983).

El contenido de NHI puede incrementarse por liberación del mismo a partir del grupo hemo de la mioglobina y hemoglobina, como consecuencia del procesamiento térmico y del almacenamiento. Esta variación puede producir cambios en el color de los productos cárnicos cocidos durante el almacenamiento refrigerado (Estévez y Cava, 2004; Lombardi-Boccia y col., 2002a y b).

En la hemoglobina y la mioglobina, el Fe^{2+} se une a los átomos de nitrógeno de los 4 anillos pirrólicos de la estructura porfirínica y a un nitrógeno del aminoácido histidina de la globina, la sexta valencia de coordinación del Fe se une al O_2 (oxihemoglobina y oximioglobina de color rojo) o bien al H_2O (desoxihemoglobina y desoximioglobina de color púrpura). Por oxidación, se produce la metahemoglobina y metamioglobina (Fe^{+3}) de color marrón (**Figura 1.12**).

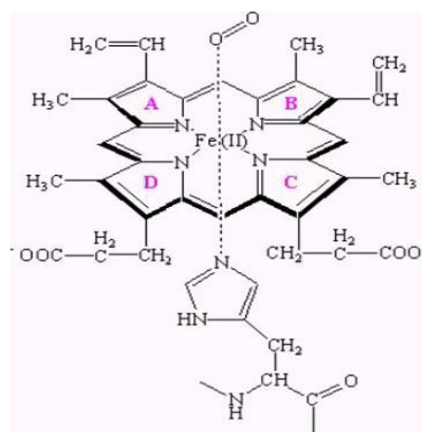


Figura 1.12. Estructura del grupo hemo de la oxihemoglobina y de la oximioglobina

Con respecto a los promotores de la oxidación en alimentos de origen animal, el hierro posee la mayor actividad catalítica. El NHI es considerado el promotor más importante de oxidación en sistemas cárnicos, por lo que el

conocimiento de las proporciones de las formas químicas del hierro es de gran importancia ya que hay fuertes diferencias entre el HI y el NHI en términos de promoción de la lipoperoxidación y biodisponibilidad. El NHI es el promotor más importante de la oxidación lipídica, mientras que el HI posee una mayor biodisponibilidad.

El efecto catalizador de los metales como iniciadores de la oxidación lipídica en presencia de hidroperóxidos preformados ha sido previamente descrito. En sistemas lipídicos, los metales se ubican en la interfase aceite-aire; en cambio, en las emulsiones se orientan en la interfase aceite-agua o en la solución acuosa. Estos metales forman complejos con el grupo carboxilo de los ácidos grasos libres presentes. Los metales descomponen los hidroperóxidos, siendo el Fe^{2+} mucho más efectivo que el Fe^{3+} o el cobre.

Algunos hemocompuestos son más efectivos que los iones metálicos libres para descomponer los hidroperóxidos con la formación resultante de radicales alcoxilo los cuales son activos iniciadores de la lipoperoxidación (Ahn y Kim, 1998). Cuando estas proteínas se desnaturalizan aumenta su actividad prooxidante. Así, la mezcla de Fe libre y de proteínas desnaturalizadas por el calor constituye un efectivo catalizador no enzimático de la lipoperoxidación.

Existe una interacción entre la oxidación lipídica y la oxidación de los hemopigmentos. Los radicales libres producidos por oxidación lipídica pueden iniciar las reacciones de oxidación de la oximioglobina a metamioglobina. Además, el H_2O_2 activa la metamioglobina para formar radicales ferril-mioglobina, los cuales son catalizadores de la oxidación lipídica en el músculo (Cheng y col., 2007).

Fernández-López y col. (2003) estudiaron la capacidad del extracto de romero para inhibir la oxidación lipídica, la formación de metamioglobina y estabilizar el color en carne de cerdo cocida. Asociado al desarrollo de reacciones oxidativas en productos cárnicos cocidos, la ruptura de la molécula del hemo y la subsecuente liberación del hierro del anillo de la porfirina ocurre como consecuencia de las altas temperaturas durante la cocción y el desarrollo de reacciones oxidativas durante el almacenamiento (Lombardi- Boccia y col., 2002a y b; Schricker y col., 1983). Purchas y col. (2004) estudiaron las variaciones de las

formas de Fe durante el almacenamiento refrigerado de carne vacuna y de cordero y aportaron resultados similares.

Estévez y col. (2006) hallaron correlaciones significativas entre NHI y TBARS así como NHI y carbonilos lo que sugiere que el deterioro oxidativo de proteínas también podría promover la degradación del grupo hemo y la subsecuente liberación del Fe.

1.5. Factores que afectan el deterioro oxidativo en patés de hígado

La vida útil y la calidad de los productos cárnicos cocidos están fuertemente influenciadas por las características de las materias primas, las condiciones de procesamiento y conservación y los aditivos empleados en su elaboración.

Los patés o pastas de hígado son productos procesados que contienen una gran diversidad de ingredientes tales como hígado, grasa, carnes, especias y aditivos, los cuales son finamente procesados a fin de obtener una pasta fina. Si bien estos productos no son verdaderas emulsiones, sus cualidades están altamente asociadas a una buena combinación de grasa, agua y proteínas solubles, las que actúan como agentes emulsificantes. Estos productos, son altamente susceptibles al deterioro de su calidad como consecuencia de la oxidación lipídica debido a su composición y al proceso utilizado en su manufactura (Estévez y Cava, 2004).

Los patés de hígado tienen altos contenidos de hierro y grasa, por lo que pueden sufrir deterioro durante su almacenamiento dependiendo de las características y cantidad de la materia grasa utilizada en su manufactura. El daño oxidativo tiene gran impacto en la calidad del alimento a nivel nutricional, organoléptico y funcional. Las diferencias entre los patés en términos de su composición de ácidos grasos y "status" antioxidante pueden influir en la susceptibilidad que presenten al deterioro oxidativo durante el almacenamiento refrigerado.

En alimentos procesados, un gran número de etapas de procesamiento pueden influir en dicho deterioro incluyendo el procesamiento mecánico, el

tratamiento térmico, el secado, la fermentación, las condiciones de almacenamiento y de envasado.

1.5.1. Procesamiento mecánico

En los productos cárnicos procesados la oxidación lipídica se acelera cuando la estructura de los tejidos se rompe por picado o molido exponiendo los fosfolípidos de membrana al oxígeno, a los hemopigmentos y a los iones metálicos. Así, cuando la integridad celular se pierde, se produce un desequilibrio entre la actividad pro y antioxidante, en favor de la primera. El procesamiento mecánico de las carnes además, genera la incorporación de aire (O₂) al sistema, lo que contribuye a generar un entorno prooxidante.

Los patés son productos altamente procesados en los que el picado, mezclado y maceración de los tejidos libera lipasas que son responsables de la producción de ácidos grasos libres, susceptibles al daño oxidativo.

1.5.2. Tratamiento térmico

La cocción incrementa los niveles de oxidación ya que las altas temperaturas disminuyen la energía de activación asociada a las reacciones de oxidación, degradando hidroperóxidos preformados los cuales propagan las reacciones en cadena.

Los productos cárnicos cocidos son más susceptibles a la oxidación lipídica que las carnes crudas durante el almacenamiento refrigerado debido a que las operaciones de calentamiento alteran el balance endógeno de sustancias prooxidantes y antioxidantes, promoviendo la oxidación de la mioglobina con la consecuente liberación del hierro de los hemopigmentos, principal catalizador de la oxidación lipídica en productos cárnicos cocidos. Además, mediante la cocción, los productos cárnicos se tornan más vulnerables a la oxidación ya que las enzimas antioxidantes tales como catalasa o superóxido dismutasa (SOD) se desnaturalizan y pierden su actividad. La oxidación de los PUFAs genera productos de degradación tales como aldehídos, cetonas y alcoholes los que pueden conducir a la generación de flavors indeseables (Lee y col., 2006a).

En este sentido, a fin de reducir la oxidación lipídica, la industria alimentaria está desarrollando nuevas tecnologías en el procesamiento de carnes por vías no

oxidativas; por ejemplo, a través de la aplicación de altas presiones. Esta tecnología no es aplicable a carnes frescas ya que provoca cambios de color en cambio, puede utilizarse en productos enlatados o curados siendo un área de desarrollo de nuevos productos denominados “ready to eat” o listos para comer, con un alto valor agregado (Beltrán y col., 2003).

1.5.3. Efecto de los aditivos utilizados en la elaboración de patés

a) Acción del NaCl

El NaCl se adiciona a los productos cárnicos con una amplia variedad de propósitos, entre ellos preservar y saborizar los alimentos. Usualmente se adiciona entre 2 a 3% en productos cárnicos curados, donde inhibe el crecimiento microbiano, contribuye al flavor y extrae proteínas solubles en solución salina. Las proteínas solubles expulsadas del tejido muscular con el agua sirven de ligantes en las pastas cárnicas cocidas.

El efecto prooxidante del NaCl ha sido ampliamente descrito (Cheng y col., 2007; Rhee y col., 2001). Se ha demostrado que el NaCl en concentraciones entre 1 y 2% acelera la oxidación lipídica en una variedad de productos cárnicos de cerdo y vaca (Sakai y col., 2004), mientras que concentraciones mayores inhiben el daño oxidativo.

Según Beltrán y col. (2003 y 2004), el NaCl es un importante agente prooxidante en los productos cárnicos por varias razones: promueve la liberación del Fe de las macromoléculas que lo contienen tales como la mioglobina proporcionando iones Fe libres para actuar como catalizadores de la oxidación lipídica, provoca daño en las membranas celulares exponiendo a los fosfolípidos que las integran y disminuye la actividad de enzimas antioxidantes.

b) Acción de nitritos y nitratos

Diversos productos cárnicos son formulados usando aditivos tales como nitritos y nitratos. Los nitritos se utilizan para dar color, flavor y seguridad a los alimentos ya que tienen acción bacteriostática, proporcionando una protección específica contra *Clostridium botulinum*. Si bien los nitritos adicionados a las emulsiones cárnicas sufren una serie de reacciones, de modo que el contenido residual es solo una fracción de la cantidad adicionada, los potenciales riesgos

para la salud relacionados con dicho nivel residual hacen necesario disminuir las cantidades utilizadas (Doolaeye y col., 2012). La desventaja del uso de nitritos en carnes está asociada a la formación de N-nitrosaminas, tales como la N-nitroso dimetil amina, agentes cancerígenos que provocan lesiones graves en el hígado, riñón y esófago. Las carnes curadas pueden contener nitrosaminas o formarse durante la cocción (Pinho y col., 1998; Rincón y col., 2003).

Sin embargo, la utilización de nitrito como aditivo es importante principalmente por su efecto antibotulínico pero también por su rol en la formación del color, desarrollo del flavor y protección contra la oxidación (Juncher y col., 2000).

Los nitritos y nitratos son reducidos a óxido nítrico (NO) por agentes reductores tales como el ácido ascórbico (AH₂) (**Figura 1.13**). El óxido nítrico reacciona con los hemopigmentos tales como la mioglobina (Mb) o la hemoglobina formándose nitroso derivados de color rosado, los que se estabilizan durante el tratamiento térmico. Dicho color se fija y estabiliza por calentamiento (Seyfert y col., 2004; Bloukas y col., 1999).

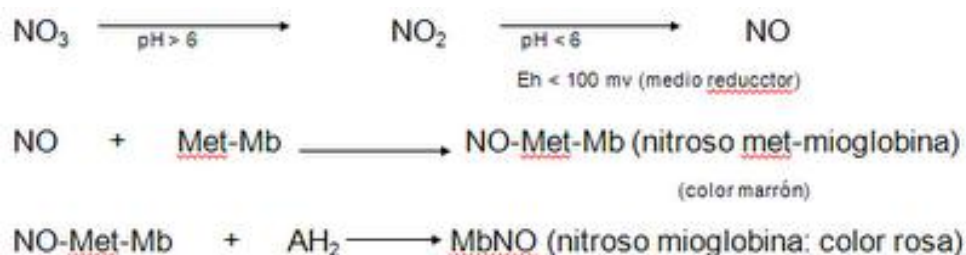


Figura 1.13. Acción del nitrito sobre los hemopigmentos

El NaNO₂ que se utiliza como agente de curado y como preservativo del color en carnes procesadas curadas tiene además, un efecto inhibitor de la lipoperoxidación. La adición de nitritos retarda la oxidación e inhibe el desarrollo de WOF en carnes cocidas almacenadas; los nitrosil derivados formados poseen actividad antioxidante (Frankel, 2005). Se han sugerido varios mecanismos para explicar la actividad antioxidante del nitrito: inhibe la lipoperoxidación hemocatalizada por complejarse con las Fe-porfirinas, es quelante de metales catalizadores y forma complejos inactivos con el Fe no hemínico.

c) Acción del ácido ascórbico

Los ácidos ascórbico e isoascórbico y sus derivados se utilizan como coadyuvantes del curado de los productos cárnicos, son útiles para mejorar y retener el color de los productos curados. Mediante su acción, se acelera la reacción del curado y el color se hace más homogéneo. El ascorbato es un agente reductor que reduce la Met-Mb a Mb e incrementa la reducción del NO_2^- a NO.

El ácido ascórbico, ampliamente utilizado como aditivo alimentario, inhibe la formación de metamioglobina y la lipoperoxidación en productos cárnicos (Beltrán y col., 2004). Actúa regenerando antioxidantes primarios, inactivando metales prooxidantes, secuestrando radicales libres y es un agente prooxidante en presencia de Fe y H_2O_2 o hidroperóxidos. El ácido ascórbico es un antioxidante natural que secuestra O_2 y protege las dobles ligaduras de los ácidos grasos, además actúa como agente reductor.

Perlo y col. (1995) estudiaron la evolución de diferentes parámetros fisicoquímicos (color, TBARS) en patés de hígado de cerdo con y sin la adición de ascorbato de sodio, almacenados en gabinetes iluminados. El ascorbato de sodio mostró un efecto protector sobre el mecanismo de fotooxidación. La coloración típica de los productos cárnicos cocidos curados es debida a los pigmentos mono y dinitrosilhemocromos; cuando los mismos se oxidan se transforman en hemicromos de color marrón grisáceo. La exposición del paté al aire y a la luz durante su comercialización produce una serie de alteraciones de sus componentes, principalmente grasas y pigmentos reduciendo la calidad del producto. El ascorbato se adiciona a los patés para asegurar una mejor permanencia del color durante la comercialización y almacenamiento del producto en gabinetes expuestos a la luz, donde pueden inducirse los procesos de fotooxidación.

d) Acción de los fosfatos

Los fosfatos son utilizados en los productos cárnicos procesados ya que retienen humedad aumentando la jugosidad y disminuyendo las pérdidas por cocción. Generalmente se adicionan al 0,5 % en las formulaciones (Muguruma y

col., 2003). Su principal uso está asociado al incremento de la capacidad de retención de agua con el consecuente aumento del rendimiento tecnológico y efectos favorables sobre la textura.

Los fosfatos se utilizan además como ingrediente básico para incrementar el pH y la fuerza iónica y como quelantes de metales catalizadores de la peroxidación lipídica, razón por la cual presentan actividad como antioxidantes preventivos (Beltrán y col., 2004).

Cheng y Ockerman (2003) demostraron que el uso de tripolifosfato de sodio 0,5% como quelante del hierro puede ser una estrategia para reducir la formación de TBARS en carne precocida. Vasavada y col. (2006) evaluaron el efecto antioxidante de los fosfatos en carne vacuna picada, cocida observando que la combinación de romero y fosfatos permitió disminuir los valores de TBARS.

e) Efecto de proteínas emulsificantes

En las emulsiones cárnicas las gotas de grasa se dispersan en la fase acuosa continua, dichas emulsiones se estabilizan por la acción de agentes emulsificantes, los cuales son moléculas anfipáticas (con zonas hidrofóbicas e hidrofílicas) que se localizan en la interfase donde disminuyen la tensión superficial y facilitan la fina dispersión de una fase en la otra. Los emulsificantes pueden ser de naturaleza proteica (caseína, proteínas de soja, huevo, suero de leche), fosfolípidos o surfactantes. Silva y col. (2003) utilizaron globina de cerdo (proteína sanguínea) o caseinato de sodio como agentes emulsificantes en patés de jamón. La globina posee buenas propiedades funcionales y un excelente perfil de aminoácidos esenciales por lo que puede ser utilizada en la industria alimentaria en reemplazo de la caseína por su bajo costo y por ser un ingrediente afín a los productos cárnicos.

Las proteínas emulsificantes forman un film o membrana proteica que recubre las gotas de grasa en las emulsiones y puede afectar el proceso de oxidación lipídica ya que forman una barrera protectora a la penetración y difusión de metales o radicales iniciadores de la oxidación lipídica. Coronado y col. (2002), estudiaron el efecto antioxidante de suero lácteo (subproducto de la industria quesera) y extracto de romero en salchichas almacenadas congeladas durante 10 meses.

Los caseinatos tienen propiedades emulsificantes importantes y son utilizados en embutidos cárnicos cocidos debido a que recubren las partículas de grasa y producen una muy fuerte unión entre los componentes de la emulsión, por lo tanto pueden aumentar la consistencia y la dureza del producto. Paralelamente, los caseinatos tienen una estructura proteica con zonas hidrofóbicas e hidrofílicas, las que le confieren capacidad de retener agua y formar soluciones viscosas caracterizadas por su gran adhesividad.

Las proteínas modificadas por la transglutaminasa bacteriana adquieren una mayor actividad emulsificante, lo que permite reducir el contenido de fosfatos en los productos cárnicos procesados (Muguruma y col., 2003; Kilic, 2003).

El caseinato de sodio es una mezcla soluble constituida por cuatro tipos de proteínas (α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -caseínas), las cuales son ampliamente utilizadas en alimentos debido a su gran valor nutricional y propiedades emulsificantes (O'Regan y Mulvihill, 2009). Las proteínas emulsificantes como la caseína, tienen un efecto interfacial complejo sobre la oxidación de lípidos. Luego de saturar la interfase, las proteínas a altas concentraciones, permanecen en la fase acuosa y pueden retardar la oxidación de los lípidos. La membrana proteica que rodea las gotas de grasa puede restringir la penetración y difusión de radicales iniciadores a la fase lipídica. A ciertas concentraciones, cuando las proteínas están dispersas en la fase acuosa pueden secuestrar radicales libres o ser preferencialmente oxidadas, retardando la oxidación de lípidos. Las proteínas con grupos sulfhidrilo son particularmente efectivas como antioxidantes en productos lácteos, carnes y pescados.

Las proteínas pueden inhibir la oxidación en emulsiones por varios mecanismos: generando repulsión electrostática, quelando metales promotores de la oxidación lipídica, formando una barrera física que evita la difusión de radicales libres o reduciendo hidroperóxidos a través de los aminoácidos que presentan grupos sulfhidrilo en su cadena lateral. Los grupos fosfato unidos al aminoácido serina en la caseína se comportan como quelantes de metales y secuestrantes de radicales libres.

f) Efecto de la adición de antioxidantes en patés

A fin de resguardar los atributos de calidad y aceptabilidad por parte de los

consumidores, así como extender la vida útil de los patés se ha estudiado la adición de diversos antioxidantes naturales y sintéticos (Estévez y col., 2006 y 2007).

Diversos compuestos antioxidantes sintéticos se caracterizan por ser fácilmente accesibles y tener una buena actividad antioxidante. Por ello se han usado a fin de evitar el deterioro de la calidad de los patés de hígado. No obstante, dichos compuestos han sido cuestionados desde el punto de vista toxicológico. Así, en la literatura se han descrito efectos carcinogénicos por altas concentraciones de BHA y BHT en ratas. Pinho y col. (2000) investigaron la presencia de antioxidantes sintéticos en patés de hígado de distinto origen (cerdo y aves) disponibles en Portugal a nivel comercial. Se determinaron diversos antioxidantes sintéticos BHA, BHT, PG, octilgalato (OG), dodecilgalato (DG), TBHQ y ácido nordihidroguaiarético (NDG). Estos dos últimos fueron de amplio uso en la década del 50 y 60 aunque actualmente no están permitidos en la Unión Europea.

El efecto del extracto de romero en patés de hígado de cerdo con reducido nivel de nitritos fue estudiado por Doolaee y col. (2012). Estos autores concluyeron que el ácido carnósico, presente en el extracto de romero, actúa como donador de hidrógenos regenerando otros antioxidantes. La interacción con otros antioxidantes presentes en el producto tales como el ácido ascórbico y los tocoferoles produce un efecto sinérgico.

1.6. Objetivos

Considerando el impacto asociado a la comercialización de este tipo de producto, la revalorización de sustratos provenientes de fuentes naturales subutilizadas, así como la sustitución de ingredientes principales para obtener productos más saludables, es importante contemplar la potencial utilización de otras fuentes de lípidos así como implementar diversas metodologías que promuevan el desarrollo de productos de mejor calidad realizando consiguientemente, su adecuada caracterización. Es importante señalar que los componentes presentes en el aceite de girasol, en términos de su composición ácida (especialmente su tenor de ácidos oleico y linoleico) y de antioxidantes

naturales (tocoferoles), pueden intervenir como ingredientes alimentarios siendo además muy interesantes por su rol fisiológico, especialmente a nivel cardiovascular, de acuerdo a lo comentado previamente.

En virtud de lo expuesto, en el presente trabajo de Tesis de Maestría se propone desarrollar el siguiente objetivo general y los correspondientes objetivos específicos:

Objetivo general

Desarrollo y conservación de patés de hígado de pollo mediante la aplicación de alternativas tecnológicas para la obtención de alimentos más saludables.

Objetivos específicos

- Obtención de patés con reducción del tenor lipídico y reemplazo de la fase grasa por aceite de girasol
- Caracterización de los productos obtenidos en cada caso, analizando la composición centesimal y el perfil de ácidos grasos
- Evaluación del posible deterioro oxidativo de lípidos y de proteínas en las distintas formulaciones de patés de hígado de pollo y el análisis del efecto de la adición de antioxidantes naturales (extractos de romero y de té verde) durante el almacenamiento refrigerado
- Estudio del posible desarrollo microbiano de los productos a fin de evaluar su calidad microbiológica
- Evaluación de la calidad organoléptica mediante el seguimiento de parámetros tales como el color, textura y microestructura de las distintas formulaciones estudiadas
- Análisis del perfil de aroma de los patés mediante nariz electrónica
- Determinación de la aceptabilidad de los productos desarrollados por medio de paneles sensoriales

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Formulación de los patés

En este trabajo de Tesis, los patés de hígado de cerdo se han tomado como referencia para desarrollar productos similares elaborados con subproductos de la industria avícola. Si bien existen publicaciones que estudian diferentes aspectos de los patés, es escasa la información referida a patés de hígado de pollo. Los patés de hígado de cerdo se elaboran con tocino el cual aporta altos niveles de colesterol. La sustitución del tocino por aceites vegetales como fase grasa que no aportan colesterol y poseen un mejor perfil de ácidos grasos permitirá la obtención de productos más saludables.

Se formularon 4 tipos de paté de hígado de pollo con diferente tipo (tocino o aceite de girasol) y proporciones de fase grasa, los cuales fueron preparados con o sin la adición de antioxidantes naturales. Los patés con un contenido reducido de grasa se elaboraron con una disminución del 30% con respecto a la formulación tradicional, reemplazándola por hígado de pollo. Las cuatro formulaciones se detallan a continuación:

1. Paté (formulación tradicional): Toc40 (tocino 40% p/p + hígado 28% p/p)
2. Paté con reemplazo del tipo de fase grasa: Gir40 (aceite de girasol 40% p/p + hígado 28% p/p)
3. Paté con reducción del contenido de grasa: Toc28 (tocino 28% p/p + hígado 40% p/p)
4. Paté con reducción y reemplazo del tipo de fase grasa: Gir28 (aceite de girasol 28% p/p + hígado 40% p/p)

Los demás ingredientes se adicionaron en igual concentración para todas las formulaciones, por cada 100 g de producto: pechuga de pollo 5,00 g; agua destilada 23,00 g; caseinato de sodio 2,00 g; cloruro de sodio 2,00 g; fosfato de sodio 0,30 g; ácido ascórbico 0,05 g; nitrito de sodio 0,03 g.

2.2. Materias primas empleadas

Para la formulación de los patés ensayados se utilizaron las siguientes materias primas:

a) pechugas e hígados de pollo: se obtuvieron del mercado local, provenientes de un establecimiento avícola con adecuadas condiciones higiénico-sanitarias de acuerdo a la legislación vigente, lo que garantizó la calidad de las piezas.

b) tocino (tejido adiposo de la región dorso lumbar y papada de cerdo): se obtuvo de un comercio local

c) aceite de girasol (Natura, Aceitera General Deheza S.A.)

d) caseinato de sodio (Biomedicals)

e) extracto de romero (GUARDIAN™ Rosemary extract 09 líquido dispersable en agua con 4% de diterpenos fenólicos), provisto por Danisco

f) extracto de té verde (GUARDIAN™ Green Tea Extract 20S/20M, maltodextrina y sal empleados como vehículo, conteniendo 20% de catequinas) provisto por Danisco

Todos los reactivos químicos empleados fueron de grado analítico.

2.3. Proceso de manufactura de los patés

Para cada tipo de paté se utilizaron 4,5 kg de material crudo en 4 procesos de producción independientes. Previo a la manufactura, el tocino fue cortado en cubos de aproximadamente 1,5 cm³ siendo escaldado a 65°C durante 30 min. El hígado y el músculo libres de tejido conectivo y grasa fueron cortados en cubos de 1,5 cm³, siendo posteriormente lavados con agua clorada y mezclados con NaCl, NaNO₂ y ácido ascórbico a fin de lograr la nitrificación de los tejidos. La grasa escaldada y la mezcla nitrificada fueron almacenadas a 4 ± 1°C, en oscuridad hasta el día siguiente.

Previo a la producción de los patés, la materia grasa (tocino o aceite de girasol) fue preemulsificada con el caseinato de sodio disuelto en agua destilada a 75°C. La grasa escaldada se mezcló con el caseinato de sodio disuelto en agua y fue homogeneizada (procesadora Moulinex, Francia) durante 3 min. Luego se procedió a la adición de la mezcla nitrificada junto con fosfato de sodio, mezclándose en procesadora, a velocidad máxima durante 3 min hasta obtener

una masa homogénea.

Cada tipo de paté de 4,5 kg se dividió en tres partes iguales de 1,5 kg: a) paté sin adición de antioxidantes, b) paté con adición de 1000 ppm de extracto de romero (formulaciones -R) y c) paté con adición de 500 ppm de extracto de té verde (formulaciones -T). Finalmente, las distintas mezclas a, b y c fueron homogeneizadas durante 1 min en procesadora Moulinex a velocidad máxima, siendo envasadas en frascos de vidrio de 4 cm de diámetro y 6 cm de alto con aproximadamente 80 g de paté cada uno.

2.4. Tratamiento térmico

Los patés envasados fueron sometidos a un tratamiento térmico en autoclave vertical de acero inoxidable con generación interna de vapor (**Figura 2.1**). Para ello los envases se dispusieron en tres niveles, siendo los mismos separados por medio de planchas metálicas con orificios que permiten la circulación del vapor en el interior del autoclave.



Figura 2.1. Autoclave utilizado para el tratamiento térmico y equipo de control de temperatura durante la manufactura de patés de hígado de pollo

La temperatura dentro del autoclave y en el producto fue medida utilizando termocuplas Cu-Constantan tipo T. A fin de colocar la termocupla en el centro geométrico de uno de los frascos de paté, las tapas metálicas utilizadas fueron perforadas en su centro y luego selladas con pegamento epoxi para altas

temperaturas, lográndose así condiciones de hermeticidad. El recipiente utilizado para colocar la termocupla fue el que se encontraba en el centro del autoclave, lugar más desfavorable para la transmisión de vapor y por consiguiente, del calor. De esta manera se logró un correcto tratamiento térmico para todos los envases. Los sensores de temperatura se conectaron a un adquirente de datos Keithley DASTC, (USA) y a una computadora personal siendo el intervalo de registro de datos de 15 seg en todos los casos.

El proceso consistió de tres etapas:

a) *Calentamiento*: periodo en el cual la temperatura del autoclave aumentó desde la temperatura ambiente a la temperatura final en el producto de $80 \pm 2^\circ\text{C}$.

b) *Mantenimiento*: periodo en el cual la temperatura en el centro del producto se mantuvo constante a $80 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 min, regulada por una válvula de seguridad.

c) *Enfriamiento*: en esta etapa se apagó el mechero y se realizó un primer enfriamiento dentro del autoclave, donde se disminuyó la presión, liberándose lentamente el vapor a través de la espita a efectos de evitar la ruptura de los frascos debido a las diferencias de presión entre el interior de los envases y el interior del autoclave. Posteriormente, las muestras se retiraron del autoclave y se enfriaron en baño de agua-hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente.

2.5. Almacenamiento refrigerado

Los envases se almacenaron a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 150 días desde su manufactura. Se consideró tiempo 0 al cabo de 24 h de almacenamiento en frío. Periódicamente, cada 30 días se extrajeron muestras para la realización de las distintas determinaciones.

2.6. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental factorial completamente aleatorizado con cuatro factores, cuyos niveles se indican a continuación. Este diseño es útil cuando diversos factores pueden afectar las características del producto. En virtud de ello, en forma simultánea, puede estudiarse cuál es la influencia de cada uno de los factores variando los niveles de los restantes (Wu y col., 2000). Los

factores estudiados y sus respectivos niveles fueron los siguientes:

- a) Tiempo de almacenamiento refrigerado a seis niveles: 1 (t=0 d), 2 (t=30 d), 3 (t=60 d), 4 (t=90 d), 5 (t=120 d) y 6 (t=150 d)
- b) Tipo de materia grasa a dos niveles: 1 (tocino) y 2 (aceite de girasol)
- c) Contenido de materia grasa a dos niveles: 1 (28% p/p) y 2 (40% p/p)
- d) Antioxidantes a tres niveles: 1 (sin adición de antioxidantes naturales), 2 (con extracto de romero) y 3 (con extracto de té verde)

Se realizaron tres procesos de manufactura independientes para todas las formulaciones desarrolladas.

2.7. Ensayos realizados

Los patés formulados fueron evaluados en base a cuatro grupos de ensayos, los cuales se detallan en el esquema de la **Figura 2.2** donde pueden observarse las diversas determinaciones involucradas en cada grupo, realizadas sobre las distintas formulaciones de patés.

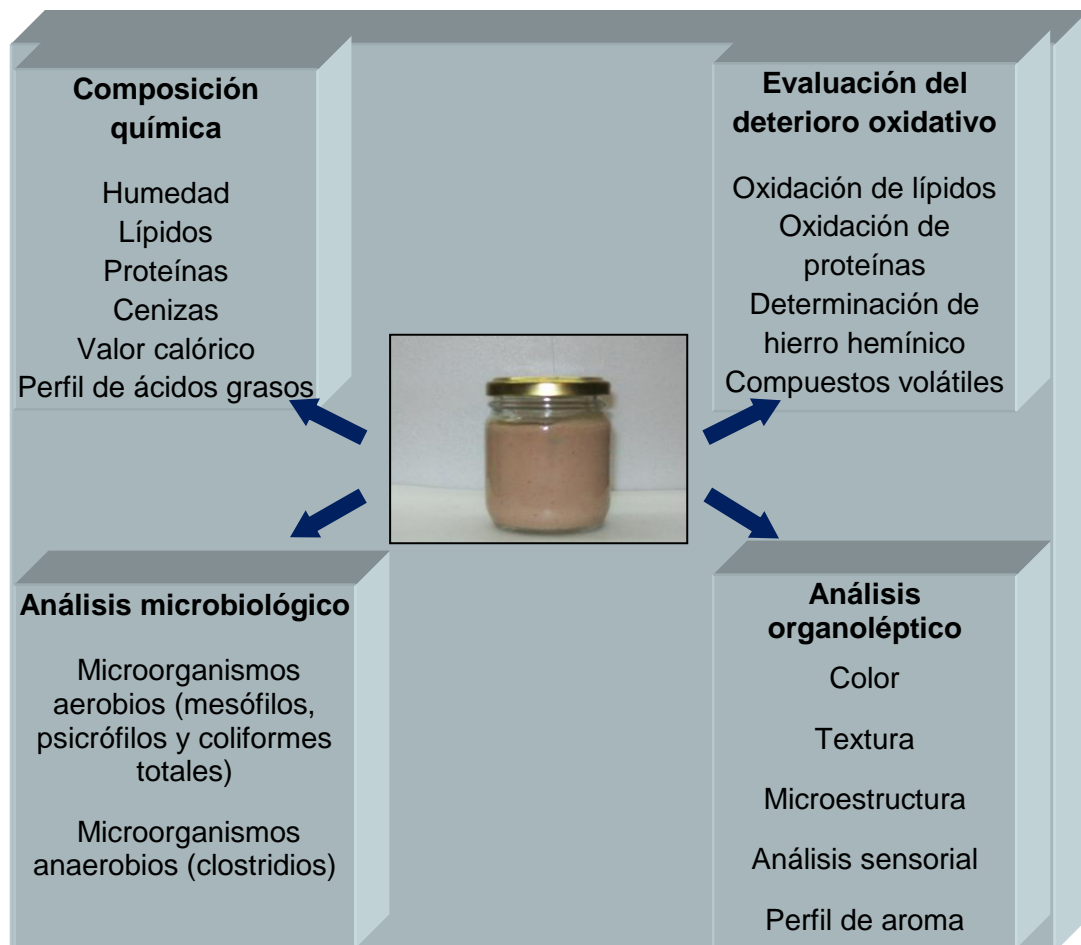


Figura 2.2. Ensayos realizados en las distintas formulaciones de paté de hígado de pollo

La composición química y la evaluación sensorial se llevaron a cabo a tiempo 0 de almacenamiento para cada formulación. Las demás determinaciones se llevaron a cabo en cada formulación en función del tiempo de almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.7.1. Composición centesimal

2.7.1.1. Humedad

Se determinó por desecación usando el método oficial (AOAC 1984, 24.002). En cristalizadores tarados con varilla de vidrio y arena previamente lavada (con HCl diluido) y calcinada, se pesaron con exactitud $5,0 \pm 0,1$ g de muestras. Se disgregaron las muestras con la arena para facilitar el secado. Se llevaron a estufa a $100-103^\circ\text{C}$ hasta peso constante, obteniéndose los residuos secos. Los resultados se expresaron como g de agua/100 g de paté utilizando la Ec.1. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\text{Humedad } [\%] = \frac{(\text{Peso}_{mH} - \text{Peso}_{mS}) \times 100}{\text{Peso}_{mH}} \quad \text{Ec. 1}$$

Peso_{mH} = Peso de la muestra húmeda

Peso_{mS} = Peso de la muestra seca

2.7.1.2. Lípidos

El contenido de lípidos se determinó por el método de Soxhlet (AOAC 1984, 24.005). Las muestras secas obtenidas a partir de la determinación de humedad se colocaron en cartuchos de papel de filtro, los cuales se insertaron en los tubos extractores del equipo. Se adicionó la cantidad adecuada de solvente de extracción (éter etílico), se conectó el refrigerante y se realizó la extracción a reflujo sobre manta calefactora (6 ciclos de extracción). Una vez finalizada la extracción se evaporó el solvente en rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Suiza) a presión reducida. Se calculó el tenor porcentual de lípidos expresándose en g de lípidos por 100 g de paté, según la Ec. 2. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\text{Lípidos(\%)} = \frac{\text{Peso de lípidos}}{\text{Peso de la muestra húmeda}} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

2.7.1.3. Proteínas

Las proteínas totales se determinaron mediante el método de Kjeldahl-Arnold-Gunning para la determinación de nitrógeno (AOAC 1984, 24.027) en un equipo digestor y destilador Büchi 320. Se utilizó el factor 6,25 para la conversión del contenido de nitrógeno en proteína. Los resultados se expresaron como g de proteínas cada 100 g de paté.

El método consiste en la destrucción de la materia orgánica empleando ácido sulfúrico concentrado. El trióxido de azufre formado durante el tratamiento a altas temperaturas se adiciona al grupo –NH– de los enlaces peptídicos formando ácido amidosulfónico. Este ácido es resistente a una posterior oxidación y se transforma en sulfato amónico por degradación. El Nitrógeno del sulfato de amonio se libera a continuación como amoníaco por alcalinización y destilación. Luego el amoníaco se cuantifica por medio de una valoración ácido-base. El procedimiento consta de cuatro etapas: a) digestión, b) neutralización, c) destilación y d) valoración, llevadas a cabo de la siguiente manera:

a) *digestión*: En esta etapa se produce la degradación oxidativa de los compuestos orgánicos de la muestra con ácido sulfúrico concentrado a temperaturas comprendidas entre 360 y 410°C. El ácido sulfúrico concentrado actúa como hidrolizante, deshidratante (carboniza), disociante, oxidante y proporciona el medio ácido para fijar el NH₃ en forma de NH₄HSO₄. La reacción general puede indicarse como:



Se realizaron cálculos previos para determinar la cantidad de muestra a pesar, para tener un consumo de HCl (0,1M) aproximado de 15 mL en la valoración final. En dichos cálculos se utilizó un valor estimativo de proteínas en paté de 12 g%, valor obtenido a partir de la información nutricional de un producto comercial (paté de hígado de cerdo tipo Bruselas, Bocatti).

Las muestras de $1,0 \pm 0,1$ g se pesaron con exactitud y se colocaron en el fondo de los tubos de digestión de vidrio Pyrex. Se adicionaron 2g de mezcla catalizadora (Na_2SO_4 , y K_2SO_4 anhidros con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en relación 10:1) y perlas de vidrio que facilitan la remoción y evitan el sobrecalentamiento. El catalizador eleva la temperatura (ascenso ebulloscópico) a más de 350°C , reduciendo el tiempo de digestión. Finalmente, se agregaron 15 mL de H_2SO_4 concentrado y se conectaron los tubos de digestión a una trampa que permite retirar los vapores de SO_3 .

La digestión se comenzó calentando los tubos suavemente hasta desaparición de la materia carbonosa, incrementando la intensidad de calor a medida que la digestión progresaba. La digestión se dio por finalizada cuando cesó la liberación de humos blancos (vapores de SO_3) y la solución quedó límpida de un color verde-azulado color dado por el catalizador que contiene cobre. Se dejó enfriar dentro de la campana conectado a la trampa de vapores.

b) Neutralización: Se adicionó agua y 80,0 mL de NaOH 40%, necesarios para neutralizar el H_2SO_4 utilizado y 5,0 mL adicionales para asegurar alcalinidad (color pardo por formación de CuO).

c) Destilación: Se utilizó una unidad de destilación Büchi 320. Los destilados (NH_3) se recogieron en erlenmeyers conteniendo 50,0 mL de solución ácida (H_3BO_3 al 4% p/v) con 8 gotas del indicador de Mortimer (rojo de metilo + verde de bromocresol). Durante esta etapa el indicador viró del naranja (medio ácido) al azul (medio alcalino), destilándose 200 mL, los que aseguran la recolección del 95 % del Nitrógeno.

d) Valoración: Se realizó la valoración con ácido HCl de normalidad conocida hasta viraje del indicador al color naranja inicial. Previamente se preparó una solución de HCl de normalidad aproximada 0,1 N. Se calculó la concentración exacta de HCl con un patrón primario (carbonato sódico anhidro). Se pesó con exactitud aproximadamente $0,10 \pm 0,01$ g de carbonato de sodio previamente secado en estufa, se disolvió en 25 mL de agua destilada y se añadieron 5 gotas de naranja de metilo 0,1% (p/v). Se midió el volumen de HCl 0,1 N a valorar que se agregó desde la bureta a la solución de carbonato de sodio para lograr el viraje del indicador del amarillo al rojo-naranja. Esta operación se realizó por triplicado, se tomó como concentración de la solución para el cálculo del contenido de proteínas, el promedio de las tres determinaciones.

Las determinaciones del contenido de proteínas de los patés se realizaron por triplicado con un blanco de reactivos que permite considerar la posible presencia de compuestos nitrogenados en los reactivos y en el medio de reacción. El contenido de proteínas se calculó mediante la Ec. 3 y se expresó como g de proteínas en 100 g de muestra.

$$\text{Proteínas} = \frac{(VaM - VaB) \times Na \times 0,014 \text{ gN / meq N} \times 6,25 \text{ g proteína / g N} \times 100}{\text{peso (g) muestra}} \quad \text{Ec. 3}$$

VaM = Volumen de ácido normalizado para titular la muestra (mL)

VaB = Volumen de ácido normalizado para titular el blanco (mL)

Na = Normalidad del ácido utilizado (meq/mL)

2.7.1.4. Cenizas

La determinación de cenizas se realizó por el método AOAC (1984, 24.009), en cápsulas de porcelana previamente calcinadas y taradas, se pesaron con exactitud $3,0 \pm 0,1$ g de muestras de paté. Se carbonizaron sobre mechero y tela metálica hasta residuo carbonoso y posteriormente se calcinaron en mufla a 550°C hasta cenizas blancas (24 h). Las muestras se enfriaron en la mufla hasta 50°C y luego en desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Los resultados se expresaron como g de cenizas cada 100 g de paté y se calcularon mediante la Ec. 4.

$$\text{Cenizas}[\%] = \frac{\text{peso final muestra}}{\text{peso inicial muestra}} \times 100 \quad \text{Ec. 4}$$

2.7.1.5. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono se calcularon por diferencia.

2.7.1.6. Valor calórico

Se determinó el valor calórico en kcal cada 100 g de producto, aplicando la

convención internacional que establece que corresponden 4 kcal por g de proteínas e hidratos de carbono y 9 kcal por g de lípidos (Coeficientes de Atwater).

2.7.1.7. Determinación de la composición de ácidos grasos

Se realizó la extracción de lípidos por el método de Folch y col. (1957) con cloroformo: metanol (2:1, v/v). Las muestras se homogeneizaron con la mezcla de solventes de extracción, se adicionó 20 % del volumen de agua destilada, se agitó en vortex, centrifugándose a 500 g, durante 10 min. La fase superior metanólica/acuosa se eliminó por aspiración y la fase inferior clorofórmica, conteniendo los compuestos lipídicos, se filtró a través de Na₂SO₄ anhidro. Los extractos se evaporaron a sequedad bajo corriente de N₂. Los lípidos extraídos fueron saponificados con KOH 10% en metanol, durante 45 min a 80 °C, en atmósfera de N₂. El material insaponificable se separó mediante tres etapas de extracción con n-hexano. La fase inferior metanólica conteniendo las sales potásicas de los ácidos grasos se acidificó con HCl concentrado. Los ácidos grasos obtenidos se extrajeron con n-hexano evaporándose a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno y se trataron con BF₃ 10 % en metanol a 80 °C durante 30 min a fin de obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs). Los FAMEs se extrajeron de la fase metanólica con n-hexano/agua. Las muestras se centrifugaron a 500 g durante 10 min y se realizó la determinación de la composición de ácidos grasos sobre la fase orgánica superior conteniendo los ésteres metílicos.

El perfil de ácidos grasos se determinó por cromatografía gaseosa (CG). Se utilizó un cromatógrafo gaseoso Hewlett- Packard HP 6890 A, equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se inyectaron 0,5 µl de muestra. Los FAMEs se separaron usando una columna capilar Supelco 11090-02A Omegawax (30 m de longitud, 0,250 mm de diámetro interno, 0,1 µm de espesor) a 175-220°C (3°C/min). La temperatura del detector de llama fue de 260°C, utilizando helio como gas portador (25.1 psi). La identificación de los picos se realizó por comparación con los tiempos de retención de ácidos grasos de referencia (Nu Check Prep, Inc., USA) preparados de igual forma que las muestras. La composición de ácidos grasos se expresó como porcentaje del total de ácidos grasos, realizando su análisis por duplicado con la colaboración de investigadores

del INIBIOLP (UNLP).

2.7.1.8. Determinación de tocoferoles

El contenido de tocoferoles en las diferentes fases grasas utilizadas en la elaboración de los patés (tocino y aceite de girasol) se realizaron mediante una técnica cromatográfica basada en las normas IUPAC 2.432 (1992) y AOCS Ce 8-89 (1998). Los lípidos fueron extraídos del tejido adiposo mediante un equipo Soxhlet utilizando n-hexano como solvente. El solvente fue removido utilizando un rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Suiza) con vacío a 40°C bajo corriente de N₂. Posteriormente, tanto los lípidos extraídos del tocino como el aceite de girasol fueron disueltos en n-hexano para su cuantificación por HPLC con detector de fluorescencia (λ excitación 290 nm, λ emisión 330 nm). Se utilizó un cromatógrafo HPLC Hewlett Packard Serie 1050, columna fase normal Lichrosob Si-60 (25 x 0,4 cm; 5 μ m de tamaño de partícula), fase móvil isopropanol:hexano 0,5:99,5 v/v, filtrado y desgasificado) a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min y 20 μ L de volumen de inyección.

2.7.2. Evaluación del deterioro oxidativo

Los patés de hígado de pollo en sus distintas formulaciones fueron evaluados a los 0, 30, 60, 90, 120 y 150 días de almacenamiento refrigerado a 4 \pm 1°C mediante los siguientes ensayos:

2.7.2.1. Determinación de la oxidación de lípidos

La oxidación de lípidos durante el periodo de almacenamiento fue monitoreada mediante la determinación de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al método de Rosmini y col. (1996) para patés de hígado de cerdo. La reacción se basa en la extracción con ácido tricloroacético (TCA) de las sustancias reactivas al TBA y la posterior formación de un compuesto de color rosado entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malonaldehído, de acuerdo a la reacción que se muestra en la **Figura 2.3**.

La determinación espectrofotométrica se realizó a 532 nm y los valores de absorbancia se utilizaron para calcular el N° de TBA expresado como mg

equivalentes de malonaldehído (MDA) por kg de producto (mg MDA/kg de paté).

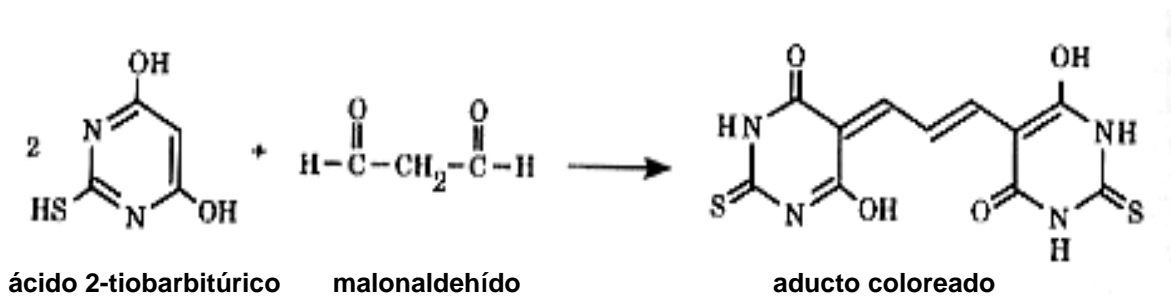


Figura 2.3. Reacción entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malonaldehído (Shahidi, 1997)

Se utilizaron dos muestras de cada formulación y tiempo de almacenamiento sobre las que se determinó el N° de TBA por duplicado. Se pesaron con exactitud $2,00 \pm 0,01$ g de muestra (m) y se homogeneizaron con 16 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% para precipitar las proteínas y extraer el MDA. Las muestras se sometieron a agitación durante 15 min para realizar la extracción y luego se dejaron en reposo en baño de agua-hielo durante 30 min; posteriormente se filtraron por papel de filtro Whatman N° 1, midiéndose el volumen de filtrado.

Reacción colorimétrica: Alícuotas de 2 mL de filtrado se mezclaron con 2 mL de solución de TBA al 0,5% y se llevaron a baño maría hirviendo durante 35 min. Luego los tubos se enfriaron en agua-hielo y se leyó la absorbancia a 532 nm. Simultáneamente, se realizó un blanco conteniendo 2 mL de TCA 10% y 2 mL de reactivo de TBA. Los cálculos se realizaron utilizando la Ec. 5 y el N° de TBA se expresó como mg MDA/kg de paté.

$$N^{\circ} TBA = \frac{(A_m - A_b) \times V_f \times V_a \times M \times 1000}{\epsilon \times l \times m} \quad \text{Ec. 5}$$

A_m = Absorbancia de la muestra

A_b = Absorbancia del blanco

V_f = Volumen del filtrado (mL)

V_a = Volumen de la alícuota (2 mL)

M = Molécula gramo del MDA (72 g/mol)

ϵ = Coeficiente de extinción molar del cromógeno ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l = Camino óptico (1 cm)

m = Peso de la muestra (g)

2.7.2.2. Determinación de la oxidación de proteínas

En este trabajo de Tesis se utilizó el método de Oliver y col. (1987) con algunas modificaciones. El método consiste en la reacción de los grupos carbonilos proteicos con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar 2,4-dinitrofenilhidrazonas, de acuerdo a la reacción que se muestra en la **Figura 2.4**.

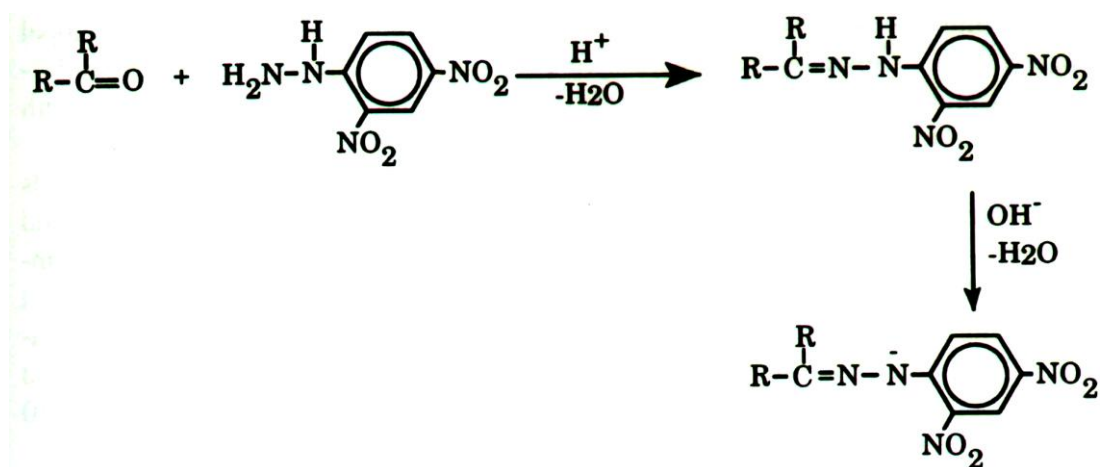


Figura 2.4. Reacción entre los grupos carbonilos y DNPH (Shahidi, 1997)

La derivatización cuantitativa se realizó en medio fuertemente ácido y requiere que el reactivo DNPH se encuentre en exceso por lo cual, dicho exceso debe ser removido antes de la determinación espectrofotométrica de las hidrazonas. El método de remoción consiste en la extracción con etanol/acetato de etilo. Las proteínas se solubilizan en guanidina-HCl 6 M y las dinitrofenilhidrazonas se cuantifican por medición de los valores de absorbancia a 370 nm. Cabe señalar que otros cromógenos, que absorben a dicha longitud de onda (retinoides, hemoglobina) pueden ser sustancias interferentes. Por lo tanto, es necesario realizar un blanco de muestra con un tratamiento similar aunque sin la adición de DNPH. La concentración de proteínas se determinó espectrofotométricamente a 280 nm. Se usó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar, con la cual se realizó una curva de calibración en un rango de 0 a 10 mg proteína/mL. La cantidad de carbonilos se expresó como nmoles/mg de

proteínas.

Se pesaron aproximadamente 500 mg de muestra y se homogeneizaron con 3 mL de buffer fosfato 50 mM, pH 7,4. Seguidamente se centrifugaron a 800 g durante 10 min.

En dos tubos eppendorf rotulados B (blanco) y M (muestra) se midieron 500 μ L de sobrenadante, es decir se determinaron grupos carbonilos correspondientes a las proteínas solubles. En el tubo B se adicionaron 600 μ L de HCl 2,5 N y en el tubo M 600 μ L de DNPH 10 mM en HCl 2,5 N. Los tubos se agitaron en vortex durante 15 s y se dejaron en oscuridad durante 1 h.

Las proteínas se precipitaron con 400 μ L de ácido TCA 40%. Las muestras se colocaron en baño de agua-hielo 10 min y se centrifugaron a 800 g durante 5 min, descartándose los sobrenadantes. Los pellets se lavaron con 1 mL de TCA 10% y luego dos veces con etanol/acetato de etilo 1:1, centrifugando cada vez a 800 g durante 5 min y descartando los respectivos sobrenadantes a fin de eliminar el exceso de DNPH.

Posteriormente, los pellets lavados se disolvieron en guanidina-HCl 6 M, se dejaron a 37 °C durante 10 min y se centrifugaron. Se determinó la absorbancia a 280 nm de los tubos B a fin de calcular la concentración de proteínas así como la absorbancia a 370 nm en los tubos B y M. La concentración de carbonilos se expresó en nmol/mg de proteína y se calculó mediante la expresión indicada en la Ec. 6.

$$\text{Carbonilos proteicos} = \frac{(A_m - A_b) \times 10^6}{\varepsilon \times l \times C_p} \quad \text{Ec. 6}$$

A_m = Absorbancia a 370 nm de la muestra

A_b = Absorbancia a 370 nm del blanco

ε = Coeficiente de extinción molar de las hidrazonas= 21.000 M⁻¹cm⁻¹

l = Camino óptico= 1cm

C_p = Concentración de proteínas (mg/mL)

2.7.2.3. Determinación de hierro hemínico

La extracción de los hemopigmentos se realizó utilizando el método de Hornsey (1956) optimizado por Lombardi- Boccia y col. (2002a y b). Se pesaron con exactitud 1,0 g de muestra (m) y se extrajeron los pigmentos con 5 mL de acetona acidificada (78% acetona acidificada con 2,5% de HCl). Se homogeneizó y agitó en vortex durante 1min, protegiendo las muestras de la luz. Las muestras se mantuvieron en oscuridad durante 1h en tubos tapados para evitar la evaporación. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 400 g durante 10 min y se filtraron por papel Whatman N° 1. Se midió el volumen de filtrado (V) y se leyó la absorbancia a 640 nm. La solución de acetona acidificada se utilizó como blanco. Se realizó una curva de calibración con hematina porcina disuelta en acetona acidificada de 0 a 210 µg de hematina/mL. A partir de los datos de absorbancia y la curva de calibración se calculó la concentración de hematina expresada en µg/mL. La concentración (C) de Fe Hem se expresó en µg/mL y se calculó a partir de la concentración de hematina por medio de la Ec. 7.

$$\begin{aligned}
 Fe\ Hem\ (\mu g / mL) = C = Hematina\ (\mu g / mL) \frac{PAFe}{PM\ Hematina} = \\
 = Hematina\ (\mu g / mL) \times 0,0882 \frac{\mu g\ Fe\ Hem}{\mu g\ Hematina}
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 7}$$

$$\frac{PAFe}{PM\ hematina} = \frac{56}{633,5} = 0,0882$$

El contenido de Fe Hem expresado en µg de Fe Hem/g de paté se obtuvo mediante la Ec. 8.

$$Fe\ Hem\ (\mu g / g\ de\ paté) = \frac{C\ (\mu g / mL) \times V\ (mL)}{m\ (g)}
 \tag{Ec. 8}$$

2.7.2.4. Determinación de compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica

La extracción y el análisis de los compuestos volátiles derivados de la oxidación de lípidos se realizó por microextracción en fase sólida (SPME) del espacio cabeza (HS) y su determinación por cromatografía gaseosa acoplada a

espectrometría de masa (GC-MS). El equipo utilizado se muestra en la **Figura 2.5**.

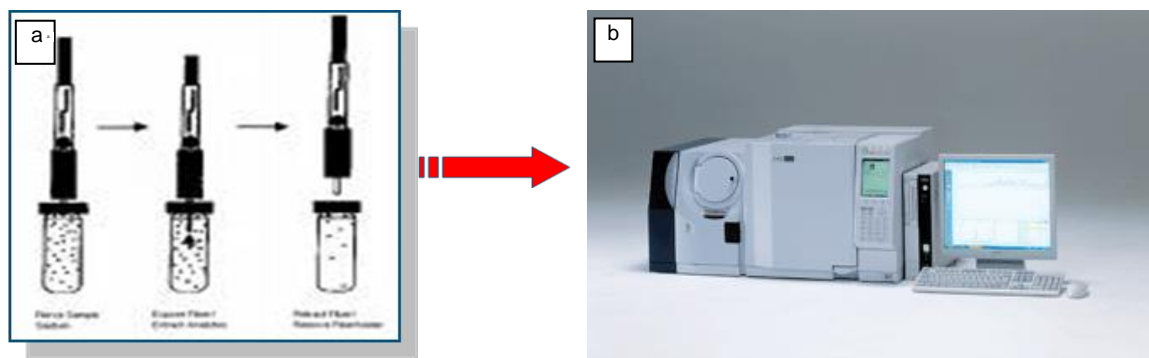


Figura 2.5 Microextracción en fase sólida (a) y (b) Cromatógrafo GC-MS QP2010 Ultra Shimadzu (Kyoto, Japón)

Estas determinaciones se llevaron a cabo mediante la colaboración de investigadores del Instituto de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar.

Se tomaron $3,00 \pm 0,01$ g de paté y se colocaron en un vial de 10 mL de vidrio color caramelo. Posteriormente, se adicionaron 20 μ L del estándar interno (4-metil-2-pentanona, concentración 50 ppm) que tuvo una concentración final de 333 ppb. El vial fue colocado y calentado en un bloque seco (Reacti- Therm 18821, Thermo Scientific, USA) a una temperatura de 45 °C durante el tiempo de equilibrio de 15 min, previo a la inserción de la fibra. Se utilizó una fibra de SPME con holder manual (Supelco, Bellafonte, PA, USA) equipado con una fibra Stable-Flex DVB/CAR/PDMS de 2 cm, 50/30 μ m (Supelco, Bellafonte, PA, USA). La fibra fue expuesta en el espacio de cabeza de la muestra durante un tiempo de extracción de 30 min, luego del cual se retiró la fibra del vial.

El análisis de los compuestos volátiles se realizó en un cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS, modelo QP2010 Ultra Shimadzu, Japón). La desorción térmica de los compuestos volátiles de la fibra de SPME se realizó en el inyector del GC durante 0,5 min a 250 °C en el modo “splitless”. Los compuestos volátiles fueron separados en una columna microcapilar DB-5 MS de 15m de longitud; 0,1mm de diámetro interno y 0,1 μ m de espesor de film. La temperatura de la columna fue inicialmente de 30 °C, mantenida durante 2 min, luego se trabajó con una rampa de temperatura, llegando a una temperatura final de 240 °C. El tiempo total de la corrida fue de 12,25 min.

El espectro de masas fue obtenido con ionización de impacto electrónico y el espectro de barrido del espectrómetro de masas fue de 20 a 300 m/z (velocidad de barrido 3333 uma/seg). Los compuestos fueron identificados por comparación de los espectros de masas con la biblioteca WILEY8. Todos los análisis fueron realizados por duplicado.

2.7.3. Análisis microbiológico

A fin de evaluar la calidad sanitaria del producto en función del tiempo de almacenamiento refrigerado, se monitoreó el crecimiento de los microorganismos de interés en los patés almacenados a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. A tal efecto se realizó la toma periódica de muestras a 0, 30, 60, 90, 120 y 150 días de almacenamiento refrigerado. En todos los casos se recolectaron en forma aséptica 20 g de muestra de las diferentes formulaciones a los tiempos indicados. Las mismas se colocaron en bolsas para equipo Stomacher y se homogeneizaron durante 1 min con 80 mL de agua peptonada al 0,1 % estéril en equipo Stomacher a velocidad normal. Se sembró 1 mL de cada homogenato, por duplicado, en las placas apropiadas cubriéndose con 15 mL de medio fundido y templado, con agitación por rotación suave de las respectivas placas. Se practicaron las diluciones correspondientes cuando el número de colonias desarrolladas no permitió el conteo de las mismas.

El agua peptonada contiene peptona de carne 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH $7,2 \pm 0,2$. Se trata de un medio enriquecido no selectivo recomendado para ser utilizado en lugar de la solución fisiológica para recuperar bacterias dañadas por procesos fisicoquímicos a los cuales ha sido sometido el alimento.

Medios de cultivo empleados

a) El estudio de los microorganismos mesófilos y psicrótrofos aerobios se llevó a cabo utilizando el medio de cultivo agar para recuento en placa (Oxoid, Argentina) a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, 48 h y a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, durante un periodo mínimo de 7 d, respectivamente. La composición del medio se indica en la **Tabla 2.1**.

Este medio es apropiado para el recuento de bacterias aerobias en aguas, aguas residuales, productos lácteos y otros alimentos. Es un medio no selectivo ya que el alto contenido nutricional de sus componentes permite el desarrollo de

la mayoría de las bacterias presentes en la muestra. (Mossel y col., 2003).

Tabla 2.1. Composición de medio de cultivo Plate Count Agar

Peptona de caseína	5,0 g/L
Extracto de levadura	2,5 g/L
D-Glucosa	1,0 g/L
Agar	14,0 g/L
pH	7,0 ± 0,2
Esterilización en autoclave	121°C, 5 min

b) Para estudiar las bacterias coliformes totales se realizó el recuento en placa de *Enterobacteriaceae*. Para ello se utilizó como medio de cultivo el Agar Bilis Rojo Violeta Glucosa (Merck). Se sembraron diluciones 1:100 durante el periodo de almacenamiento refrigerado. La incubación se realizó a 37 °C durante 48 h. La composición del medio se indica en la **Tabla 2.2.**

Tabla 2.2. Composición del medio Agar Bilis Rojo Violeta Glucosa (ABRV)

Peptona de carne	7,0 g/L
Extracto de levadura	3,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
D-(+)Glucosa	10,0 g/L
Sales Biliares	1,5 g/L
Rojo Neutro	0,03 g/L
Cristal Violeta	0,002 g/L
Agar	15,0 g/L
pH	7,4 ± 0,2
Esterilización a vapor fuente (BM)	30 min

La peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano mientras que las sales biliares y el cristal violeta inhiben el desarrollo de la flora Gram positiva acompañante. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable y el rojo neutro, el indicador de pH. Todas las enterobacterias fermentan la glucosa, acidifican el medio y producen un viraje del indicador de pH al color rojo intenso. Debido a ello se observan colonias rojo púrpura de 1 a 2 mm de diámetro, rodeadas generalmente, de una zona rojiza de bilis precipitada.

c) Para el recuento de microorganismos anaerobios se utilizó agar diferencial para clostridios, cuya composición se presenta en la **Tabla 2.3**. Este medio altamente nutritivo, permite el recuento de clostridios sulforreductores ya que estos microorganismos reducen el sulfito de sodio y producen sulfuro ferroso, el cual se pone de manifiesto por el color negro de las colonias. La resazurina es un indicador de óxido reducción que vira al rojo a altos potenciales redox indicando condiciones aeróbicas. La cisteína es el agente reductor.

Tabla 2.3. Composición del medio Agar diferencial para clostridios (Britania)

Tripteína	5,0 g/L
Peptona de Carne	5,0 g/L
Extracto de carne	8,0 g/L
Almidón soluble	1,0 g/L
Glucosa	1,0 g/L
Extracto de levadura	1,0 g/L
Clorhidrato de cisteína	0,5 g/L
Citrato de hierro y amonio	1,0 g/L
Sulfito de sodio	0,75 g/L
Resazurina	0,002 g/l
Agar	20,0. g/L
pH	7,6 ± 0,2
Esterilización	121°C, 15 min

El recuento de anaerobios totales se realizó sembrando 1 mL de dilución 1:100 de cada muestra en placas de medio para clostridios (preparado en el momento). Se cubrieron con 15 mL de medio de cultivo cuando el medio se solidificó, se recubrió con 2 mL más de medio de cultivo. Se incubaron a 37 °C en cámara anaeróbica por 48 h con un kit de anaerobiosis.

Para todos los microorganismos estudiados, los recuentos se expresaron como log UFC/g de producto (UFC= Unidades Formadoras de Colonias).

2.7.4. Análisis organoléptico

2.7.4.1. Determinación del color

El color fue determinado en tres localizaciones diferentes de la superficie y del interior de dos envases de paté de hígado de pollo, seleccionados al azar, de cada formulación y tiempo de almacenamiento. Se utilizó un colorímetro triestímulo Chroma Meter CR-400 Konica Minolta Sensing, Inc. (Japón). El color se expresó de acuerdo a la Comisión Internacional de l'Eclairage (sistema CIE). Todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente. Se determinaron las siguientes coordenadas: L* (Luminosidad), a* y b* que corresponden a los componentes rojo-verde y amarillo-azul, respectivamente (**Figura 2.6**). Estos parámetros poseen los siguientes rangos de valores:

L* = 0 (negro), 100 (blanco)

a* = + 60 (rojo), -60 (verde)

b* = + 60 (amarillo), -60 (azul)

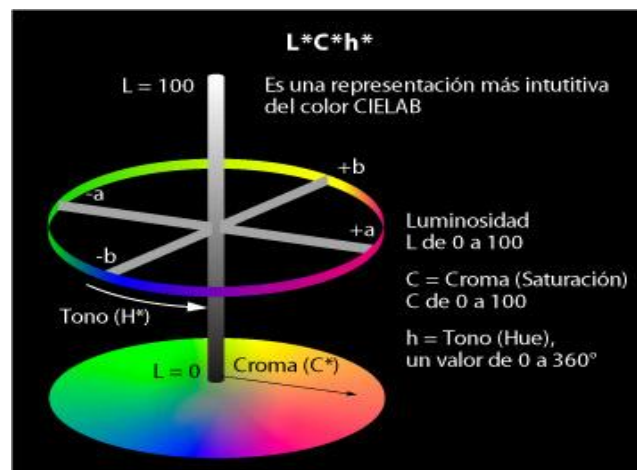


Figura 2.6. Espacio cromático

El colorímetro fue calibrado con una placa estándar blanca ($L^*= 97,57$; $a^*=0$; $b^*=1,73$). Las coordenadas L^* , a^* y b^* se transformaron en coordenadas polares Croma y Hue. El Croma (C) y el ángulo Hue (H°) se obtuvieron utilizando las Ec. 9 y 10, respectivamente.

$$C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{Ec. 9}$$

$$H^\circ = \arctg b^*/a^* \quad \text{Ec.10}$$

Las diferencias de color total entre el interior y la superficie de los diferentes patés se calcularon mediante la Ec.11.

$$\Delta\text{Color} = [\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}]^{1/2} \quad \text{Ec.11}$$

2.7.4.2. Análisis del Perfil de Textura (TPA)

El análisis del perfil de textura (TPA) se realizó con un texturómetro Texture Analyser TA-xT2i (Stable Micro Systems, Reino Unido), el cual se muestra en la **Figura 2.7**.

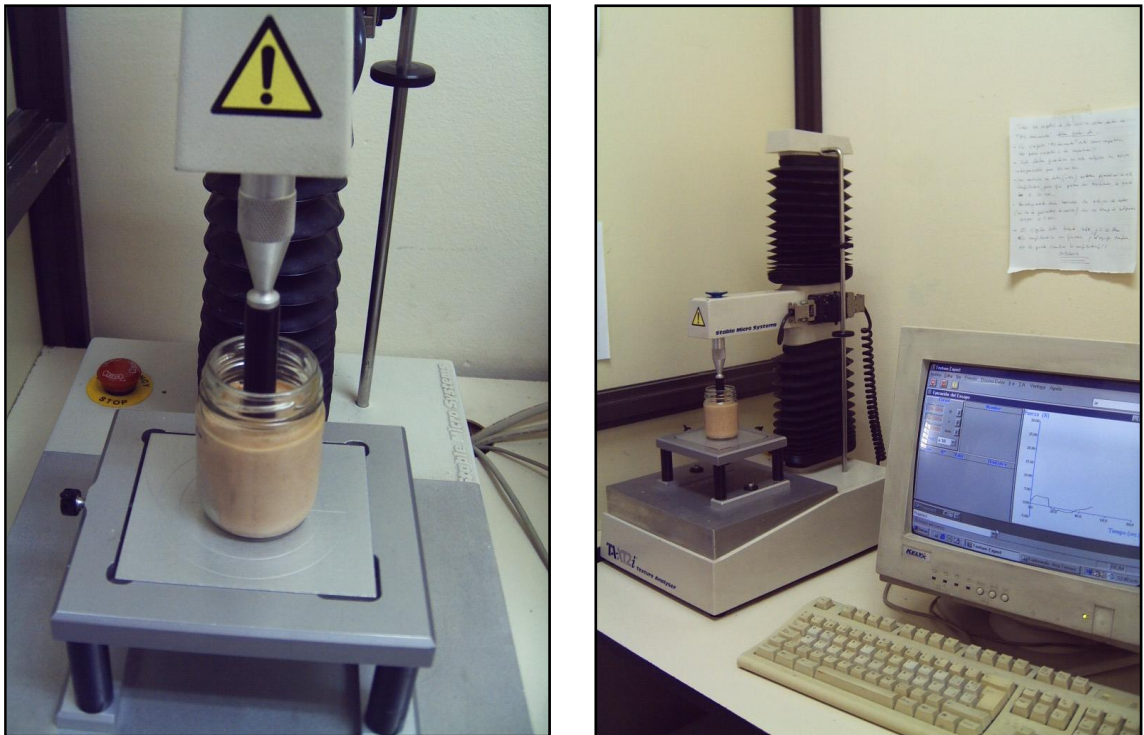


Figura 2.7. Equipo para el análisis del perfil de textura Texture Analyser TA-xT2i (Reino Unido)

Las muestras, en sus envases, se sometieron a dos ciclos de compresión consecutivos. La fuerza en la compresión se midió con un sensor cilíndrico P/0,5R de Delrin de 12,7 mm de diámetro y 50 mm de alto, el cual penetró en la muestra 2 veces en el mismo lugar. En el primer ciclo de compresión, el sensor se introdujo 15 mm dentro del producto y hasta 30 mm en el segundo ciclo. Las curvas de fuerza-tiempo se obtuvieron a fuerza y velocidad constantes de 0,5 N y 1 mm/s, respectivamente. El ensayo se realizó a temperatura ambiente. En la **Figura 2.8** se muestra un diagrama típico de un análisis de perfil de textura.

A partir de los gráficos de fuerza (N) vs. distancia (mm) obtenidos para cada formulación de paté y tiempo de almacenamiento, se determinaron los siguientes parámetros de textura: dureza, cohesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad.

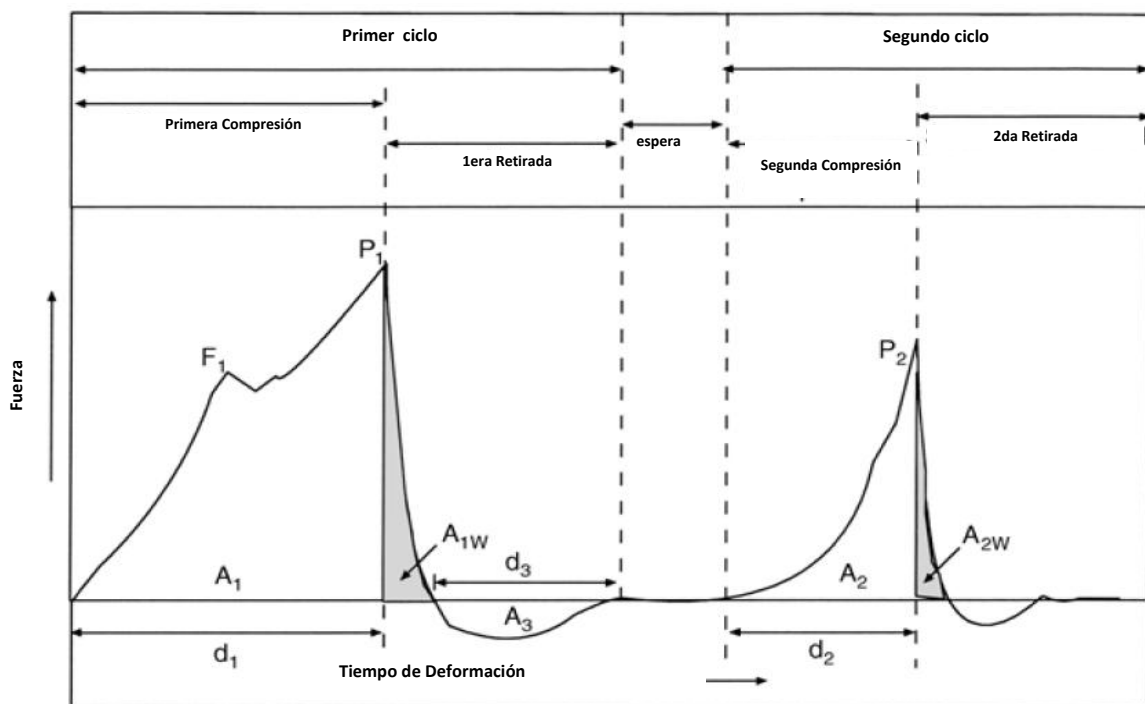


Figura 2.8. Diagrama típico de un Análisis de Perfil de Textura (TPA)

Cada uno de estos parámetros puede ser definido desde el punto de vista instrumental, según el análisis del perfil de textura (Friedman y col., 1963), y desde el punto de vista sensorial. Según el análisis de perfil de textura, y teniendo en cuenta el gráfico presentado en la **Figura 2.8**, estos términos pueden definirse de la siguiente forma:

Dureza (N): fuerza requerida para la primera compresión (P_1).

Cohesividad: Grado en que una muestra puede ser deformada antes de la ruptura. Es la relación entre el área bajo la curva de la segunda compresión y el área de la curva de la primera compresión (A_2/A_1). A_1 es la energía total requerida en la primera compresión y A_2 la energía requerida en la segunda compresión.

Elasticidad: Relación de distancias hasta el pico máximo de la segunda compresión sobre la distancia hasta el pico máximo de la primera compresión d_2/d_1 .

Gomosidad (N): Se define como el producto entre dureza y cohesividad.

Masticabilidad (N): Se define como el producto entre gomosidad y elasticidad.

Desde el punto de vista de la evaluación sensorial, estos términos han sido definidos por (Meullenet y col., 1997) de la siguiente manera:

Dureza: Corresponde a la máxima fuerza requerida para comprimir la muestra con los molares si lo comparamos con el proceso de masticación.

Cohesividad: Cantidad de deformación sufrida por el alimento antes de la ruptura cuando la muestra es completamente masticada por los molares.

Elasticidad: Capacidad de la muestra para recuperar su forma/tamaño original luego de quitar la fuerza de deformación entre la lengua y el paladar.

Gomosidad: Fuerza necesaria para desintegrar un alimento semisólido antes de su deglución.

Masticabilidad: trabajo necesario para masticar una muestra.

2.7.4.3. Determinación de la microestructura

Se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Este tipo de microscopía se fundamenta en la aplicación de un campo magnético que permite enfocar los electrones y obtener una imagen tridimensional de la

superficie de las estructuras. De esta manera, se obtienen imágenes con detalles profundos de la superficie de la muestra en 3D, las cuales permiten estudiar sus características morfológicas y topográficas.

La muestra es colocada en un pequeño espacio, al cual se le hace vacío, el trayecto del haz de electrones es modificado por un conjunto de bobinas deflectoras que lo hacen recorrer la muestra punto por punto y a lo largo de líneas paralelas (barrido).

Los electrones secundarios emitidos por la muestra se dirigen al detector de centelleo y son convertidos en señales eléctricas, las que pasan a una pantalla de observación donde la imagen es formada línea por línea y punto por punto (**Figura 2.9**).

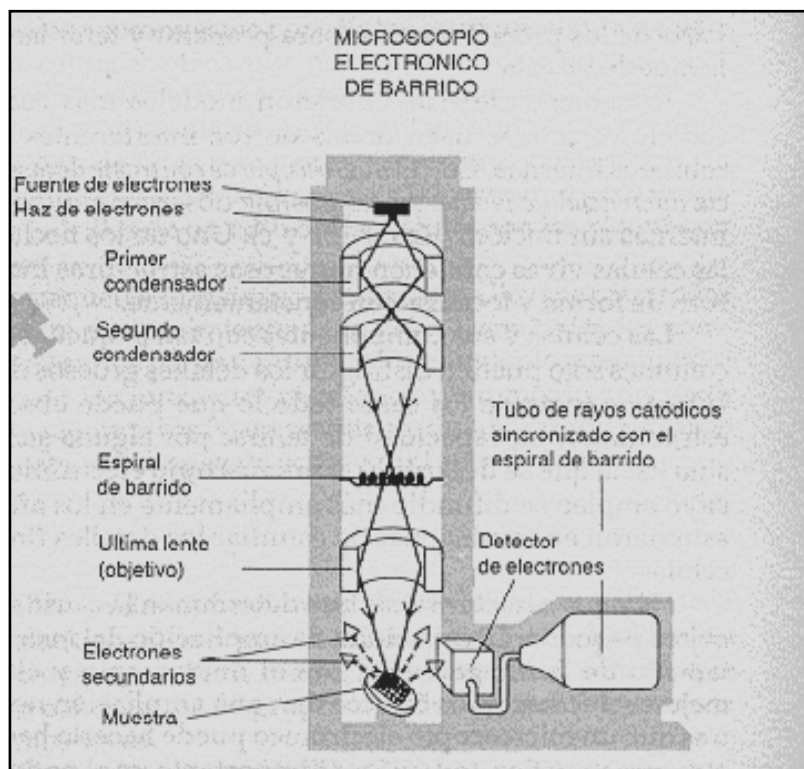


Figura 2.9. Fundamento de la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Antes de colocar las muestras en el equipo, éstas deben ser tratadas a fin de mantener la integridad de la superficie. En este trabajo de Tesis, las muestras de paté de cada formulación y tiempo de almacenamiento se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato de sodio 0.1 M (pH 7,2). A continuación, se deshidrataron con etanol o acetona y se secaron por la técnica de punto crítico con CO₂ en un equipo POLARON. El secado por punto crítico permite la

remoción total del agua de las muestras. Para ello, las mismas se purgan con CO₂ líquido hasta que el etanol o acetona hayan sido reemplazados. Posteriormente se sella la cámara y se calienta hasta 31 °C, de esta forma el CO₂ líquido se evapora y las muestras quedan totalmente secas.

Seguidamente, las muestras de paté se recubrieron con una capa de oro mediante un equipo Pelco 91000 con el propósito que el haz de electrones primarios choque con el paté recubierto con un material conductor. Posteriormente, las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL 35 CF (Tokyo, Japón) a un potencial de aceleración de 5-6 kV. Se obtuvieron las micrografías a diferentes magnificaciones desde 345 hasta 10000X. Estas determinaciones se realizaron mediante la colaboración de investigadores del CCT-CONICET-Bahía Blanca.

2.7.4.4. Evaluación sensorial

Se llevó a cabo el ensayo del triángulo a fin de determinar si los consumidores detectaban diferencias entre los patés elaborados con diferente tipo y concentración de materia grasa. A tal efecto se realizaron dos sesiones con paneles constituidos por 20 miembros cada uno. A cada panelista se le presentaron dos grupos de tres muestras cada uno. En cada grupo, dos muestras eran iguales y una diferente.

Las muestras fueron provistas en recipientes plásticos codificados con números de tres dígitos. En la **Figura 2.10** se muestra el modelo de planilla utilizada para realizar la prueba, en la cual cada panelista debía marcar el número de la muestra que consideraba distinta en cada grupo de tres muestras. Se proporcionaron galletitas de agua y agua mineral para que los panelistas neutralizaran el paladar entre cada degustación.

En la primera sesión se contrastaron las siguientes muestras: Toc28 vs. Gir28 y Toc 28 vs. Toc40. En la segunda sesión se contrastaron Toc 40 vs Gir40 y Gir28 vs. Gir40.

Los resultados estadísticos fueron obtenidos a partir de una tabla que establece el número de respuestas correctas sobre el total de respuestas

requeridas, para asegurar la diferencia a distintos niveles de significación (Ureña y col., 1999)

PRUEBA DEL TRIÁNGULO		
Nombre.....	Evaluador N°.....	
<p>Usted recibirá dos grupos de tres muestras de paté cada uno. En cada grupo, dos muestras son idénticas y la otra es diferente. Por favor, encierre con un círculo el número de la muestra diferente en cada grupo.</p>		
428	239	130
275	308	761

Figura 2.10. Planilla utilizada en la prueba del triángulo

En otra sesión, se realizó un análisis descriptivo cuantitativo por atributos para determinar la aceptabilidad de los patés. El ensayo sensorial se realizó con los patés formulados con distinto tipo y concentración de materia grasa (Toc40, Toc28, Gir40 y Gir28). Se utilizó un panel sensorial no entrenado constituido por 40 adultos de ambos sexos (45% de varones y 55% de mujeres). Se llevó a cabo una encuesta previa para incorporar al panel, consumidores habituales de este tipo de producto. En la **Figura 2.11** se muestra un momento de la realización del panel de degustación.



Figura 2.11. Degustación de patés de hígado de pollo durante el análisis sensorial en el CIDCA

ACEPTABILIDAD SENSORIAL DE PATÉS POR ATRIBUTOS										
Nombre.....					Evaluador N°.....					
Utilizando las siguientes escalas, por favor evalúe la aceptabilidad de cada atributo en las diferentes muestras. Evalúe todos los atributos de cada muestra comenzando por la de la izquierda y siguiendo el orden en que se presentan.										
Muestra N°.....										
	Me desagrada mucho						Me agrada mucho			
Aceptabilidad general	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Color	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Textura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Untabilidad	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Muestra N°.....										
	Me desagrada mucho						Me agrada mucho			
Aceptabilidad general	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Color	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Textura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Untabilidad	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Muestra N°.....										
	Me desagrada mucho						Me agrada mucho			
Aceptabilidad general	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Color	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Textura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Untabilidad	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Muestra N°.....										
	Me desagrada mucho						Me agrada mucho			
Aceptabilidad general	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Color	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Textura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Untabilidad	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Figura 2.12. Planilla utilizada para la evaluación de aceptabilidad por atributos de patés de hígado de pollo

Se sirvieron 4 muestras correspondientes a los distintos tipos de patés, codificados con números de 3 dígitos. Las muestras de aproximadamente 5 g fueron provistas a temperatura ambiente. El orden de presentación de las

muestras para cada panelista se determinó aleatoriamente. Se proporcionó agua mineral y galletitas de agua para neutralizar y limpiar el paladar de cada panelista entre la degustación de las muestras. Se solicitó la evaluación de los siguientes atributos: a) Color, b) Textura, c) Untabilidad, d) Sabor y e) Aceptabilidad general. Se utilizaron escalas hedónicas del 1 al 9 donde el punto 1 se correspondía con “Me desagrada mucho” y el 9 con “Me agrada mucho”. Cada panelista recibió una planilla como la que se muestra en la **Figura 2.12**.

En una última sesión se estudió el efecto de la adición de antioxidantes naturales sobre los atributos sensoriales de los patés. Para ello se utilizó la formulación más saludable (Gir28). Los panelistas recibieron en esta oportunidad tres muestras codificadas con números de tres dígitos que correspondían a la formulación mencionada sin y con la adición de los antioxidantes naturales estudiados, es decir recibieron las formulaciones Gir28, Gir28-R y Gir28-T. La planilla y condiciones de la prueba fueron similares a las de la sesión de aceptabilidad sensorial descriptas previamente.

2.7.4.5. Perfil de aroma

A fin de estudiar las posibles variaciones en el aroma de los alimentos durante la elaboración o el almacenamiento previo a su consumo, un recurso novedoso es la utilización de la Nariz Electrónica (NE) mediante la metodología de espacio de cabeza estático. Los perfiles de aroma obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA) a efectos de determinar los diferentes perfiles de aroma de las distintas formulaciones de paté así como también, se estudió el efecto de la adición de antioxidantes naturales (extractos de romero y de té verde) en dichos perfiles. Cabe señalar que los extractos adicionados cuentan con compuestos volátiles, los cuales pueden generar perfiles de aroma característicos en la matriz estudiada. A su vez, estos extractos por su actividad antioxidante, pueden retardar los cambios en los perfiles de aroma en función del tiempo de almacenamiento refrigerado. Este estudio se llevó a cabo con la colaboración de investigadores del Instituto de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar.

Cada una de las formulaciones fue evaluada a los 0, 30, 60, 90, 120 y 150 días de almacenamiento refrigerado. Luego del periodo de almacenamiento, las muestras se conservaron a -80°C en un ultrafreezer (Revco[®], Canadá) hasta el momento del análisis. Cada muestra fue colocada en frascos de vidrio color caramelo (Chromacol[®], Reino Unido), seguido de un gaseado con nitrógeno (Air Liquid[®], Argentina) para minimizar un posible deterioro oxidativo.

Para el análisis del perfil de aroma mediante NE, las muestras fueron colocadas a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ el día previo al análisis. Seguidamente, fueron homogeneizadas durante 2 min, potencia intermedia (Stomacher[®], modelo 3500, Estados Unidos) evitando que el exceso de la energía mecánica aplicada generara cambios estructurales en el producto. Una vez homogeneizadas, se pesaron $3,0 \pm 0,1\text{g}$ de muestra en viales de 10,0 mL de capacidad sellados posteriormente con septas y precintos magnéticos (Chromacol[®], Reino Unido) y nuevamente se mantuvieron a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis. Para la determinación del perfil de aroma, se utilizó un equipo NE-MS Alpha Prometheus (Alpha MOS[®], Francia) que se muestra en la **Figura 2.13**, junto con las condiciones del análisis empleadas.



Volumen inyectado	1mL
Incubación	60°C - 30min - 500rpm
Tiempo de adquisición	120s
Frecuencia de adquisición	0,5s
Recuperación de los sensores	18min
Gas de transporte	Aire (calidad cromatográfica)
Flujo de gas de transporte	150 mL /min

Figura 2.13. NE-MS Alpha Prometheus (Alpha MOS[®], Francia) y condiciones del análisis

2.8. Análisis estadístico

Teniendo en cuenta el diseño experimental previamente descrito, los resultados obtenidos fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) a fin de investigar el efecto del tiempo de almacenamiento y de la formulación. El nivel de significación utilizado fue del 95%. En los casos en los que se observaron diferencias estadísticamente significativas se utilizó a posteriori, un ensayo de comparación de medias (test de Fisher). Los resultados experimentales se procesaron utilizando el software Systat Inc. versión 12.0.

Para el análisis de los perfiles de aroma se utilizó el software estadístico Alpha Soft V.8 (Alpha MOS[®], Francia) aplicando los métodos multivariados de análisis de componentes principales (PCA).

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Composición centesimal

En la **Tabla 3.1** se muestran los resultados de la composición centesimal de los patés correspondientes a las distintas formulaciones. Los resultados obtenidos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tipos de paté para todos los componentes analizados.

Las diferencias en el contenido de humedad, lípidos, proteínas y cenizas observadas podrían atribuirse a las distintas relaciones hígado/materia grasa empleadas, así como al tipo de materia grasa utilizada en la manufactura de las diferentes formulaciones estudiadas.

Tabla 3.1. Composición proximal (g/100 g) y valor calórico (kcal/100 g) de patés de hígado de pollo con distinta composición de fase grasa

Formulación	Toc40	Toc28	Gir40	Gir28
Humedad	50,32 ± 0,40 ^b	59,95 ± 0,85 ^d	46,44 ± 0,30 ^a	56,19 ± 0,07 ^c
Lípidos	38,92 ± 1,98 ^c	27,46 ± 0,29 ^a	42,71 ± 0,90 ^d	30,80 ± 0,28 ^b
Proteínas	8,79 ± 0,13 ^b	10,33 ± 0,12 ^c	7,60 ± 0,45 ^a	10,21 ± 0,04 ^c
Cenizas	2,61 ± 0,03 ^b	2,78 ± 0,07 ^c	2,45 ± 0,06 ^a	2,59 ± 0,01 ^b
Valor calórico	385,39 ± 17,30 ^c	288,48 ± 3,05 ^a	416,21 ± 8,31 ^d	318,04 ± 2,38 ^b

^{a,b,c,d} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Las formulaciones con 40% de materia grasa (Toc40 y Gir40) poseen un menor contenido de humedad que las elaboradas con 28% de materia grasa (Toc28 y Gir28). Estos resultados podrían deberse a que la reducción del tenor graso en las formulaciones fue compensada con un mayor contenido de hígado, el cual aporta mayor humedad al producto. Además, para igual tenor graso, las formulaciones con tocino presentaron mayor humedad que los patés elaborados con aceite de girasol, lo que puede deberse fundamentalmente al aporte del tocino (5% de humedad) ya que el aceite (99,9% de lípidos) prácticamente no contribuye en este sentido.

La composición proximal del paté Toc40 fue similar a la informada por Estévez y col. (2007) para patés de hígado de cerdo elaborados con proporciones similares de hígado y tocino que las empleadas en este trabajo de Tesis.

El contenido lipídico total del producto proviene de la fase grasa utilizada y de otros ingredientes, tales como hígado y músculo. Así, en las formulaciones con aceite de girasol el contenido lipídico es mayor a la cantidad de aceite adicionada

(42,71 y 30,80% para Gir40 y Gir28 respectivamente). Por otra parte, las formulaciones con tocino presentaron un menor tenor porcentual de fase grasa que la cantidad de tocino adicionada, lo que está relacionado con la composición de dicho tejido.

Las diferencias observadas en el contenido de humedad, lípidos y proteínas entre los patés elaborados con distinta fase grasa también fueron informadas por Martin y col. (2008) quienes reemplazaron el 50% del tocino por aceite de oliva en patés de hígado de cerdo. Dichos autores observaron un mayor contenido de lípidos, un menor contenido de humedad y de proteínas en los productos que contenían aceite, indicando que el tocino contiene aproximadamente 93% de lípidos, 5% de humedad y 1% de proteínas.

Con respecto al contenido de proteínas, éstas son aportadas por los ingredientes cárnicos, principalmente músculo e hígado y en menor medida, por el tocino utilizado en la elaboración de las formulaciones Toc28 y Toc40. Otro aporte importante corresponde al caseinato de sodio adicionado como ingrediente, en igual concentración en todas las formulaciones (2%). Por ello, es esperable que las formulaciones de menor contenido graso y por ende, de mayor proporción de hígado presenten un mayor nivel proteico, tal como se observa en los resultados obtenidos.

En cuanto al contenido de cenizas, también se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas formulaciones de paté. Si bien en este caso el principal aporte está dado por la incorporación de los diferentes aditivos (NaCl , NaNO_2 y Na_3PO_4) en la misma concentración para todas las formulaciones, las distintas proporciones de hígado/fase grasa utilizadas determinan que el aporte de otros minerales, por ejemplo el hierro sea diferente. Así, en aquellas formulaciones donde dicha relación es mayor (Toc28 y Gir28) poseen un mayor contenido de cenizas, dado que el tejido hepático contribuye en mayor grado que la fase grasa al contenido de minerales.

Como consecuencia de la diferente composición, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el valor calórico de todos los tipos de paté ensayados. La reducción del tenor graso dio lugar a productos con un menor valor calórico, tanto para los elaborados con tocino como para los formulados con aceite de girasol.

Además, para igual tenor graso los patés elaborados con tocino poseen un valor calórico menor que los formulados con aceite de girasol.

Por ello, puede indicarse que los productos de menor tenor graso desarrollados poseen un mayor porcentaje de humedad, proteínas y cenizas que los elaborados con 40% de fase grasa, lo que los hace no sólo más saludables en cuanto a la reducción del tenor graso sino también de mayor valor nutricional por el mayor aporte de proteínas de alto valor biológico y de minerales como el hierro, de gran importancia.

3.2. Perfil de ácidos grasos

La **Tabla 3.2** indica la composición de ácidos grasos correspondiente a la fracción lipídica de las materias primas utilizadas como ingredientes en la elaboración de los patés. Cabe señalar que esta composición de ácidos grasos puede variar en virtud de la variabilidad propia entre los animales, además de la raza, dieta, etc. En el caso del aceite de girasol, la misma puede modificarse de acuerdo a los distintos cultivares y las diversas condiciones agroclimáticas a las cuales se haya sometido el cultivo.

El tocino y el aceite de girasol muestran importantes diferencias en cuanto a su composición de ácidos grasos. El tocino posee un 23,64% de ácidos grasos saturados de los cuales el ácido palmítico es el mayoritario, un alto porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados representado fundamentalmente por el ácido oleico (49,87%) y un menor contenido de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente, ácido linoleico (18,82%). En contraste, el aceite de girasol presenta como ácido graso mayoritario el 18:2 n-6, el cual representa más del 50% del total de ácidos grasos mientras que alrededor del 36% corresponde al ácido oleico, con un tenor inferior al 10% para los ácidos grasos saturados.

Los principales ácidos grasos aportados por el tejido hepático son palmítico, esteárico, linoleico y araquidónico, los cuales representan más del 80% de los ácidos grasos presentes en los lípidos de este tejido. El ácido oleico se encuentra en niveles del 7,47% y el resto se distribuye en ácidos grasos minoritarios.

Por otra parte, la composición de ácidos grasos aislados del tejido muscular fue diferente, presentando como ácidos grasos mayoritarios palmítico, esteárico, oleico, linoleico y araquidónico.

Tabla 3.2. Composición de ácidos grasos (%) correspondientes a las materias primas utilizadas en la elaboración de patés de hígado de pollo

Ácidos grasos	Tocino	Aceite de girasol	Hígado	Músculo
14:0	1,35 ± 0,04 ^b	nd	nd	0,46 ± 0,04 ^a
15:0	nd	nd	nd	2,48 ± 0,22
16:0	16,81 ± 2,13 ^b	6,65 ± 0,11 ^a	18,59 ± 0,08 ^b	21,10 ± 1,95 ^b
16:1n-7	4,09 ± 0,48 ^c	nd	0,57 ± 0,08 ^a	2,47 ± 0,11 ^b
16:3n-3	nd	nd	0,50 ± 0,06 ^a	0,82 ± 0,12 ^b
17:0	0,66 ± 0,05 ^b	nd	nd	0,55 ± 0,06 ^a
18:0	4,85 ± 1,21 ^a	2,31 ± 0,06 ^a	25,99 ± 3,72 ^b	15,62 ± 7,01 ^b
18:1n-9	49,87 ± 2,57 ^d	36,62 ± 0,07 ^c	7,47 ± 3,15 ^a	20,43 ± 6,68 ^b
18:1n-7	nd	nd	0,27 ± 0,37	nd
18:2n-6	18,82 ± 0,36 ^a	54,43 ± 0,11 ^d	22,23 ± 1,48 ^b	26,15 ± 0,96 ^c
18:3n-3	2,06 ± 0,01 ^b	nd	0,82 ± 0,23 ^a	1,99 ± 0,01 ^b
20:0	0,91 ± 0,09	nd	nd	nd
20:2n-6	0,64 ± 0,01 ^a	nd	0,77 ± 0,17 ^a	0,75 ± 0,02 ^a
20:3n-6	nd	nd	1,49 ± 0,06 ^b	0,84 ± 0,05 ^a
20:4n-6	nd	nd	14,20 ± 0,71 ^b	6,01 ± 0,24 ^a
20:5n-3	nd	nd	0,73 ± 0,05	nd
22:4n-3	nd	nd	1,38 ± 0,09 ^a	1,56 ± 0,17 ^a
22:5n-3	nd	nd	1,57 ± 0,39 ^a	0,95 ± 0,01 ^a
22:6n-3	nd	nd	3,46 ± 1,11 ^b	0,79 ± 0,08 ^a
Saturados	23,64 ± 3,33 ^b	8,95 ± 0,04 ^a	44,58 ± 3,63 ^c	40,21 ± 5,30 ^c
Monoinsaturados	53,96 ± 3,05 ^d	36,62 ± 0,07 ^c	8,30 ± 3,61 ^a	22,90 ± 6,57 ^b
Poliinsaturados	21,51 ± 0,37 ^a	54,43 ± 0,11 ^d	47,11 ± 0,03 ^c	39,85 ± 1,44 ^b
Total insaturados	75,46 ± 3,42 ^b	91,05 ± 0,04 ^c	55,41 ± 3,63 ^a	62,75 ± 5,13 ^{a,b}
Insaturados/ Saturados	3,24 ± 0,60 ^b	10,17 ± 0,05 ^c	1,25 ± 0,18 ^a	1,58 ± 0,34 ^a

^{a,b,c,d} Letras diferentes en cada fila indican que los promedios difieren significativamente (p<0,05)
nd no detectado

El tejido muscular tiene un menor contenido de ácidos esteárico y araquidónico que el hígado, así como un mayor contenido de ácido oleico (20,43% vs. 7,47%). Es importante destacar que la composición de ácidos grasos del tejido muscular no tiene una alta incidencia en la composición de ácidos grasos del

producto final debido al bajo contenido de lípidos del músculo y a su menor proporción en la formulación de los patés (5% p/p de músculo de pollo en todas las formulaciones). Teniendo en cuenta esta información, puede confirmarse que la composición de ácidos grasos en los patés manufacturados con aceite de girasol es muy diferente a la de los que contienen tocino.

En la **Figura 3.1** se observa la composición de ácidos grasos según el tipo y concentración de materia grasa con la que se elaboraron los patés. La sustitución del tocino por aceite de girasol dio lugar a productos con una alta proporción ($p < 0,05$) de PUFAs. Este tipo de ácidos grasos representó más del 50% del total en los patés con aceite de girasol, mejorando el perfil nutricional debido al aporte de un ácido graso esencial como el ácido linoleico.

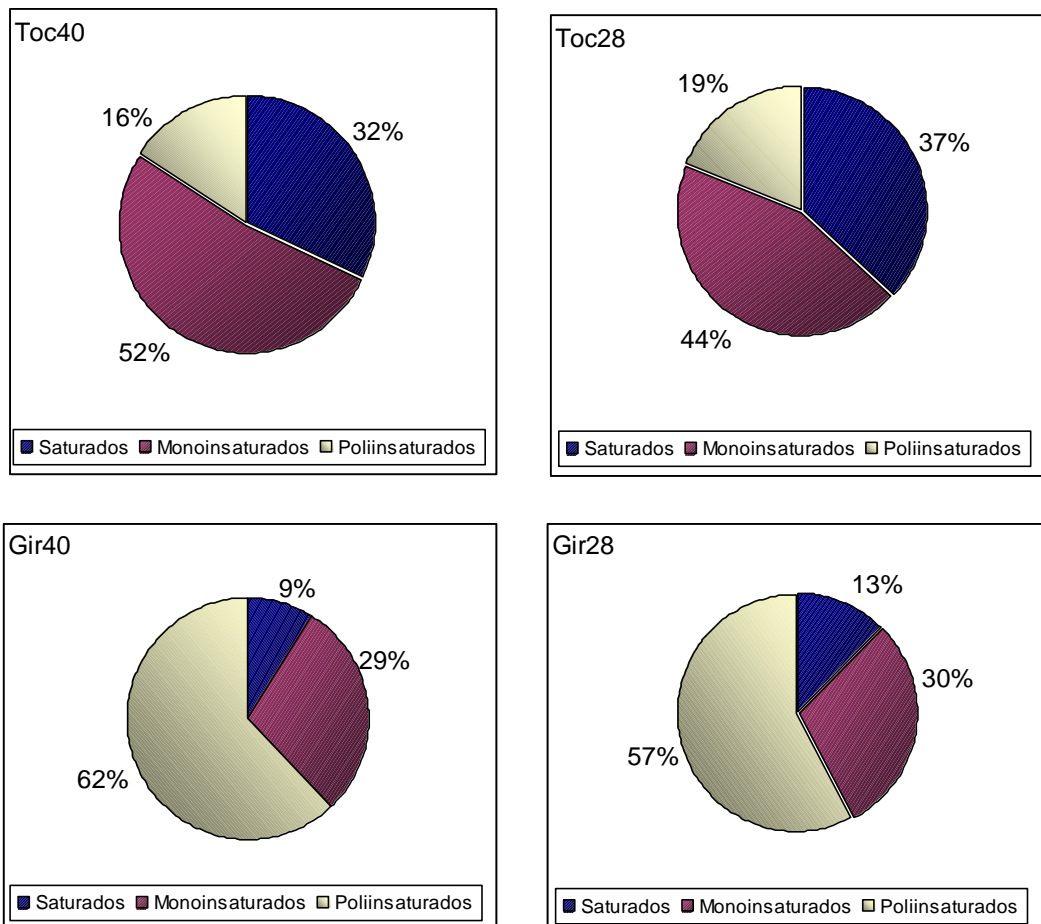


Figura 3.1. Porcentajes relativos de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados correspondientes a las distintas formulaciones de patés de hígado de pollo

En cambio, los patés con tocino presentaron mayores tenores ($p < 0,05$) de ácidos grasos saturados, a los distintos niveles de materia grasa. Por último, los porcentajes de ácidos grasos monoinsaturados fueron mayores para los patés con tocino y con un tenor graso de 40%, según los resultados del análisis estadístico.

En las **Tablas 3.3 y 3.4** se muestra la composición de ácidos grasos de los patés elaborados con 40 y 28% p/p de tocino respectivamente, correspondientes al inicio y al final del periodo de almacenamiento, así como las formulaciones obtenidas en ambos casos con la adición de extractos de romero y de té verde.

En la formulación Toc40 se observó que el ácido graso más abundante es el ácido oleico, el cual representa el 50,49% del total, seguido por los ácidos palmítico (20,80%), linoleico (14,18%) y esteárico (8,90%). Los restantes ácidos grasos se presentaron en muy bajos niveles. Los resultados obtenidos para la composición de ácidos grasos de la formulación Toc40 concuerdan con los informados por Estévez y col. (2004, 2007) en patés de hígado de cerdo, excepto en una menor proporción de ácido linoleico. La reducción del porcentaje de tocino estuvo acompañada de una disminución en el contenido de ácido oleico (50,49 vs. 39,51%), principal ácido graso aportado por el tocino. En cambio, los ácidos grasos poliinsaturados fueron más abundantes en los patés Toc28 (19,03 vs. 15,78%) lo cual puede relacionarse con una mayor incidencia de la composición aportada por el hígado.

El análisis estadístico realizado puso en evidencia la influencia significativa ($p < 0,05$) del tipo de materia grasa empleada en el perfil lipídico de los patés elaborados. Este hecho se pone de manifiesto al observar la composición acídica de los patés elaborados con aceite de girasol, la cual se muestra en las **Tablas 3.5 y 3.6**. El perfil obtenido está constituido solamente por los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico. El contenido de los ácidos grasos saturados y del ácido oleico fue menor en estos patés que en los elaborados con tocino, en cambio, se cuadruplicó el contenido de ácido linoleico.

Delgado-Pando y col. (2011) también observaron modificaciones en la composición de ácidos grasos de acuerdo al tipo de materia grasa empleada en patés de hígado de cerdo cuando reemplazaron el tocino por una mezcla de aceites saludables constituida por aceites de oliva, lino y pescado, observando en este caso incrementos en los ácidos grasos n-3 aportados por los aceites incorporados.

Tabla 3.3. Composición de ácidos grasos (%) de patés de hígado de pollo elaborados con 40% p/p de tocino en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Efecto de la adición antioxidantes naturales: extracto de romero (-R) y extracto de té verde (-T)

Almacenamiento (días)	Formulación					
	Toc40		Toc40-R		Toc40-T	
	0	150	0	150	0	150
Ácidos grasos						
14:0	1,27 ± 0,01	1,66 ± 0,19	1,75 ± 0,34	1,51 ± 0,27	1,49 ± 0,22	1,65 ± 0,05
16:0	20,80 ± 3,24	22,97 ± 0,89	20,84 ± 7,64	24,22 ± 4,21	22,99 ± 0,13	23,87 ± 0,36
16:1n7	2,14 ± 0,18	2,61 ± 0,29	2,91 ± 0,47	2,12 ± 0,11	2,40 ± 0,01	2,64 ± 0,41
18:0	8,90 ± 2,93	8,18 ± 0,45	6,65 ± 2,93	10,09 ± 2,44	9,14 ± 1,99	8,36 ± 0,85
18:1n-9	50,49 ± 3,91	47,76 ± 2,08	48,11 ± 6,82	45,05 ± 6,54	45,01 ± 1,14	45,28 ± 0,47
18:1n-7	nd	nd	2,29 ± 0,41	1,07 ± 1,51	2,15 ± 0,28	1,81 ± 0,04
18:2n-6	14,18 ± 1,92	14,62 ± 0,12	15,49 ± 2,76	13,56 ± 1,51	13,93 ± 0,38	14,13 ± 0,32
18:3n-3	0,50 ± 0,10	0,55 ± 0,02	0,58 ± 0,11	0,49 ± 0,07	1,00 ± 0,74	0,52 ± 0,01
20:0	1,11 ± 0,01	0,85 ± 0,01	0,82 ± 0,20	0,83 ± 0,08	0,84 ± 0,04	0,76 ± 0,01
20:2n-6	0,64 ± 0,05	0,56 ± 0,02	0,57 ± 0,13	0,57 ± 0,06	0,56 ± 0,03	0,50 ± 0,00
20:4n-6	0,47 ± 0,19	0,54 ± 0,01	0,59 ± 0,19	0,52 ± 0,06	0,52 ± 0,02	0,50 ± 0,02
Saturados	32,07 ± 6,19	33,65 ± 1,54	30,06 ± 11,11	36,64 ± 7,00	34,45 ± 2,38	34,63 ± 1,27
Monoinsaturados	52,62 ± 4,09	50,37 ± 2,37	53,31 ± 7,70	48,23 ± 8,16	49,55 ± 1,43	49,73 ± 0,93
Poliinsaturados	15,78 ± 2,26	16,25 ± 0,17	17,23 ± 3,19	15,13 ± 1,70	16,01 ± 1,17	15,64 ± 0,35
Total insaturados	68,40 ± 6,35	66,62 ± 2,54	70,53 ± 10,89	63,36 ± 9,86	65,56 ± 2,60	65,37 ± 1,28
Insaturados/Saturados	2,19 ± 0,62	1,98 ± 0,15	2,57 ± 1,28	1,78 ± 0,52	1,91 ± 0,16	1,89 ± 0,10

Tabla 3.4. Composición de ácidos grasos (%) de patés de hígado de pollo elaborados con 28% p/p de tocino en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Efecto de la adición de antioxidantes naturales: R-extracto de romero, T-extracto de té verde

<i>Almacenamiento (días)</i>	<i>Formulación</i>					
	<i>Toc28</i>		<i>Toc28-R</i>		<i>Toc28-T</i>	
	<i>0</i>	<i>150</i>	<i>0</i>	<i>150</i>	<i>0</i>	<i>150</i>
Ácidos grasos						
14:0	2,02 ± 0,18	1,82 ± 0,15	1,92 ± 0,31	1,86 ± 0,52	1,59 ± 0,15	2,13 ± 0,23
16:0	24,83 ± 1,09	24,66 ± 1,55	25,93 ± 2,26	24,70 ± 2,09	23,67 ± 0,66	25,17 ± 3,87
16:1n-7	2,30 ± 0,06	2,79 ± 0,16	2,68 ± 0,28	2,71 ± 0,56	2,61 ± 0,21	2,80 ± 0,08
18:0	9,32 ± 0,38	10,24 ± 1,92	9,39 ± 0,33	9,73 ± 0,97	10,20 ± 0,59	8,44 ± 1,00
18:1n-9	39,51 ± 0,72	39,29 ± 1,48	39,10 ± 1,80	39,69 ± 1,67	42,49 ± 1,17	40,31 ± 2,98
18:1n-7	2,44 ± 0,03	2,33 ± 0,04	2,03 ± 0,13	1,97 ± 0,27	2,67 ± 0,49	2,32 ± 0,37
18:2n-6	16,90 ± 0,80	16,10 ± 0,80	15,96 ± 0,47	16,14 ± 0,40	14,26 ± 1,42	16,64 ± 1,63
18:3n-3	1,09 ± 0,02	0,94 ± 0,05	0,94 ± 0,03	0,94 ± 0,05	0,80 ± 0,23	0,97 ± 0,08
20:0	0,88 ± 0,05	0,82 ± 0,08	0,74 ± 0,14	0,84 ± 0,18	0,89 ± 0,15	0,76 ± 0,11
20:2n-6	0,73 ± 0,10	0,57 ± 0,06	0,56 ± 0,11	0,58 ± 0,08	0,85 ± 0,28	0,50 ± 0,01
20:4n-6	0,32 ± 0,09	0,89 ± 0,06	0,78 ± 0,09	0,87 ± 0,11	1,02 ± 0,47	0,82 ± 0,22
Saturados	37,05 ± 1,70	37,53 ± 3,70	37,98 ± 3,05	37,12 ± 3,76	36,34 ± 1,55	36,48 ± 5,20
Monoinsaturados	44,25 ± 0,81	44,42 ± 1,68	43,81 ± 2,20	44,37 ± 2,50	47,76 ± 1,86	45,42 ± 3,42
Poliinsaturados	19,03 ± 1,01	18,48 ± 0,98	18,23 ± 0,69	18,52 ± 0,64	16,92 ± 2,39	18,91 ± 1,94
Total insaturados	63,27 ± 1,82	62,90 ± 2,65	62,04 ± 2,89	62,89 ± 3,13	64,67 ± 4,25	64,33 ± 5,36
Insaturados/ Saturados	1,71 ± 0,11	1,69 ± 0,22	1,64 ± 0,15	1,71 ± 0,11	1,78 ± 0,02	1,79 ± 0,39

Tabla 3.5. Composición de ácidos grasos (%) de patés de hígado de pollo elaborados con 40% p/p de aceite de girasol en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.
Efecto de la adición de antioxidantes naturales: R-extracto de romero, T-extracto de té verde

<i>Almacenamiento (días)</i>	<i>Formulación</i>					
	<i>Gir40</i>		<i>Gir40-R</i>		<i>Gir40-T</i>	
	<i>0</i>	<i>150</i>	<i>0</i>	<i>150</i>	<i>0</i>	<i>150</i>
Ácidos grasos						
16:0	6,53 ± 0,08	7,04 ± 0,43	7,27 ± 0,87	7,24 ± 0,18	6,55 ± 0,54	6,71 ± 0,12
18:0	3,10 ± 0,02	3,55 ± 0,05	3,53 ± 0,14	3,60 ± 0,01	3,12 ± 0,33	3,64 ± 0,07
18:1n-9	28,74 ± 0,16	28,92 ± 0,33	27,99 ± 0,39	28,91 ± 0,52	28,43 ± 0,37	29,22 ± 0,08
18:2n-6	61,63 ± 0,22	60,50 ± 0,06	61,22 ± 0,62	60,25 ± 0,35	61,90 ± 0,49	60,44 ± 0,11
Saturados	9,63 ± 0,11	10,58 ± 0,48	10,80 ± 1,01	10,84 ± 0,20	9,67 ± 0,86	10,35 ± 0,19
Monoinsaturados	28,74 ± 0,16	28,92 ± 0,33	27,99 ± 0,39	28,91 ± 0,52	28,43 ± 0,37	29,22 ± 0,08
Poliinsaturados	61,63 ± 0,22	60,50 ± 0,06	61,22 ± 0,62	60,25 ± 0,35	61,90 ± 0,49	60,44 ± 0,11
Total insaturados	90,37 ± 0,37	89,42 ± 0,38	89,21 ± 1,01	89,16 ± 0,87	90,33 ± 0,86	89,66 ± 0,19
Insaturados/Saturados	9,39 ± 0,07	8,46 ± 0,34	8,30 ± 0,87	8,23 ± 0,15	9,38 ± 0,93	8,67 ± 0,18

Tabla 3.6. Composición de ácidos grasos (%) de patés de hígado de pollo elaborados con 28% p/p de aceite de girasol en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.
Efecto de la adición antioxidantes naturales: extracto de romero (-R) y extracto de té verde (-T)

Almacenamiento (días)	Gir28		Formulación Gir28-R		Gir28-T	
	0	150	0	150	0	150
Ácidos grasos						
16:0	8,34 ± 0,33	6,98 ± 0,42	7,37 ± 0,37	7,06 ± 0,01	7,48 ± 0,65	6,84 ± 0,06
18:0	4,57 ± 0,06	4,34 ± 0,13	5,70 ± 0,07	4,49 ± 0,60	4,41 ± 0,40	4,30 ± 0,33
18:1n-9	30,28 ± 0,41	29,53 ± 0,23	29,73 ± 0,83	29,21 ± 0,07	35,71 ± 4,92	29,31 ± 0,08
18:2n-6	56,82 ± 0,16	59,16 ± 0,06	57,21 ± 0,50	59,25 ± 0,54	56,90 ± 2,48	59,57 ± 0,19
Saturados	12,91 ± 0,39	11,32 ± 0,55	13,07 ± 0,45	11,54 ± 0,61	11,89 ± 1,05	11,13 ± 0,40
Monoinsaturados	30,28 ± 0,41	29,53 ± 0,23	29,73 ± 0,83	29,21 ± 0,07	35,71 ± 4,92	29,31 ± 0,08
Poliinsaturados	56,82 ± 0,16	59,16 ± 0,06	57,21 ± 0,50	59,25 ± 0,54	56,90 ± 2,48	59,57 ± 0,19
Total insaturados	87,10 ± 0,57	88,68 ± 0,30	86,93 ± 1,33	88,46 ± 0,61	92,61 ± 7,40	88,87 ± 0,27
Insaturados/Saturados	6,75 ± 0,16	7,84 ± 0,23	6,66 ± 0,18	6,94 ± 0,09	7,85 ± 1,31	7,99 ± 0,22

El tiempo de almacenamiento no influyó significativamente en el contenido de la mayoría de los ácidos grasos, a excepción del 20:2n-6 el cual disminuyó significativamente ($p < 0,05$) durante el periodo estudiado. Estos resultados se correlacionan con los aportados por Martín y col. (2009) en patés de hígado de cerdos que recibieron diferentes dietas. Por otra parte, la adición de antioxidantes naturales no modificó significativamente la composición lipídica de los patés. Un factor que puede contribuir a la estabilidad observada es el hecho que los patés fueron almacenados en oscuridad, condiciones diferentes a las que podrían presentarse en productos comerciales envasados en recipientes de vidrio expuestos en gabinetes iluminados. Perlo y col. (1995) también observaron una mayor estabilidad oxidativa en patés con adición de ácido ascórbico almacenados en oscuridad, comparado con aquéllos manufacturados sin este aditivo y expuestos a diferentes intensidades lumínicas. Otro hecho que puede contribuir a la estabilidad de los ácidos grasos es la presencia de varias sustancias con actividad antioxidante en la formulación de estos productos tales como nitrito de sodio y ácido ascórbico así como los tocoferoles aportados por la fase grasa (Bloukas y Paneras, 1993). Este hecho será abordado con más detalle en la siguiente sección.

3.3 Evaluación del deterioro oxidativo

3.3.1 Oxidación de Lípidos

A fin de estudiar el efecto de la adición de los antioxidantes naturales previamente mencionados sobre la estabilidad oxidativa de los patés desarrollados, se determinó el N° de TBA durante el almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

En la **Tabla 3.7** se muestra la evolución de este parámetro en función del tiempo de almacenamiento para todas las formulaciones estudiadas. El paté elaborado con 40% de tocino (Toc40) muestra la mayor estabilidad oxidativa en el periodo de almacenamiento estudiado según el análisis estadístico realizado. La reducción del porcentaje de tocino en la formulación (Toc28) produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) en los valores iniciales del N° de TBA con respecto a la formulación tradicional. Sin embargo, durante el almacenamiento refrigerado este tipo de producto sufrió el mayor deterioro oxidativo produciéndose un incremento significativo ($p < 0,05$) en el N° de TBA, el cual alcanzó valores de 0,95 mg MDA/kg al cabo de 150 días.

Tabla 3.7. Evolución del N° de TBA (mg MDA/kg) en patés de hígado de pollo elaborados con tocino (Toc) 40 y 28% p/p o aceite de girasol (Gir) 40 y 28% p/p en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.
Efecto de la adición de antioxidantes naturales: extracto de romero (-R) y extracto de té verde (-T)

Formulación	Almacenamiento (días)					
	0	30	60	90	120	150
Toc40	0,467 ^{c,α} ± 0,152	0,514 ^{b,c,α} ± 0,167	0,566 ^{b,c,α} ± 0,094	0,571 ^{b,c,α} ± 0,168	0,503 ^{b,c,α} ± 0,047	0,502 ^{a,b,α} ± 0,170
Toc40-R	0,394 ^{b,c,α} ± 0,115	0,511 ^{b,c,α,β} ± 0,172	0,644 ^{c,d,γ} ± 0,103	0,426 ^{a,α,β} ± 0,078	0,535 ^{b,c,β,γ} ± 0,089	0,484 ^{a,b,α,β} ± 0,145
Toc40-T	0,361 ^{b,c,α} ± 0,111	0,426 ^{a,b,α,β} ± 0,172	0,546 ^{b,c,β,γ} ± 0,132	0,475 ^{a,b,α,β,γ} ± 0,087	0,564 ^{c,γ} ± 0,019	0,523 ^{b,β,γ} ± 0,191
Toc28	0,314 ^{a,b,α} ± 0,059	0,587 ^{c,d,β} ± 0,111	0,601 ^{c,d,β} ± 0,052	0,742 ^{d,γ} ± 0,171	0,701 ^{d,β} ± 0,047	0,948 ^{d,δ} ± 0,146
Toc28-R	0,292 ^{a,α} ± 0,038	0,519 ^{c,β} ± 0,122	0,492 ^{a,b,β} ± 0,101	0,702 ^{d,γ} ± 0,128	0,640 ^{d,β,γ} ± 0,073	0,611 ^{c,β,γ} ± 0,121
Toc28-T	0,285 ^{a,α} ± 0,073	0,524 ^{c,β} ± 0,091	0,546 ^{b,c,β} ± 0,095	0,618 ^{c,d,β,γ} ± 0,144	0,527 ^{b,c,β} ± 0,081	0,671 ^{c,γ} ± 0,170
Gir40	0,651 ^{d,β} ± 0,146	0,587 ^{c,d,α} ± 0,077	0,620 ^{c,d,β} ± 0,176	0,551 ^{b,c,α} ± 0,131	0,544 ^{b,c,α} ± 0,168	0,711 ^{c,β} ± 0,294
Gir40-R	0,711 ^{d,β} ± 0,104	0,519 ^{c,β} ± 0,046	0,486 ^{a,β} ± 0,054	0,454 ^{a,b,α} ± 0,105	0,467 ^{a,b,β} ± 0,075	0,467 ^{a,β} ± 0,151
Gir40-T	0,646 ^{d,β,γ} ± 0,157	0,677 ^{d,γ} ± 0,239	0,467 ^{a,d,α} ± 0,145	0,461 ^{a,b,α} ± 0,153	0,355 ^{a,α} ± 0,028	0,621 ^{c,β} ± 0,214
Gir28	0,401 ^{b,c,α} ± 0,062	0,473 ^{a,b,c,α} ± 0,061	0,664 ^{d,β} ± 0,131	0,651 ^{c,d,β} ± 0,214	0,718 ^{d,β} ± 0,152	0,505 ^{a,b,α} ± 0,138
Gir28-R	0,375 ^{b,c,α} ± 0,119	0,532 ^{c,β} ± 0,091	0,623 ^{c,d,β,γ} ± 0,100	0,664 ^{d,γ} ± 0,054	0,744 ^{d,γ} ± 0,082	0,490 ^{a,b,α} ± 0,100
Gir28-T	0,338 ^{a,b,α} ± 0,090	0,388 ^{a,α,β} ± 0,063	0,565 ^{b,c,γ} ± 0,109	0,509 ^{b,β,γ} ± 0,059	0,621 ^{d,γ} ± 0,079	0,409 ^{a,α,β} ± 0,031

^{a,b,c,d} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

^{α,β,γ,δ} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

La sustitución de tocino por aceite de girasol en la elaboración de paté (Gir40) produjo al inicio del almacenamiento ($t=0$) el producto con mayor N° de TBA (0,65 mg MDA/Kg), lo que sugiere que el mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) del aceite de girasol le confieren a esta formulación una mayor susceptibilidad durante las etapas de procesamiento, ya que las mismas involucran la disrupción de los tejidos durante la homogeneización y el tratamiento térmico durante la cocción. Posteriormente, este producto mantuvo los niveles del N° de TBA sin cambios significativos hasta las últimas etapas del periodo de almacenamiento refrigerado. El reemplazo y disminución del porcentaje de fase grasa (Gir28) dio lugar a un producto con valores iniciales del N° de TBA que no presentaron diferencias significativas ($p>0,05$) con los obtenidos en los productos elaborados con tocino. Debido a este comportamiento el factor tipo de materia grasa no fue significativo en el análisis estadístico llevado a cabo. La evolución del N° de TBA en función del tiempo de almacenamiento de los patés Gir28 mostró un incremento significativo ($p<0,05$) a los 60 días manteniéndose luego sin cambios durante el resto del periodo de almacenamiento refrigerado.

A fin de disminuir el deterioro oxidativo durante el almacenamiento de estos productos se estudió el efecto de la adición de antioxidantes naturales. El análisis estadístico de los valores del N° de TBA correspondientes a los patés sin y con antioxidantes a tiempo inicial no mostró diferencias significativas ($p>0,05$) con respecto a la adición de los extractos de romero o de té verde en todas las formulaciones desarrolladas. Al final del periodo de almacenamiento estudiado, se observó un efecto protector de los antioxidantes naturales en los patés que sufrieron mayor deterioro oxidativo (Toc28 y Gir40). En el caso de Toc28 con la adición de ambos antioxidantes, los valores de TBA disminuyeron significativamente ($p<0,05$). En el caso de Gir40, únicamente el extracto de romero ejerció un efecto antioxidante. En las formulaciones en las cuales el deterioro oxidativo fue menor (Toc40 y Gir28), no se evidenciaron diferencias significativas en presencia de los antioxidantes en las concentraciones empleadas (**Tabla 3.7**).

La adición de antioxidantes naturales como inhibidores de la lipoperoxidación en productos cárnicos ha sido informada (Mc Carthy y col., 2001a y b; Sebranek y col., 2005) en hamburguesas y en embutidos de cerdo. Mc Carthy y col., (2001a) determinaron el efecto antioxidante de diferentes extractos vegetales, entre ellos romero (0,1%) y té verde (0,25%) en hamburguesas de cerdo crudas y cocidas

almacenadas durante 9 días en condiciones de refrigeración. Cabe señalar que estos autores emplearon una concentración de extracto de romero similar a la de este trabajo de Tesis y una concentración de extracto de té verde muy superior, observando que ambos antioxidantes fueron efectivos en las dosis empleadas para disminuir los valores de TBA en hamburguesas crudas. En cambio, en hamburguesas cocidas, las catequinas del té verde fueron más efectivas que los principios activos del extracto de romero. Resultados similares fueron obtenidos en carne fresca o previamente congelada destinada a la elaboración de hamburguesas, observándose que las catequinas del té fueron igualmente efectivas en ambos tipos de producto mientras que el extracto de romero presentó una mayor eficiencia en las hamburguesas preparadas con carne previamente congelada (Mc Carthy y col., 2001b).

En general, el efecto de ciertos antioxidantes puede variar considerablemente dependiendo de la compleja interacción entre varios factores, los cuales incluyen el tipo y concentración de los compuestos activos del antioxidante utilizado y la naturaleza del sistema alimentario. La determinación de la actividad antioxidante de un cierto extracto puede presentar variaciones significativas según la composición química de los distintos productos a los cuales son aplicados. Es decir, la eficiencia de los extractos al ser adicionados a una matriz alimentaria de una determinada composición de ácidos grasos y actividad acuosa puede ser diferente a la observada en otros productos, por ello cada extracto debe ser ensayado en cada alimento (Nissen y col., 2004). Por otra parte, en la **Tabla 3.7** puede observarse que para algunos de los productos desarrollados (Toc40-R, Gir28, Gir28-R y Gir28-T), los valores de TBARS aumentaron hasta cierto valor y luego disminuyeron durante el almacenamiento, lo que puede atribuirse a la interacción de estos productos secundarios de oxidación con otros componentes de la matriz del alimento tales como las proteínas (Bozkurt, 2006).

Cabe señalar que todos los patés estudiados presentaron al cabo de los 150 días de almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ valores del N° de TBA inferiores a 1 mg MDA/kg; según Boles y Parrish (1990) a partir de dicho valor comienza a detectarse el WOF en productos cárnicos, afectándose la calidad organoléptica. Para Georgantelis y col. (2007) el flavor rancio es detectado en productos cárnicos cuando los valores de TBARS exceden 0,6 mg MDA/kg; mientras que Campo y col. (2006) consideran, que el límite para la aceptabilidad debida al deterioro oxidativo en carne vacuna es

del orden de 2,0 mg MDA/kg. Además, los valores de TBA obtenidos en los patés desarrollados fueron inferiores a los obtenidos por Estévez y col. (2007) para patés de hígado de cerdo elaborados con 40% de tocino durante 90 días de almacenamiento refrigerado. Bloukas y Paneras (1993) formularon salchichas de bajo contenido de grasa (10%) con reemplazo de la misma por aceite de oliva. Los valores de TBA de las salchichas control elaboradas con tocino fueron mayores que los obtenidos con aceite de oliva pero en ningún caso superaron el valor de 1,0 mg MDA/Kg, rango aceptable de rancidez oxidativa. Estos autores atribuyeron la estabilidad oxidativa a la presencia de agentes de curado tales como nitritos, ascorbato y otros aditivos tales como fosfatos, los cuales también pueden actuar como antioxidantes.

El análisis estadístico de los valores del N° de TBA obtenidos para los patés desarrollados dio como resultado que el tipo de materia grasa no afectó significativamente la oxidación de los lípidos. Esto podría deberse a la presencia de otros antioxidantes naturales tales como los tocoferoles. Los patés con aceite de girasol mostraron un nivel de estabilidad oxidativa mayor al esperado en función de su composición de ácidos grasos (rica en ácidos grasos poliinsaturados). Cabe señalar que el contenido de tocoferoles totales en el aceite de girasol utilizado en la elaboración de los patés fue de $502,47 \pm 21,10 \mu\text{g/g}$, de los cuales el α -tocoferol representó el componente mayoritario ($498,44 \pm 20,36 \mu\text{g/g}$), mientras que el resto ($4,03 \pm 0,74$) correspondió al β -tocoferol, no detectándose los vitámeros γ y δ . Los resultados obtenidos concuerdan con los informados por Muguerza y col. (2003) los que utilizaron aceite de soja en reemplazo de tocino en chorizo de Pamplona. Por otra parte, el contenido de tocoferoles en el tocino empleado en la manufactura de los patés Toc28 y Toc40 fue de $350 \mu\text{g/g}$ siendo el α -tocoferol, el único vitámero hallado.

Además, algunos autores han indicado que los antioxidantes naturales como los adicionados a los patés (extractos de romero y de té verde) pueden interactuar con la vitamina E, registrándose un efecto sinérgico (Wong y col., 1995; Nissen y col., 2004). Mitsumoto y col. (2005) estudiaron el efecto de las catequinas de té verde (200 y 400 mg/Kg) y de la vitamina C sobre la estabilidad de los lípidos en hamburguesas crudas y cocidas de carne vacuna y de pollo almacenadas en refrigeración bajo luz fluorescente, observando que ambos tipos de antioxidantes produjeron una disminución del N° de TBA en los productos estudiados.

De acuerdo al análisis estadístico realizado y teniendo en cuenta los factores analizados (tipo y concentración de materia grasa, presencia de antioxidantes y tiempo de almacenamiento refrigerado) en sus respectivos niveles, puede indicarse que el factor tiempo de almacenamiento influyó de diferente forma sobre los valores del N° de TBA en los patés desarrollados. Estos resultados pueden ser atribuidos a las diferentes composiciones químicas correspondientes a las distintas formulaciones estudiadas. La incorporación de los antioxidantes naturales redujo los niveles de este parámetro mostrando un efecto protector en las formulaciones que presentaron mayor deterioro oxidativo. Esta reducción fue más significativa para el extracto de té verde. No obstante, si bien el tipo de materia grasa fue el único factor que no influyó significativamente en el N° de TBA, la interacción cuádruple fue altamente significativa ($p=0,001$) indicando la importante interrelación entre la composición química de los patés y el tiempo de almacenamiento.

3.3.2. Oxidación de Proteínas

A fin de evaluar la posible pérdida de calidad de los productos desarrollados debido al deterioro oxidativo de las proteínas presentes, se determinó la concentración de carbonilos proteicos en los patés con y sin la adición de antioxidantes naturales.

La evolución de la concentración de carbonilos en función del tiempo de almacenamiento refrigerado se representa en la **Figura 3.2** para las distintas formulaciones de paté. Los patés de menor contenido graso Toc28 y Gir28 mostraron valores iniciales de carbonilos significativamente menores ($p < 0,05$) que los detectados en los patés de mayor contenido lipídico Toc40 y Gir40. Los resultados obtenidos para patés elaborados con 40% de tocino fueron más elevados ($p < 0,05$) que los de igual tenor graso elaborados con aceite de girasol al inicio del almacenamiento. Por otra parte, en el caso de los patés con 28% de materia grasa, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en el contenido inicial de carbonilos entre los patés elaborados con tocino y los manufacturados con aceite de girasol.

El contenido de carbonilos proteicos se incrementó significativamente en función del tiempo de almacenamiento refrigerado. Los patés que sufrieron el mayor deterioro oxidativo de proteínas fueron Toc28 y Gir28. Estas formulaciones experimentaron diferencias altamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores detectados al inicio y al final del periodo de almacenamiento estudiado. Este hecho

podría deberse al mayor tenor de hígado utilizado en dichas formulaciones, el cual fue empleado para compensar la disminución del contenido de materia grasa. De este modo las formulaciones bajas en grasa presentan una diferente composición química, mostrando un mayor nivel proteico y diferente contenido de hierro, principal catalizador de los procesos oxidativos. En los patés con 40% de materia grasa, si bien presentaron los mayores valores iniciales, la evolución de este parámetro no mostró una tendencia tan marcada en función del tiempo de almacenamiento como en los casos anteriores.

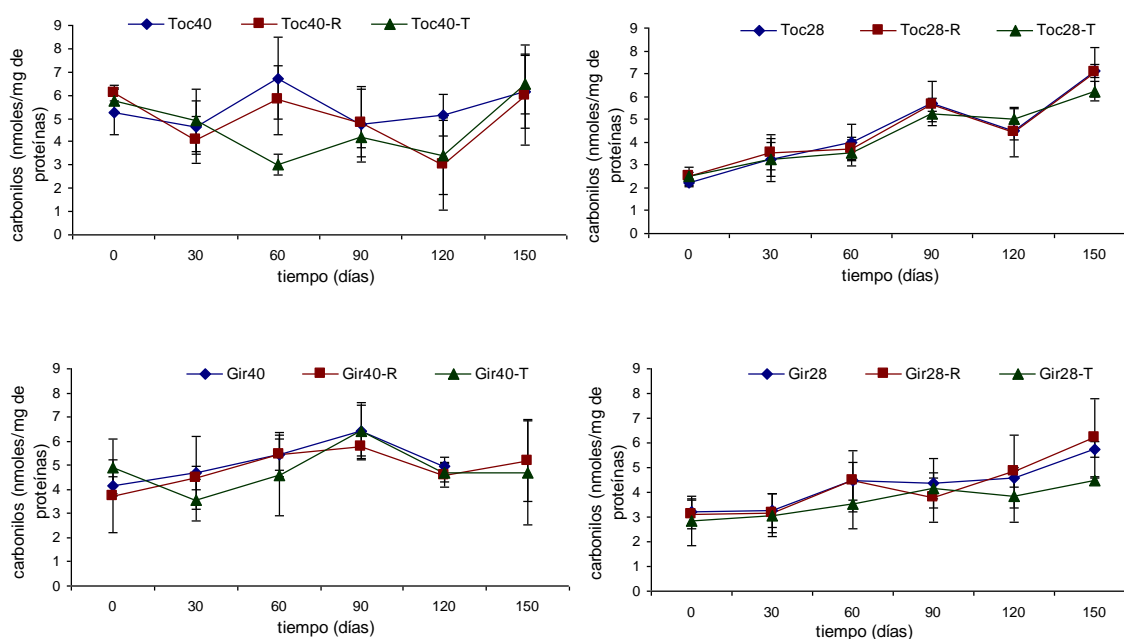


Figura 3.2. Evolución del contenido de grupos carbonilos de proteínas (nmol/mg de proteínas) correspondientes a las distintas formulaciones de paté de hígado de pollo en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Las barras en cada gráfico indican la desviación estándar

El proceso de oxidación de proteínas puede ser explicado según Lund y col. (2007), por un mecanismo que involucra las especies reactivas al oxígeno derivadas de lípidos tales como los radicales peroxilo ($\text{LOO}\cdot$), los que son además iniciadores de la oxidación de proteínas. La oxidación simultánea de lípidos y proteínas en sistemas cárnicos sugiere la posible interacción entre ambos fenómenos. Estévez y Cava (2006) también postularon la existencia de una correlación significativa entre la oxidación de lípidos y la oxidación de proteínas.

Con respecto al efecto de los antioxidantes estudiados sobre la oxidación de proteínas, el análisis estadístico mostró que tanto el extracto romero como el de té

verde fueron factores significativos ($p < 0,05$) que permitieron la reducción del valor de carbonilos durante el período de almacenamiento estudiado. En forma comparativa, el extracto de té verde produjo una mayor reducción de la oxidación de las proteínas. Esta disminución fue más evidente para Toc40 a los 60 y 120 días con ambos tipos de antioxidantes. En el caso de los patés Gir40 se obtuvieron valores significativamente inferiores de carbonilos con extracto de té verde a los 60 días de almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. En las formulaciones Gir28, el extracto de té verde exhibió una notoria actividad antioxidante hacia el final del periodo de almacenamiento. Estos resultados concuerdan con los descritos por Estévez y col. (2006) quienes estudiaron el efecto de la adición de antioxidantes naturales (aceites esenciales de salvia, romero) y un antioxidante sintético (BHT) sobre la oxidación de proteínas en patés de hígado de cerdo observando que todos los antioxidantes ensayados inhibieron el desarrollo de la oxidación de proteínas durante el almacenamiento refrigerado.

Dicha inhibición de la oxidación proteica observada en presencia de los extractos de romero y té verde puede ser explicada según Estévez y col. (2006) por la presencia de compuestos fenólicos presentes en dichos extractos, los cuales son capaces de secuestrar especies reactivas del oxígeno (ROS) e inhibir la degradación de proteínas durante la cocción y el almacenamiento de los productos cárnicos.

En resumen, las formulaciones de paté con un menor tenor graso presentaron menores valores de este parámetro.

El factor tiempo de almacenamiento refrigerado influyó aumentando significativamente el contenido de carbonilos proteicos en las formulaciones Toc28 y Gir28; la adición de antioxidantes naturales fue efectiva para proteger las proteínas del daño oxidativo.

3.3.3. Determinación de hierro hemínico

El hierro hemínico es otro parámetro útil que permite evaluar el daño oxidativo de este tipo de producto cárnico graso. En la **Figura 3.3** se presentan los resultados obtenidos para la concentración de hierro hemínico correspondiente a todas las formulaciones estudiadas durante el almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

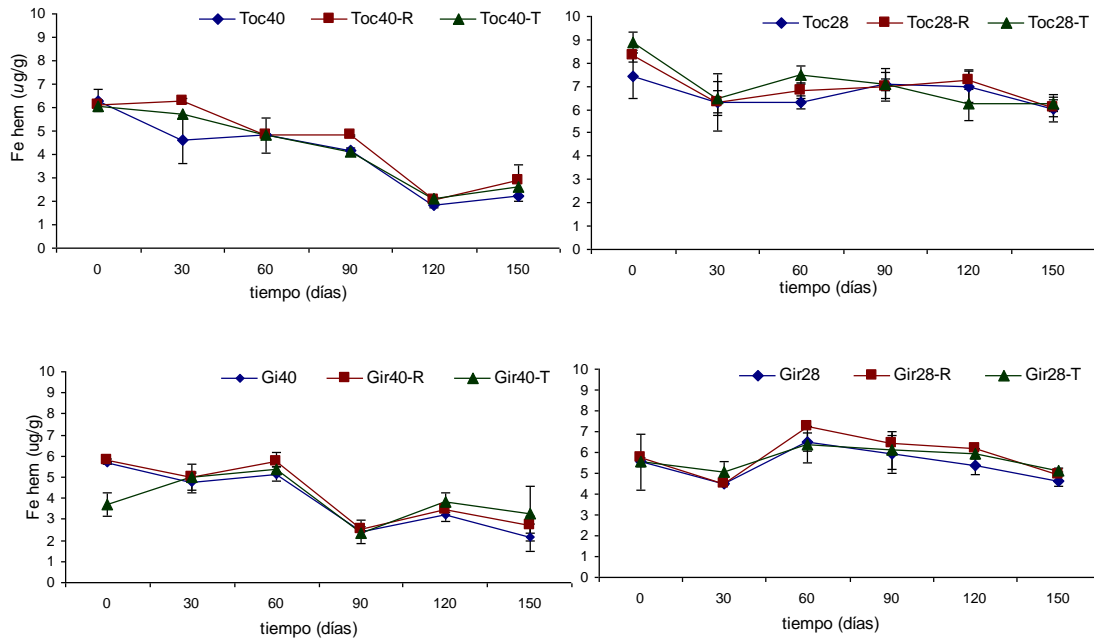


Figura 3.3. Evolución de Fe hemínico ($\mu\text{g/g}$ de paté) correspondiente a las distintas formulaciones de paté de hígado de pollo en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Las barras en cada gráfico indican la desviación estándar

En los patés de menor tenor graso (Toc28 y Gir28) recién elaborados se observaron valores significativamente mayores ($p < 0,05$) de hierro hemínico. Esto puede deberse a que en estas formulaciones, la disminución del contenido de grasa fue compensada con un mayor aporte de hígado, principal componente que proporciona hierro en este tipo de alimentos. Los valores obtenidos para hierro hemínico en los patés elaborados con aceite de girasol fueron significativamente menores ($p < 0,05$) que los elaborados con tocino a igual concentración de materia grasa.

El factor tiempo de almacenamiento refrigerado provocó una disminución del contenido de hierro hemínico, como era esperable, ya que se observó un aumento del N° de TBA en función del mismo. El análisis de las formulaciones con tocino entre sí, mostró que el contenido de hierro hemínico de Toc40 fue significativamente menor ($p < 0,05$) que el correspondiente a Toc28 para todos los tiempos de almacenamiento estudiados. Las formulaciones que mostraron mayores disminuciones del hierro hemínico durante el almacenamiento fueron Toc40 y Gir40, mientras que las de menor contenido graso fueron más estables.

Los niveles de hierro hemínico informados en este trabajo de Tesis, son del mismo orden de magnitud que los hallados por Clark y col. (1997) en carne de pollo

cocida lista para consumir y por Fernández-López y col. (2003), Schricker y col. (1982) en carne de cerdo.

La adición de antioxidantes naturales fue beneficiosa dado que los valores de hierro hemínico en presencia de los mismos, fueron significativamente más elevados. Este efecto fue más evidente con la adición de extracto de romero. Estévez y col., (2006) analizaron la modificación de la concentración de hierro hemínico y no hemínico en patés de hígado de cerdo durante el almacenamiento refrigerado a 4°C, encontrando también que los antioxidantes (extractos de salvia y romero) protegieron las moléculas de hemo de su degradación, inhibiendo la disminución del hierro hemínico en los patés almacenados. Resultados similares fueron informados por Fernández-López y col. (2003) en un estudio análogo llevado a cabo en carne de cerdo cocida.

De acuerdo al análisis estadístico realizado, puede concluirse que el contenido de hierro hemínico disminuyó significativamente con el tiempo de almacenamiento. El tipo y concentración de materia grasa afectaron significativamente ($p < 0,05$) los valores obtenidos y la incorporación de los antioxidantes estudiados aumentó los niveles de este parámetro presentando el extracto de romero un efecto protector más significativo.

3.3.4. Compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica

Los diversos compuestos volátiles presentes en el espacio cabeza de los patés de hígado de pollo estudiados, fueron determinados mediante microextracción en fase sólida (HS-SPME) y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS). Para ello se seleccionaron los compuestos volátiles más representativos de la degradación oxidativa de los ácidos grasos (alcoholes, aldehídos y cetonas) a partir de las distintas formulaciones de patés.

Cabe señalar que, si bien no se conocen con exactitud todos los intermediarios químicos que constituyen las rutas de formación de los compuestos volátiles a partir de los ácidos grasos (Estévez y col., 2007), los productos finales son específicos para cada tipo de ácido graso, razón por la cual las diferencias en términos de composición de ácidos grasos de los patés elaborados con tocino o con aceite de girasol pueden afectar el perfil de los compuestos volátiles obtenidos.

Las notas de “rancidez” que experimentan los productos cárnicos cocidos durante el almacenamiento refrigerado, como consecuencia de la generación de

compuestos volátiles por degradación de los PUFAs, son conocidas como WOF (“warmed-over-flavor”).

En todas las formulaciones desarrolladas en este trabajo de Tesis, se detectaron los siguientes grupos de compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica. Entre los alcoholes pueden mencionarse 1-hexanol y 1-octen-3-ol los cuales corresponden al flavor característico del hígado oxidado y cuyos descriptores sensoriales son “metálico débil” para el primer compuesto y “aroma a hongos” para el segundo (Im y col., 2004).

Entre los aldehídos saturados se encontraron pentanal, hexanal, heptanal, octanal y nonanal. Los productos secundarios de oxidación tales como hexanal y pentanal son compuestos volátiles asociados al desarrollo de WOF previamente mencionado (Ahn y col., 2002). El hexanal, generado por ruptura de los 13-hidroperóxidos durante la oxidación del ácido linoleico (muy abundante en los patés elaborados con aceite de girasol) ha sido utilizado como indicador para estudiar el grado de oxidación lipídica debido a que su concentración se incrementa con el tiempo (Beltrán y col., 2003). Las notas aromáticas derivadas de la oxidación del ácido graso 18:2 n-6 como el hexanal han sido descriptas por Im y col., (2004) como “grass-like”, lo que se traduce como similar a hierba.

Los aldehídos saturados derivados del ácido oleico (ácidos grasos n-9), tales como octanal y nonanal se han asociado a notas aromáticas agradables descriptas como floral y “sweet” (dulces) y están relacionadas con el aroma y el flavor específico de la carne de pollo (Tan y col., 2006). Cabe señalar que el ácido oleico ha sido el ácido graso mayoritario en los patés elaborados con tocino. Otros autores (Park y col., 2008), han atribuido al octanal y nonanal notas aromáticas descriptas como, “green fresh” (verde fresco) y “green” (verde), respectivamente.

Entre los aldehídos no saturados, se han detectado los siguientes alquenales: 2-(E)-octenal y 2-(E)-nonenal y el alcadienal 2,4-nonadienal en los patés elaborados. El 2-(E)-octenal deriva de ácidos grasos de la familia n-6, tales como el 18:2 n-6, por clivaje de los 11-hidroperóxidos. Este compuesto fue hallado por Im y col., (2004) en muestras de hígado porcino oxidado y su descriptor aromático es “mushroom like” (similar a hongos). El 2-(E)-octenal es de gran importancia sensorial por su olor desagradable y muy bajo umbral (Valencia y col., 2006). El 2-(E)-nonenal está relacionado con el olor similar a cartón (“cardboard-like”) y también posee un muy bajo umbral sensorial (0,08 ppb). Estos dos alquenales también

contribuyen al flavor específico de la carne de pollo (Tan y col., 2006). El 2,4-nonadienal proveniente del deterioro oxidativo de PUFAs, ha sido asociado por Im y col., (2004) a características desagradables en hígado cocido con notas aromáticas de rancidez; sus descriptores aromáticos son “oily” (aceitoso) y “fatty” (grasoso).

Entre las cetonas más importantes detectadas en los patés desarrollados pueden citarse 1-octen-3-ona y la 2-nonanona. En hígado oxidado, Im y col. (2004) han encontrado importantes niveles de 1-octen-3-ona, compuesto de muy bajo umbral sensorial (0,005 ppb) responsable del aroma descrito como “metálico”.

Cabe destacar que en todos los tipos de patés desarrollados, aunque en mayor cantidad en aquéllos elaborados con tocino, se registraron contenidos significativos de dos aldehídos provenientes de la degradación de Strecker (datos no mostrados). Éstos fueron el 3-metilbutanal, compuesto responsable del aroma característico a carne cocida y el benzaldehído, proveniente de la degradación de aminoácidos aromáticos, que proporciona el aroma característico a “almendras” también presente en productos cárnicos, según Adamiec y col. (2001).

Todos los compuestos anteriormente mencionados, también han sido detectados en patés de hígado de cerdo por Estévez y col. (2004, 2005 a y b, 2007), y en salchichas (Estévez y Cava, 2006).

En virtud de lo expuesto, los compuestos hallados se han clasificado para su análisis en cuatro grupos: alcoholes, aldehídos saturados, aldehídos insaturados y cetonas. En las **Figuras 3.4 y 3.5** se muestra la contribución de cada grupo de compuestos, con respecto a los compuestos volátiles totales al inicio del almacenamiento refrigerado. En todas las formulaciones sin y con la adición de antioxidantes naturales, los grupos de compuestos volátiles más abundantes fueron en orden decreciente: alcoholes, aldehídos (saturados e insaturados) y cetonas.

Los resultados obtenidos con respecto al tenor de alcoholes, aldehídos saturados e insaturados y cetonas, no presentaron una tendencia definida según el tipo y concentración de materia grasa, así como respecto de la presencia de los antioxidantes naturales estudiados.

Cabe señalar que la actividad de los extractos de romero y de té verde está relacionada con la matriz del alimento, donde la presencia de los componentes del mismo puede afectar la proporción de compuestos volátiles encontrados.

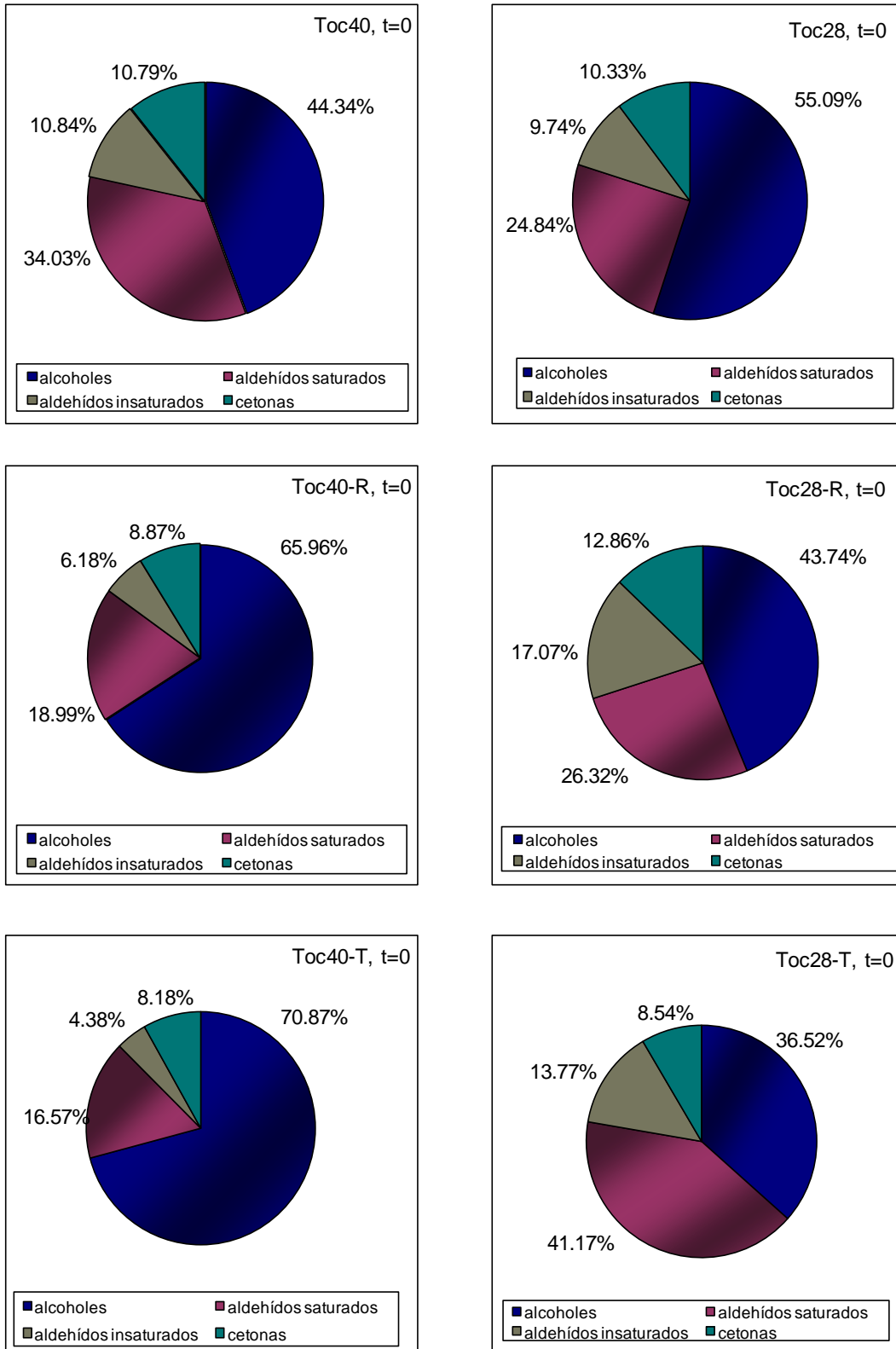


Figura 3.4. Compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica (% del área total) correspondientes a patés de hígado de pollo elaborados con 40 y 28% p/p de tocino, a tiempo inicial. Efecto de antioxidantes: -R extracto de romero, -T extracto de té verde

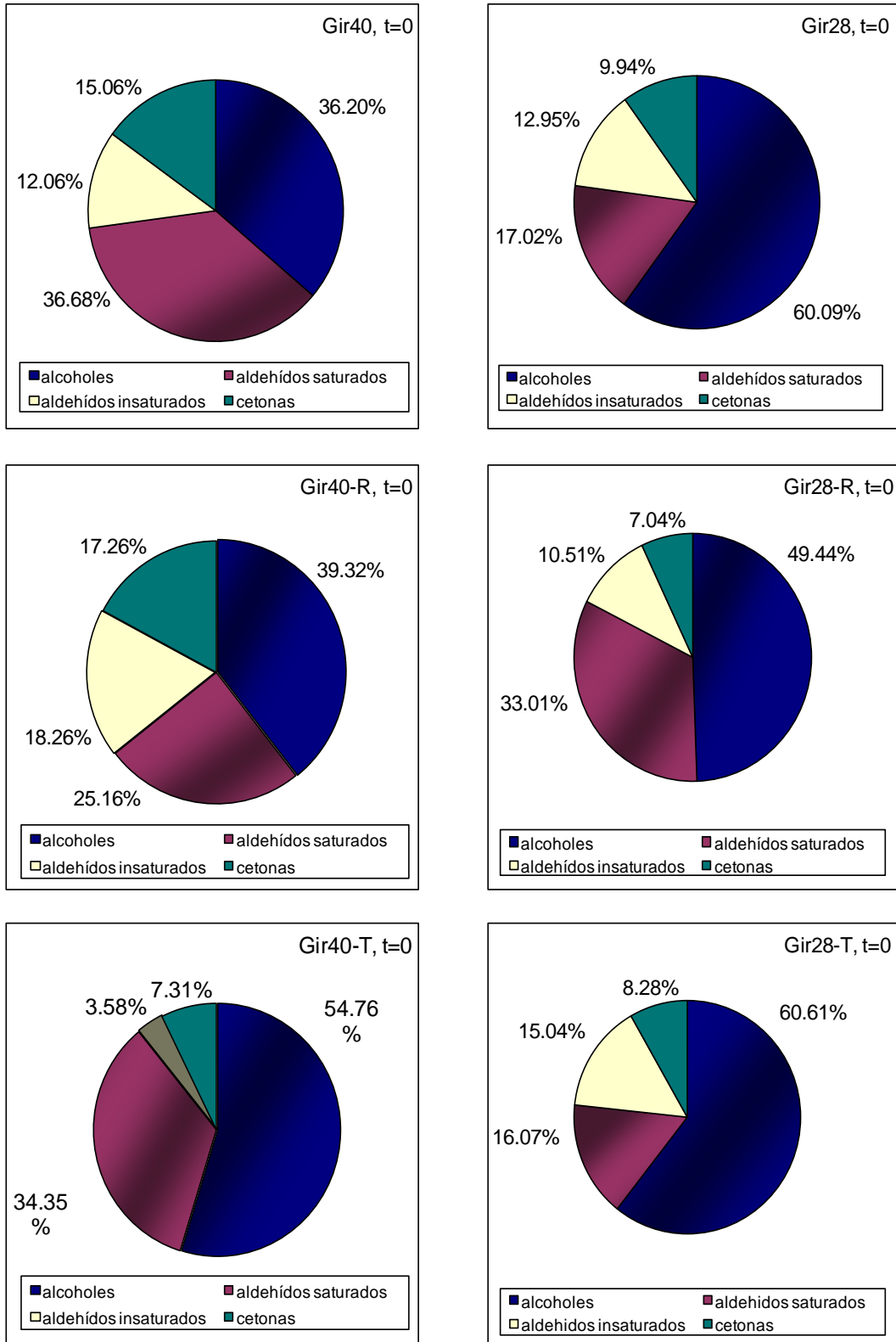


Figura 3.5. Compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica (% del área total) correspondientes a patés de hígado de pollo elaborados con 40 y 28% p/p de aceite de girasol, a tiempo inicial. Efecto de antioxidantes: -R extracto de romero, -T extracto de té verde

Estévez y col., (2005a) analizaron los compuestos volátiles en patés de hígado de cerdo elaborados con distintas proporciones de grasa de cerdo (20, 26 y 31%), muchos de los cuales también fueron detectados en los patés de hígado de pollo de esta Tesis. Estos autores observaron que el tenor graso de los patés afectó las cantidades de los principales compuestos volátiles. Un aumento de 20 a 26% en el contenido de tocino incrementó las cantidades de aldehídos saturados tales como hexanal y octanal, aldehídos insaturados (2-(E)-nonenal y 2,4-(E, E)-nonadienal) y alcoholes (1-octen-3-ol). Sin embargo, cuando se compararon los resultados obtenidos con 26 y 31 % de tocino se registró una disminución de la cantidad de volátiles con el aumento del tenor graso. Estos hallazgos son concordantes con los obtenidos por Estévez y col., (2003) quienes informaron una mayor cantidad de compuestos volátiles derivados de lípidos, en productos cárnicos bajos en grasa que en los de mayor tenor lipídico. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que el mayor contenido de grasas podría reducir la liberación de volátiles desde la matriz del alimento al espacio cabeza (Estévez y col., 2005a)

El tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ no tuvo influencia en los porcentajes relativos de los compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica (datos no mostrados).

En la bibliografía existe información contradictoria en cuanto al efecto del reemplazo de grasa por aceites vegetales en productos cárnicos y su relación con la estabilidad oxidativa. Muguerza y col. (2001) han informado que se genera una menor cantidad de productos de oxidación cuando se reemplaza grasa por aceite de oliva en embutidos fermentados mientras que, Choi y col. (2010) observaron incrementos de la inestabilidad oxidativa como consecuencia del reemplazo de grasas de origen animal por aceites vegetales.

Park y col. (2007) observaron que la mayoría de los compuestos volátiles decrece con el tiempo de almacenamiento por lo cual, para estos autores, no sería posible estimar el grado de oxidación lipídica analizando dichos compuestos.

Debido a la complejidad asociada al análisis de los distintos componentes volátiles que conforman el perfil de aroma de estos patés, algunos autores sugieren el estudio de la relación entre compuestos que producen aromas desagradables y aquéllos que contribuyen al flavor característico del producto. En general, la descomposición oxidativa del ácido oleico conduce a la formación de compuestos volátiles asociados con notas aromáticas agradables, mientras que los volátiles

derivados de PUFAs se han relacionado con notas de rancidez. La relación entre derivados del ácido oleico (octanal, nonanal) y derivados del ácido linoleico (hexanal, 2-(E)-octenal, 2-(E)-nonenal) se ha utilizado como indicador del balance entre compuestos que imparten notas aromáticas agradables y desagradables asociadas a la oxidación lipídica (Estévez y col., 2003).

En la **Tabla 3.8** se muestran los valores obtenidos al relacionar los compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica, los que imparten notas aromáticas agradables y los que proporcionan aromas desagradables a inicio y final del almacenamiento. El análisis estadístico indicó que el tipo de materia grasa empleada en la elaboración de los patés desarrollados en este trabajo de Tesis, es un factor que influye significativamente sobre dicha relación. Los patés manufacturados con tocino presentaron valores significativamente mayores ($p < 0,05$) de esta relación indicando que predominan los compuestos volátiles que imparten notas aromáticas agradables. Estos resultados se relacionan con la diferente composición de ácidos grasos del tocino (rico en ácido oleico) y del aceite de girasol (rico en ácido linoleico). En los patés con aceite de girasol es mayor el contenido de hexanal que deriva del ácido linoleico.

Tabla 3.8. Relación de volátiles (octanal + nonanal / hexanal + 2-octenal + 2-nonenal) en patés de hígado de pollo sin y con antioxidantes a tiempo inicial y final de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$

Formulación	Almacenamiento (días)	
	0	150
Toc40	0,537	1,159
Toc40-R	0,945	0,964
Toc40-T	1,047	3,408
Toc28	0,851	1,086
Toc28-R	1,088	0,423
Toc28-T	0,434	2,494
Gir40	0,406	0,202
Gir40-R	0,705	0,246
Gir40-T	0,257	0,459
Gir28	0,944	0,296
Gir28-R	0,794	0,181
Gir28-T	1,063	0,300

Los patés elaborados con diferente tipo y tenor de materia grasa presentaron distinto perfil de compuestos volátiles debido a sus diferentes susceptibilidades al deterioro oxidativo, su diferente composición de ácidos grasos y contenido de vitamina E. Por ejemplo, los patés elaborados con tocino presentan una alta proporción de MUFAs y baja proporción de PUFAs, lo que podría en parte explicar los resultados obtenidos. Por otra parte, si bien el aceite de girasol utilizado en los patés desarrollados contiene altas proporciones de PUFAs, su contenido de tocoferoles es mucho mayor ($502,47 \pm 21,10 \mu\text{g/g}$) en comparación con el tocino ($350 \mu\text{g/g}$).

3.4. Análisis Microbiológico

Los patés de hígado de pollo fueron elaborados de acuerdo a las normas de buenas prácticas de manufactura (BPM) con un tratamiento térmico de $80 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 minutos el cual disminuyó la carga microbiana inicial. Además fueron almacenados en refrigeración a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, condición que limita el crecimiento microbiano.

En este sentido, el estudio microbiológico realizado sobre los patés en función del almacenamiento refrigerado ($t=150\text{d}$) dio como resultado que los recuentos microbianos no superaron 40 UFC/g para los distintos grupos de microorganismos analizados: mesófilos totales, psicrótrofos, coliformes totales y anaerobios. Esto indica que el tratamiento térmico y la aplicación de bajas temperaturas ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) durante el almacenamiento ensayado fueron operaciones de procesamiento y conservación adecuadas para mantener la calidad higiénico-sanitaria de todas las formulaciones de patés de hígado de pollo elaboradas.

3.5. Análisis organoléptico

3.5.1. Color

El color de los productos cárnicos es uno de los atributos sensoriales más importante de la calidad del producto e influye en la aceptación del consumidor. Los consumidores prefieren el color rojo brillante en las carnes frescas, marrón grisáceo en las carnes cocidas y rosado en los productos cárnicos curados tales como el paté (Jo y col. 2000).

El color de los productos cárnicos procesados depende de los ingredientes utilizados en su formulación, los aditivos incorporados así como, del periodo y las condiciones de almacenamiento. Los pigmentos responsables del color de los productos cárnicos son fundamentalmente los hemopigmentos (mioglobina y hemoglobina).

El color marrón grisáceo de las carnes cocidas es un complejo de coordinación formado por la interacción entre el hierro en estado férrico (Fe^{3+}) y la porfirina, donde las posiciones 5 y 6 de coordinación del hierro están ocupadas por grupos carboxilos de la molécula de globina desnaturalizada y agua, respectivamente (Jo y col., 2000).

En los productos cárnicos cocidos curados como el paté, el color rosado característico se debe a los pigmentos mono y di nitrosil hemocromo. Estos compuestos se forman por la combinación del óxido nítrico con los hemopigmentos. El óxido nítrico proviene de los nitritos adicionados en la formulación de los productos curados. Además, el ácido ascórbico incorporado en estas preparaciones contribuye en el proceso de nitrificación, ya que favorece la formación de óxido nítrico a partir de los nitritos.

Ahora bien, los cambios de color durante el almacenamiento refrigerado en productos cárnicos cocidos se han asociado a fenómenos de oxidación y dependen de factores tales como el tipo de envase, las condiciones de iluminación, la presencia de antioxidantes, etc. Según Perlo y col. (1995) cuando los pigmentos rosados se oxidan, se transforman en hemicromos de color marrón grisáceo. Como consecuencia de los procesos oxidativos se produce la degradación del hemo y la liberación de Fe de las hemoproteínas, lo que trae aparejado alteraciones en el color de los productos cárnicos. Los patés de hígado contienen altos contenidos de hierro y grasa, por lo que es esperable que sufran procesos de deterioro oxidativo, los que pueden alterar el color durante el almacenamiento refrigerado.

En este trabajo de Tesis se han determinado los parámetros de color, tanto en la superficie como en el interior del producto. Se estudiaron ambas localizaciones debido a que la superficie es la primera percepción que el consumidor tiene del producto en la apertura del envase y la que puede estar más expuesta a modificaciones, especialmente del color por oxidación, al estar en contacto con la cámara de aire remanente en el envase. Simultáneamente, se realizaron mediciones

de los mismos parámetros en el interior del producto a fin de complementar este estudio.

3.5.1.1. Color Superficial

3.5.1.1.1. Luminosidad

Según Fernández-López y col. (2004) el color de los patés está estrechamente relacionado con las características de color de los materiales crudos utilizados en su manufactura (grasa, hígado y músculo). La luminosidad de los productos cárnicos depende de varios factores tales como la capacidad de retención de agua (WHC), el contenido de grasa y de colágeno, el grado de desmenuzado, etc. La incorporación de aire durante el procesamiento también debe tenerse en cuenta, ya que las burbujas de aire pueden incrementar la luminosidad. Estos autores estudiaron el color de patés de hígado de avestruz y observaron que la grasa de apariencia blanquecina induce un incremento de su luminosidad. La transformación del colágeno del hígado en gelatina durante el tratamiento térmico también incrementa la reflexión de la luz.

En la **Figura 3.6** se muestran los resultados correspondientes a la luminosidad superficial (L^*) de los patés obtenidos con las distintas formulaciones y tratamientos, así como su evolución en función del tiempo de almacenamiento refrigerado. El análisis estadístico de los resultados obtenidos dio como resultado que el parámetro L^* del color superficial se vio afectado por todos los factores estudiados.

El tiempo de almacenamiento provocó un aumento de la luminosidad en los patés desarrollados. Los patés elaborados con aceite de girasol presentaron una mayor luminosidad que los formulados con tocino. Resultados similares fueron hallados por Pennisi Forell y col. (2010) en hamburguesas elaboradas con aceite de girasol alto oleico. Dichos autores atribuyeron los altos valores de luminosidad al alto índice de refracción del aceite de girasol y a la apariencia blanquecina de la fina emulsión lograda con el aceite y las proteínas emulsificantes utilizadas en el procesamiento. Los patés elaborados con 40% de materia grasa presentaron mayores valores de luminosidad, es decir fueron más claros que aquéllos de menor tenor graso y por ende, de mayor contenido de hígado.

La presencia de antioxidantes disminuyó la luminosidad de los patés; por

ejemplo, la adición del extracto de té verde produjo una disminución altamente significativa ($p < 0,0001$) en la luminosidad de los patés, como puede observarse en la **Figura 3.6**. Con respecto a las interacciones triples, solamente fue significativa ($p < 0,05$) la interacción entre el tiempo, tipo y concentración de materia grasa, mientras que la interacción de los cuatro factores no fue significativa.

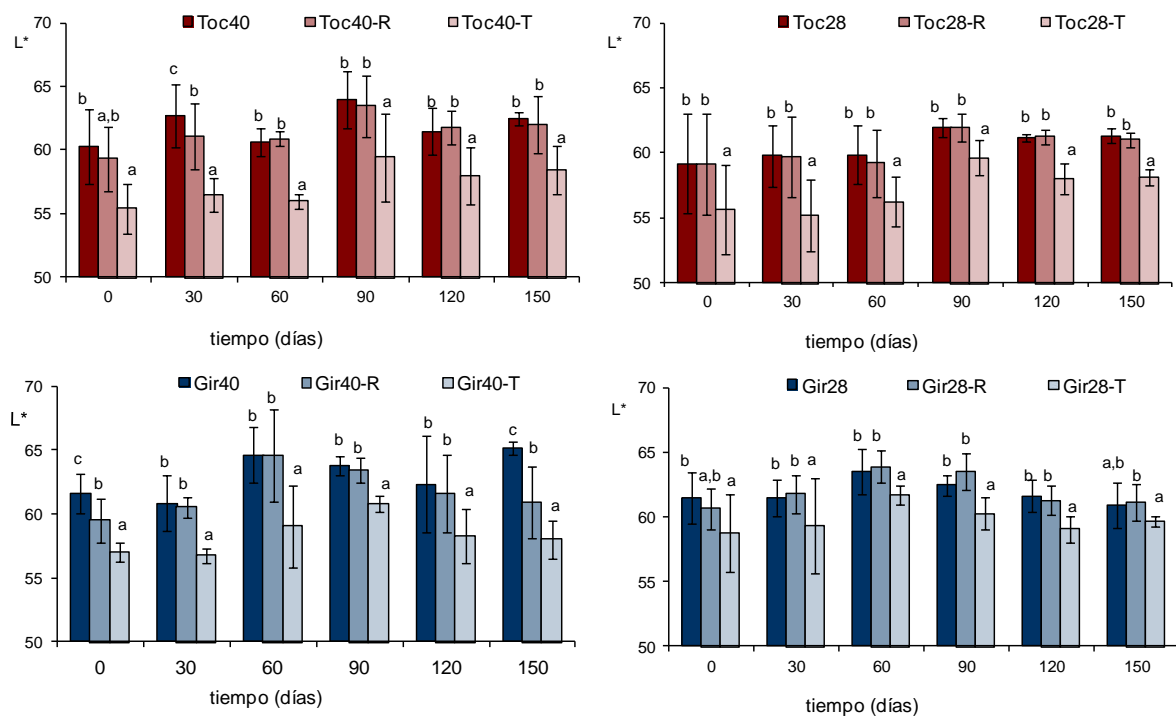


Figura 3.6. Evolución del parámetro L* del color superficial para las distintas formulaciones de paté en función del almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Letras diferentes en cada gráfico para cada tiempo de almacenamiento, indican que los valores promedio difieren significativamente ($p < 0,05$)

Los resultados obtenidos para patés de hígado de pollo en este trabajo de Tesis concuerdan con los hallados por Estévez y Cava. (2004) en patés de hígado de cerdo en cuanto a los valores de luminosidad y su incremento en función del tiempo de almacenamiento refrigerado. Análogamente, los resultados de los cambios de luminosidad vs. la concentración de fase grasa son similares a los informados por Estévez y col. (2005a), en patés de hígado de cerdo con distinto tenor graso y Crehan y col. (2000) en salchichas de bajo tenor graso.

Delgado-Pando y col. (2011) obtuvieron patés de hígado de cerdo de bajo contenido graso, con reemplazo total o parcial de tocino por una mezcla de aceites (oliva, lino y pescado) a los que adicionaron gel Konjac. Estos autores observaron que la reducción del porcentaje de tocino daba lugar a productos más oscuros, es

decir con menor L^* ; sin embargo no observaron diferencias de color entre los productos obtenidos con tocino o aceite.

3.5.1.1.2. Parámetro a^*

La **Tabla 3.9** muestra los valores obtenidos para el componente rojo-verde (parámetro a^*) del color superficial de las distintas formulaciones de paté durante el almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. El componente a^* del color superficial se vio afectado por el tiempo de almacenamiento, el tipo y concentración de materia grasa empleada y por la presencia de antioxidantes. Además, el análisis estadístico indicó que la interacción entre los cuatro factores fue significativa ($p= 0,027$).

En todos los patés estudiados se observó un incremento de a^* durante el almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Este hecho puede deberse a la posible pérdida de humedad de la superficie del producto. Bozkurt (2006) observó en embutidos fermentados y curados un incremento de los valores de a^* con el tiempo de almacenamiento debido a la formación de nitrosomioglobina y nitrosohemoglobina de color rojo. En contraste, D'Arrigo y col. (2004) atribuyeron este aumento a la exposición al aire y a la pérdida del agua superficial de los patés estudiados.

Los patés elaborados con tocino registraron menores valores que los elaborados con aceite de girasol. Los productos obtenidos con menor tenor graso presentaron mayores valores para este parámetro. El aumento de a^* con la disminución del porcentaje de materia grasa puede atribuirse al mayor contenido de hemoproteínas aportadas por el hígado que proporcionan una mayor tonalidad rojiza. Estévez y col. (2005a) estudiaron las propiedades fisicoquímicas de patés de hígado de cerdo con distinto contenido de grasa (45, 40 y 35%), observando también que los patés de menor contenido graso presentaban mayores valores de a^* . Resultados similares fueron obtenidos en un estudio comparativo de distintos tipos de patés hispánicos en el cual la cantidad de grasa se correlacionó negativamente con los valores del parámetro a^* del color y con el croma (Estévez y col., 2005b). El incremento de los valores de a^* por la reducción del porcentaje de tocino en patés y en salchichas también fueron observados por Delgado-Pando y col. (2011) y Crehan y col. (2000), respectivamente.

Tabla 3.9. Evolución del parámetro a* (color superficial) de patés de hígado de pollo elaborados con tocino (Toc) 40 y 28% p/p o aceite de girasol (Gir) 40 y 28% p/p durante el almacenamiento refrigerado a 4 ± 1 °C.

Efecto de la adición de antioxidantes naturales: extracto de romero (-R) y extracto de té verde (-T)

Formulación	Almacenamiento (días)					
	0	30	60	90	120	150
Toc40	2,74 ± 2,27 ^{b,α}	2,39 ± 0,81 ^{a,α}	4,37 ± 0,58 ^{b,β,γ}	3,81 ± 1,19 ^{a,β}	5,97 ± 0,70 ^{b,c,δ}	5,23 ± 3,36 ^{b,γ}
Toc40-R	4,10 ± 1,62 ^{c,α}	4,20 ± 0,77 ^{b,α,β}	3,04 ± 0,53 ^{a,α}	4,58 ± 0,92 ^{a,β}	6,25 ± 1,50 ^{c,γ}	6,13 ± 1,40 ^{b,γ}
Toc40-T	1,93 ± 0,24 ^{a,b,α}	2,22 ± 0,46 ^{a,α}	2,73 ± 1,19 ^{a,α,β}	3,89 ± 1,67 ^{a,β}	3,53 ± 1,65 ^{a,β}	3,50 ± 1,27 ^{a,β}
Toc28	6,70 ± 0,93 ^{d,β}	6,07 ± 1,62 ^{c,d,α}	6,35 ± 0,74 ^{c,α}	7,74 ± 0,92 ^{c,β,γ}	9,16 ± 0,75 ^{d,γ}	8,57 ± 0,65 ^{d,γ}
Toc28-R	6,95 ± 1,17 ^{d,α}	5,85 ± 1,10 ^{c,d,α}	7,48 ± 1,08 ^{d,α,β}	7,62 ± 0,90 ^{c,β}	8,78 ± 0,81 ^{d,γ}	8,84 ± 0,76 ^{d,γ}
Toc28-T	5,29 ± 2,29 ^{d,α,β}	5,00 ± 0,86 ^{c,α}	5,12 ± 1,34 ^{b,α}	7,54 ± 1,17 ^{c,γ}	6,31 ± 1,32 ^{c,β}	8,21 ± 0,77 ^{d,γ}
Gir40	2,18 ± 1,16 ^{a,b,α}	3,98 ± 2,31 ^{b,β}	6,71 ± 1,25 ^{c,γ}	6,59 ± 2,26 ^{b,γ}	6,85 ± 1,69 ^{c,γ}	4,04 ± 3,92 ^{a,b,β}
Gir40-R	3,09 ± 1,76 ^{b,α}	4,13 ± 2,03 ^{b,α}	6,35 ± 1,18 ^{c,β}	6,65 ± 1,53 ^{b,β}	5,72 ± 1,07 ^{b,β}	8,05 ± 1,14 ^{c,γ}
Gir40-T	1,59 ± 0,43 ^{a,α}	2,75 ± 0,84 ^{a,β}	3,80 ± 0,64 ^{a,β,γ}	4,09 ± 1,15 ^{a,γ,δ}	5,05 ± 2,36 ^{b,δ}	4,78 ± 1,03 ^{b,γ,δ}
Gir28	5,22 ± 1,11 ^{d,α}	6,67 ± 1,05 ^{d,β}	7,96 ± 1,31 ^{d,γ}	8,93 ± 0,85 ^{d,γ}	8,53 ± 1,41 ^{d,γ}	8,01 ± 0,40 ^{c,γ}
Gir28-R	3,69 ± 1,99 ^{c,α}	8,13 ± 1,04 ^{e,β}	8,57 ± 1,38 ^{d,β,γ}	8,07 ± 1,14 ^{d,β}	9,27 ± 0,62 ^{d,γ}	9,47 ± 1,10 ^{d,γ}
Gir28-T	4,45 ± 1,22 ^{c,α}	5,72 ± 1,85 ^{c,d,β}	5,45 ± 0,32 ^{b,α,β}	6,10 ± 0,65 ^{b,β}	6,65 ± 0,98 ^{c,β,γ}	7,97 ± 0,26 ^{c,γ}

^{a,b,c,d,e} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

^{α,β,γ,δ} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Hong y col. (2004) estudiaron el efecto del reemplazo parcial de grasa de cerdo por aceite de soja sobre las características de embutidos untables de hígado. Estos investigadores reemplazaron del 5 al 20% de grasa por aceite y observaron que los valores de a^* se incrementaron con mayor % de aceite. Sin embargo, no observaron cambios de color durante el almacenamiento, hecho que fue atribuido a la acción antioxidante del nitrito.

La adición del extracto de romero produjo un incremento significativo ($p < 0,05$) en los valores de a^* . En contraste, el extracto de té verde disminuyó los niveles de este parámetro al igual que los resultados obtenidos por Jo y col. (2003).

El incremento de a^* en función del tiempo de almacenamiento registrado en los patés con extracto de romero también fue observado por Estévez y col. (2006) al estudiar el efecto de aceite esencial de salvia y romero sobre la estabilidad oxidativa de patés de hígado de cerdo.

3.5.1.1.3. Parámetro b^*

El análisis estadístico de los valores obtenidos para el parámetro b^* del color superficial de los patés recién elaborados (**Tabla 3.10**) reveló que los productos que incluyen tocino en su formulación, presentaron menores valores de esta coordenada de color que los preparados con aceite de girasol. Esto puede deberse a la coloración propia del aceite de girasol, la cual pudo haber ejercido influencia sobre este parámetro. Resultados similares fueron observados por Youssef y Barbut (2009) quienes obtuvieron emulsiones cárnicas cocidas en las que se reemplazó grasa vacuna por aceite de canola. Los patés con 40% de materia grasa presentaron mayores valores de b^* superficial. El componente amarillo-azul del color superficial disminuyó levemente ($p < 0,05$) por la adición de extracto de romero en todos los tipos de patés. En contraste, la adición de extracto de té verde produjo una disminución muy significativa ($p < 0,001$) de b^* en todas las formulaciones. Todos los patés desarrollados registraron un incremento de b^* en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico puede sugerirse que los cambios producidos durante el tiempo de almacenamiento dependieron del tipo y concentración de materia grasa y de la adición de los antioxidantes naturales, ya que la interacción de los cuatro factores estudiados fue altamente significativa ($p < 0,001$).

Tabla 3.10. Evolución del parámetro b* (color superficial) de patés de hígado de pollo elaborados con tocino (Toc) 40 y 28% p/p o aceite de girasol (Gir) 40 y 28% p/p durante el almacenamiento refrigerado a 4 ± 1°C. Efecto de la adición de antioxidantes naturales: extracto de romero (-R) y extracto de té verde (-T)

Formulación	Almacenamiento (días)					
	0	30	60	90	120	150
Toc40	15,77 ± 1,81 ^{b,α}	17,14 ± 2,05 ^{d,β}	15,34 ± 0,83 ^{b,α}	16,53 ± 1,18 ^{d,e,α,β}	16,38 ± 0,47 ^{d,α,β}	16,52 ± 1,00 ^{d,α,β}
Toc40-R	14,92 ± 1,97 ^{b,α}	15,53 ± 1,92 ^{b,α}	15,28 ± 0,96 ^{b,α}	15,60 ± 0,77 ^{d,α}	15,00 ± 0,87 ^{d,α}	15,43 ± 0,35 ^{c,d,α}
Toc40-T	11,10 ± 1,47 ^{a,α}	11,55 ± 1,75 ^{a,α,β}	11,66 ± 1,44 ^{a,α,β}	12,32 ± 1,22 ^{a,β}	12,16 ± 0,50 ^{a,β}	12,23 ± 0,30 ^{a,β}
Toc28	15,10 ± 0,64 ^{b,α}	15,69 ± 0,58 ^{b,c,β}	16,17 ± 1,06 ^{b,γ}	16,04 ± 0,79 ^{d,γ}	15,79 ± 0,56 ^{d,α,γ}	15,94 ± 0,62 ^{d,α,γ}
Toc28-R	15,19 ± 0,41 ^{b,α}	15,97 ± 1,06 ^{c,α}	15,68 ± 0,89 ^{b,α}	16,11 ± 1,00 ^{d,α}	16,20 ± 0,49 ^{d,β}	16,25 ± 0,41 ^{d,β}
Toc28-T	11,47 ± 0,94 ^{a,α}	11,01 ± 0,38 ^{a,α}	12,26 ± 0,74 ^{a,α,β}	13,45 ± 0,94 ^{b,γ}	12,72 ± 0,72 ^{a,β,γ}	12,72 ± 0,91 ^{a,γ}
Gir40	17,81 ± 1,93 ^{c,α}	18,61 ± 1,29 ^{e,β}	19,24 ± 1,74 ^{c,β}	18,87 ± 2,12 ^{f,β}	19,22 ± 0,90 ^{f,β}	21,45 ± 3,10 ^{g,γ}
Gir40-R	16,95 ± 1,40 ^{c,α}	19,36 ± 1,89 ^{e,γ}	20,15 ± 1,65 ^{c,γ}	18,29 ± 0,83 ^{f,β}	19,51 ± 0,86 ^{f,γ}	18,44 ± 0,98 ^{f,β,γ}
Gir40-T	12,32 ± 0,91 ^{a,α}	12,84 ± 0,96 ^{b,α,β}	13,09 ± 0,73 ^{a,α,β}	13,30 ± 1,11 ^{a,b,β,γ}	13,79 ± 1,01 ^{b,γ}	14,14 ± 0,28 ^{b,γ}
Gir28	17,48 ± 1,17 ^{c,α}	17,54 ± 0,98 ^{d,α}	17,94 ± 1,02 ^{c,β}	17,27 ± 0,95 ^{e,α}	17,86 ± 0,69 ^{e,α,β}	18,56 ± 0,91 ^{f,β}
Gir28-R	15,97 ± 1,72 ^{b,α}	17,11 ± 0,62 ^{c,d,β}	17,21 ± 0,52 ^{b,c,β,γ}	18,05 ± 1,18 ^{e,γ}	17,34 ± 1,09 ^{e,β,γ}	17,26 ± 0,80 ^{e,β,γ}
Gir28-T	12,93 ± 1,29 ^{a,α}	13,97 ± 1,50 ^{b,β}	14,36 ± 0,59 ^{b,β}	14,42 ± 0,81 ^{c,β}	14,79 ± 0,85 ^{c,β}	14,93 ± 0,21 ^{b,c,β}

^{a,b,c,d,e,t,g} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05)

^{α,β,γ,δ,γ} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05)

Las modificaciones en los parámetros a^* y b^* , durante el almacenamiento refrigerado, observadas por Estévez y col. (2004) en patés de hígado de cerdos blancos e ibéricos, no fueron asociadas a procesos oxidativos ya que los patés de mayor estabilidad oxidativa (obtenidos con cerdos ibéricos) fueron los que experimentaron los mayores cambios de color.

Por otra parte, el incremento de los valores de b^* observados por D'Arrigo y col. (2004) en patés de hígado de cerdo con exposición al aire fueron, atribuidos a procesos oxidativos y pérdida de agua superficial. Fernández-López y col. (2004), indicaron que tanto la oxidación como la oxigenación de la mioglobina producen incrementos del parámetro b^* .

Muguerza y col. (2002) informaron que el reemplazo de grasa por aceite de oliva puede generar productos cárnicos más amarillos ($> b^*$). Resultados similares fueron obtenidos por Choi y col. (2009) en emulsiones cárnicas de cerdo al reducir el tenor porcentual de tocino de 30 a 20%, así como en emulsiones cárnicas en las que se sustituyó el 50% de tocino por aceites de oliva, uva, maíz, canola o soja. En un trabajo posterior Choi y col. (2010) estudiaron el efecto de la reducción del nivel de tocino y la parcial sustitución, de un 25 a un 75%, del tocino por aceite de semillas de uva, encontrando incrementos de L^* y b^* con cantidades crecientes de aceite. Estos resultados estarían en concordancia con los hallados en nuestro estudio.

Con respecto al efecto del extracto de té verde sobre el parámetro b^* del color superficial, Jo y col. (2003) también observaron disminución de dicho parámetro en hamburguesas de cerdo crudas por la adición de extracto de té verde. Sin embargo, las muestras tratadas registraron menores modificaciones de este parámetro durante el almacenamiento que los controles sin antioxidantes.

La disminución de los parámetros a^* y b^* del color por las catequinas de té verde también fueron observados por Mitsumoto y col. (2005) en hamburguesas crudas y cocidas de carne vacuna y de pollo almacenadas en refrigeración bajo luz fluorescente.

3.5.1.1.4. Croma

La cromaticidad o índice de saturación indica la intensidad del color del producto. En todas las formulaciones de paté se observó una elevación significativa ($p < 0,05$) de los valores del croma durante el almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ como

consecuencia del incremento tanto de a^* como de b^* (**Figura 3.7**). La formulación que experimentó los mayores incrementos de este parámetro durante el almacenamiento refrigerado fue Gir40.

Las formulaciones con tocino mostraron menores valores de croma que las que contienen aceite de girasol. Es decir que, el mayor valor de b^* de estas últimas formulaciones ha sido reflejado en el parámetro croma. Cuando se compararon las formulaciones con respecto a sus contenidos de fase grasa, se observó que la reducción del contenido de la misma de 40 a 28%, produjo un aumento significativo ($p < 0,05$) de la cromaticidad.

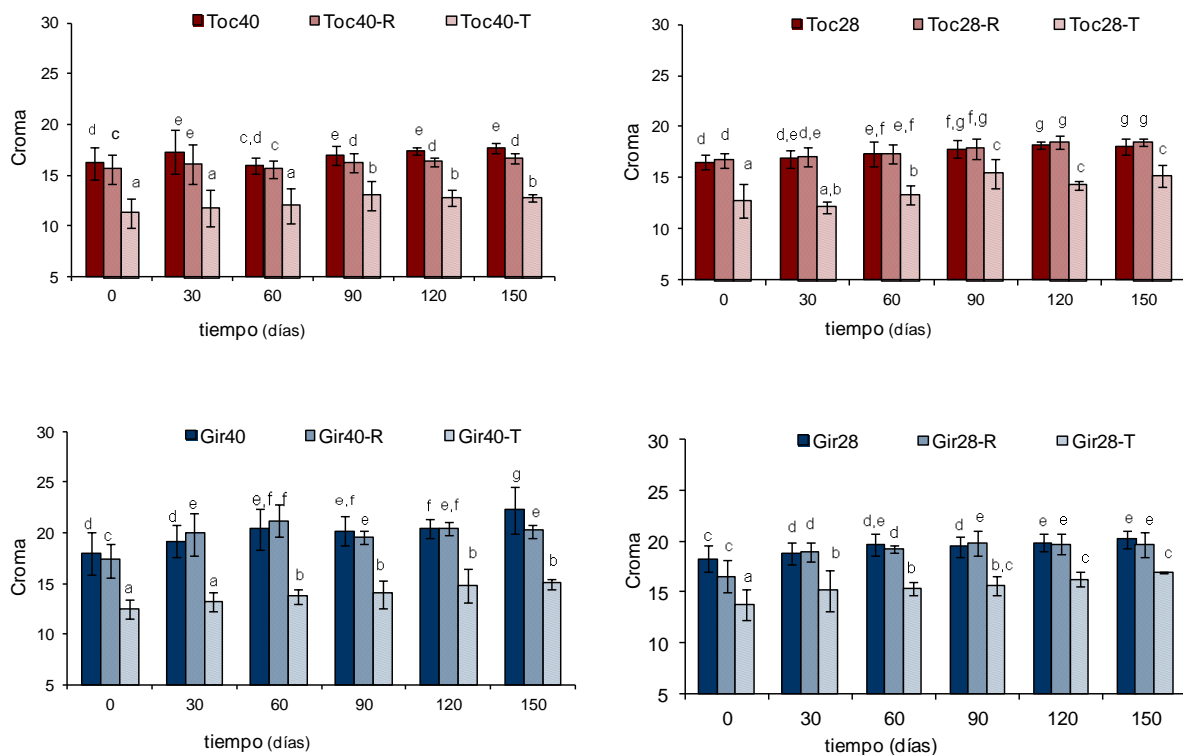


Figura 3.7. Evolución del croma superficial para las distintas formulaciones de paté en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Letras diferentes en cada gráfico indican que los valores promedio difieren significativamente ($p < 0,05$)

Con respecto al efecto de los antioxidantes adicionados a las diferentes formulaciones, se observó que el extracto de romero redujo la cromaticidad significativamente. El extracto de té verde produjo disminuciones altamente significativas ($p < 0,001$) de dicho parámetro en todas las formulaciones. Las interacciones dobles fueron significativas excepto tiempo x concentración de materia

grasa y las interacciones triples fueron significativas menos la interacción entre el tiempo, la concentración de fase grasa y los antioxidantes. La interacción cuádruple no fue significativa.

3.5.1.1.5. Ángulo Hue

En todas las formulaciones se observó una disminución del tinte o Hue durante el tiempo de almacenamiento refrigerado (**Figura 3.8**). Así, si bien tanto a^* como b^* se incrementaron en función del tiempo de almacenamiento refrigerado, el aumento de a^* tuvo una mayor incidencia sobre el valor de Hue. La comparación de las formulaciones con tocino vs. las elaboradas con aceite de girasol para el mismo tenor graso evidenció que éstas últimas registraron mayores valores de Hue que las correspondientes a tocino, como consecuencia del aumento de b^* producido por la coloración amarilla del aceite de girasol.

La reducción de ambos tipos de materia grasa produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) del tinte al cabo de todos los tiempos de almacenamiento estudiados. Este fenómeno puede explicarse en virtud del incremento significativo de a^* en las formulaciones de bajo tenor graso.

El extracto de romero adicionado a los patés disminuyó significativamente ($p < 0,05$) el tinte de los patés. Las formulaciones con girasol y extracto de romero (Gir40-R y Gir28-R) fueron las que registraron las mayores disminuciones del ángulo Hue durante el almacenamiento, lo que estaría indicando menores aumentos de b^* que de la coordenada a^* en estas formulaciones. El extracto de té verde no produjo alteraciones significativas de este parámetro con respecto a las formulaciones sin antioxidante. Si bien este aditivo provocó las mayores variaciones de los parámetros primarios del color, la relación entre ambos parámetros no se modificó significativamente. Todas las interacciones dobles fueron significativas excepto la interacción entre el tipo de materia grasa y los antioxidantes. En cuanto a las interacciones triples, la única que no fue significativa fue la interacción entre el tiempo, el tipo y la concentración de fase grasa. La interacción cuádruple fue altamente significativa ($p = 0,004$), lo que indica la fuerte influencia de la composición en los valores del Hue obtenidos durante el tiempo de almacenamiento.

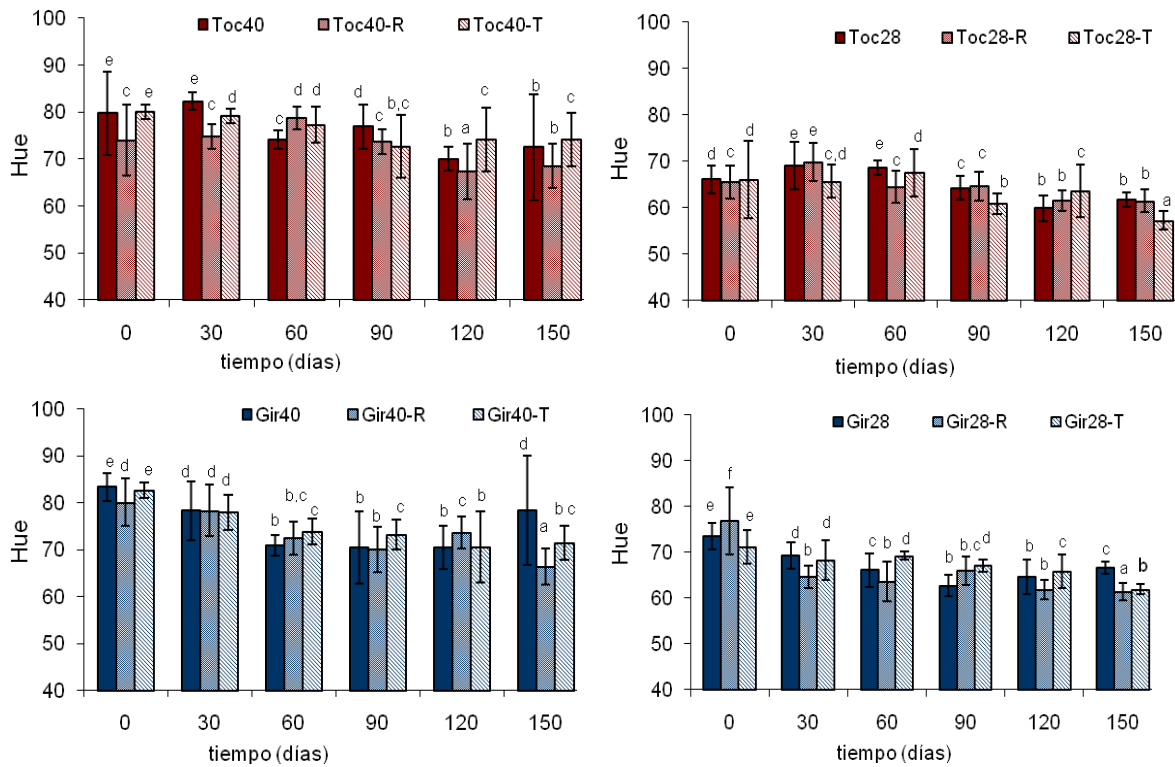


Figura 3.8. Evolución del Hue superficial para las distintas formulaciones de paté en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Letras diferentes en cada gráfico indican que los valores promedio difieren significativamente ($p < 0,05$)

3.5.1.2. Color interno

Además del estudio de los parámetros de color en la superficie de los diferentes patés, se analizaron los mismos en el interior del producto. Esto se llevó a cabo debido a que, en este tipo de productos se suelen presentar diferencias de color entre ambas localizaciones que los consumidores habituales de patés, están acostumbrados a observar. En algunos productos que se comercializan en nuestro país, suele indicarse en el rótulo que la superficie del producto puede presentar una coloración diferente debido al procesamiento empleado.

El color interno de los patés fue significativamente diferente a la coloración determinada en la superficie del producto. El parámetro a^* correspondiente al color interno mostró que todos los patés presentaron una mayor tonalidad rojiza que la observada en la superficie del mismo. A modo de ejemplo, en la **Tabla 3.10**, se indican los valores promedio de a^* , obtenidos al inicio del almacenamiento, para las cuatro formulaciones básicas de paté en ambas localizaciones del producto.

Tabla 3.10. Valores del parámetro a* del color correspondientes a la superficie y al interior de los patés de hígado de pollo

Formulación	a* superficial	a* interno
Toc40	2,74 ± 2,27 ^a	9,76 ± 1,24 ^b
Toc28	6,70 ± 0,93 ^a	10,35 ± 0,46 ^b
Gir40	2,18 ± 1,16 ^a	8,85 ± 0,43 ^b
Gir28	5,22 ± 1,11 ^a	10,61 ± 0,94 ^b

Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas entre los valores promedio ($p < 0,05$)

Asimismo, el Δ color fue calculado a partir de la siguiente expresión: Δ color= $[(L^*_{int} - L^*_{sup})^2 + (a^*_{int} - a^*_{sup})^2 + (b^*_{int} - b^*_{sup})^2]^{1/2}$. Cabe señalar que cuando la diferencia de color es mayor que 2, la misma se hace perceptible por el ojo humano (Estévez y col., 2006). Como puede observarse en la **Tabla 3.11**, el color superficial y el del interior del producto son visiblemente diferentes en todos los tipos de patés estudiados.

Tabla 3.11. Δ color entre el interior y la superficie de patés de hígado de pollo desarrollados con y sin antioxidantes a tiempo inicial de almacenamiento

Formulación	Δcolor (int-sup)
Toc40	7,21
Toc40-R	5,39
Toc40-T	9,37
Toc28	3,79
Toc28-R	3,56
Toc28-T	5,15
Gir40	8,14
Gir40-R	6,84
Gir40-T	7,53
Gir28	5,90
Gir28-R	6,99
Gir28-T	6,95

3.5.1.2.1. Luminosidad

En la **Figura 3.9** se muestran los valores de L* medidos en el interior de los patés en función del tiempo de almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Según el análisis estadístico realizado, la luminosidad en el interior del producto aumentó significativamente ($p < 0,05$) durante el almacenamiento refrigerado para todas las

formulaciones. Estos cambios fueron menos pronunciados que los observados en la superficie del producto la cual estuvo en contacto con la cámara de aire del envase.

La luminosidad fue significativamente mayor en los patés elaborados con aceite de girasol. La reducción del tenor graso en los patés y la adición de los antioxidantes naturales estudiados no produjeron modificaciones significativas ($p > 0,05$) de la luminosidad en el interior de los mismos.

Las interacciones dobles entre el tiempo de almacenamiento y los antioxidantes así como entre la concentración de materia grasa y los antioxidantes fueron las únicas no significativas ($p > 0,05$) mientras que las interacciones triples tiempo x tipo x concentración de fase grasa, e interacción entre tipo, concentración de materia grasa y antioxidantes fueron significativas ($p < 0,05$). Por otra parte, la interacción entre los cuatro factores analizados no fue significativa.

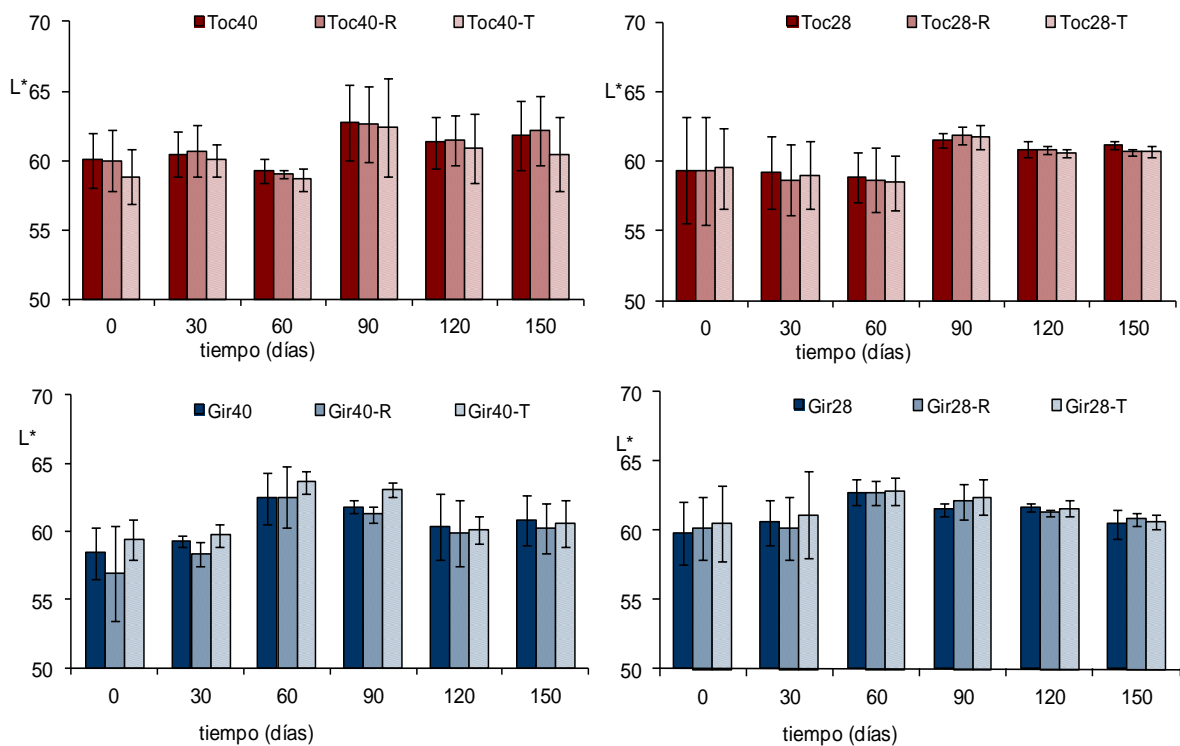


Figura 3.9. Evolución de la Luminosidad interna para las distintas formulaciones de paté en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Las barras indican la desviación estándar

3.5.1.2.2. Parámetro a*

El parámetro a* del color interno de los diferentes patés se representa en la **Figura 3.10**. Puede visualizarse que, al igual que en la superficie del producto, la

coordinada a^* es mayor en las formulaciones de menor contenido graso debido al mayor porcentaje de hígado en las mismas. El análisis estadístico mostró que el factor tiempo de almacenamiento incrementó significativamente el parámetro a^* de color interno de los patés. El paté que experimentó los mayores incrementos de este parámetro fue Gir40 (8,85 vs. 10,78 a $t=0$ y a $t=150$ días, respectivamente). Los patés elaborados con aceite de girasol presentaron una mayor tonalidad rojiza (a^*). Los extractos con capacidad antioxidante ensayados (romero y té verde) no alteraron significativamente este parámetro del color interno. Las interacciones dobles fueron todas significativas, excepto la interacción entre el tiempo de almacenamiento y los antioxidantes. Las interacciones triples fueron todas significativas, excepto la interacción entre el tiempo, concentración de fase grasa y antioxidantes. La interacción entre los cuatro factores analizados no fue significativa ($p>0,05$).

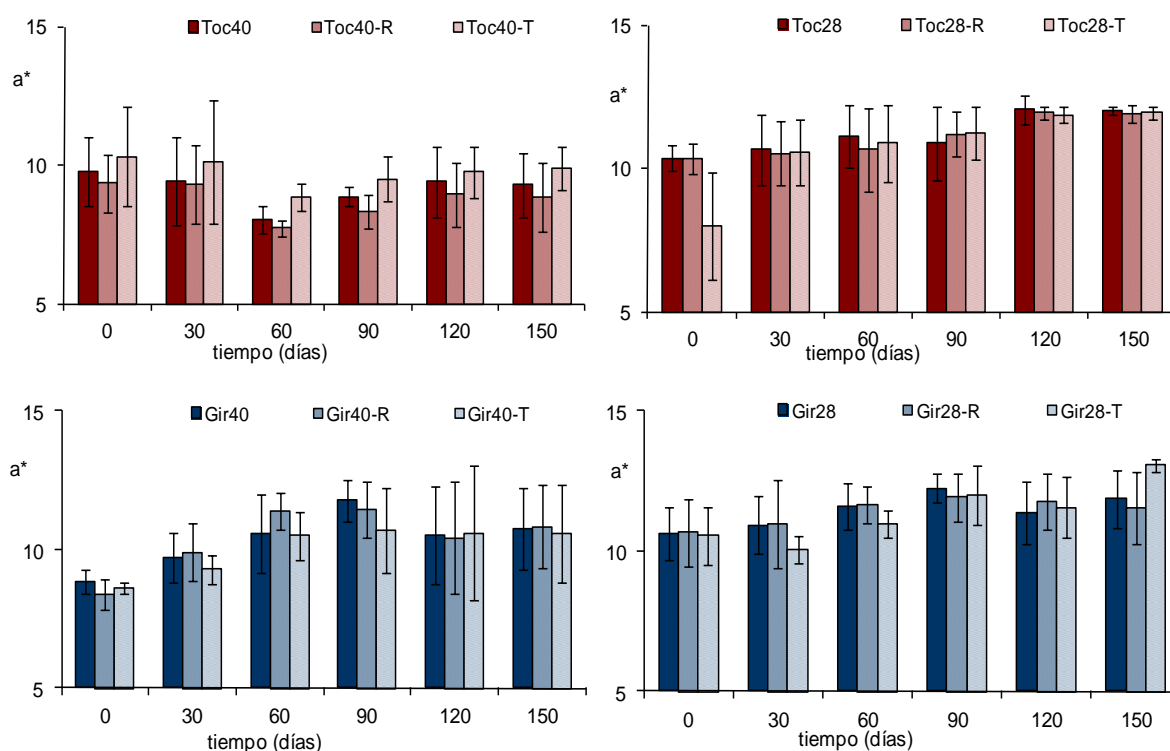


Figura 3.10. Evolución del parámetro a^* del color interno para las distintas formulaciones de paté en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Las barras indican la desviación estándar

3.5.1.2.3. Parámetro b^*

Los valores de b^* obtenidos en el interior de los diferentes patés (**Figura 3.11**) fueron inferiores a los determinados en la superficie de los mismos para todas

las formulaciones estudiadas. El parámetro b^* interior se incrementó durante el almacenamiento refrigerado. El producto que experimentó los mayores incrementos durante el almacenamiento fue Gir40 ($b^*=14,35$ vs. $17,12$ a $t=0$ y $t=150$ días, respectivamente). Los patés con aceite de girasol presentaron una mayor tonalidad amarillenta que los de tocino. La reducción del porcentaje de fase grasa aumentó en forma significativa ($p<0,05$) los valores de b^* interno.

El extracto de romero no alteró significativamente la componente amarillo-azul del color interno. En cambio, el extracto de té verde disminuyó significativamente este parámetro b^* . Si bien, las interacciones dobles y triples fueron significativas, la interacción cuádruple no lo fue ($p= 0,531$).

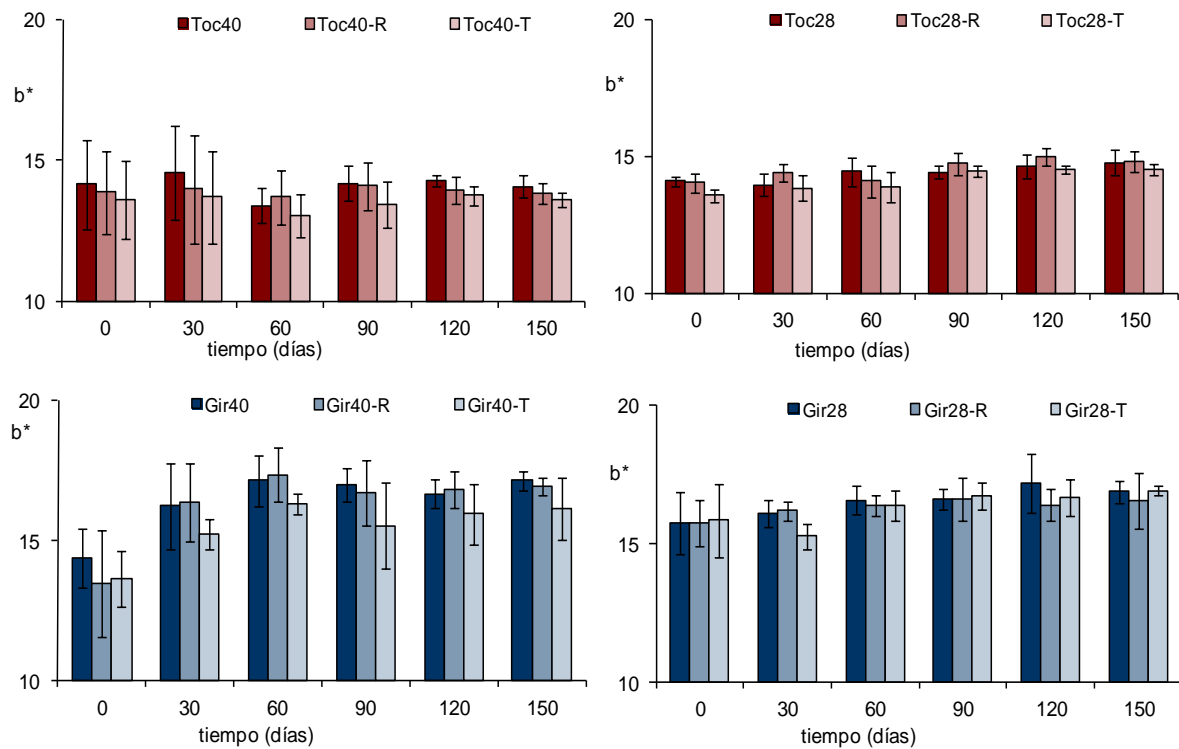


Figura 3.11. Evolución del parámetro b^* del color interno para las distintas formulaciones de paté en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4\pm 1^\circ\text{C}$. Las barras indican la desviación estándar

3.5.1.2.4. Croma

Como consecuencia del incremento de los parámetros a^* y b^* , el índice de saturación interno se incrementó en todas las formulaciones durante el almacenamiento refrigerado (**Figura 3.12**).

Las formulaciones obtenidas con aceite de girasol presentaron una mayor

cromaticidad que las obtenidas con tocino a igual concentración. La disminución del porcentaje de materia grasa y su reemplazo por hígado produjo un incremento del croma. La adición de extracto de romero no provocó cambios significativos de este parámetro en el interior de los patés desarrollados con respecto a los patés sin antioxidantes. En cambio, el extracto de té verde produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) en el croma de los patés ensayados. Si bien, la interacción cuádruple de todos los factores no fue significativa ($p = 0,790$), hubo interacciones dobles (tiempo x tipo de materia grasa; tiempo x concentración de materia grasa y tipo x concentración) y triples (tiempo x tipo x concentración y tipo x concentración x antioxidante) que fueron significativas ($p < 0,05$).

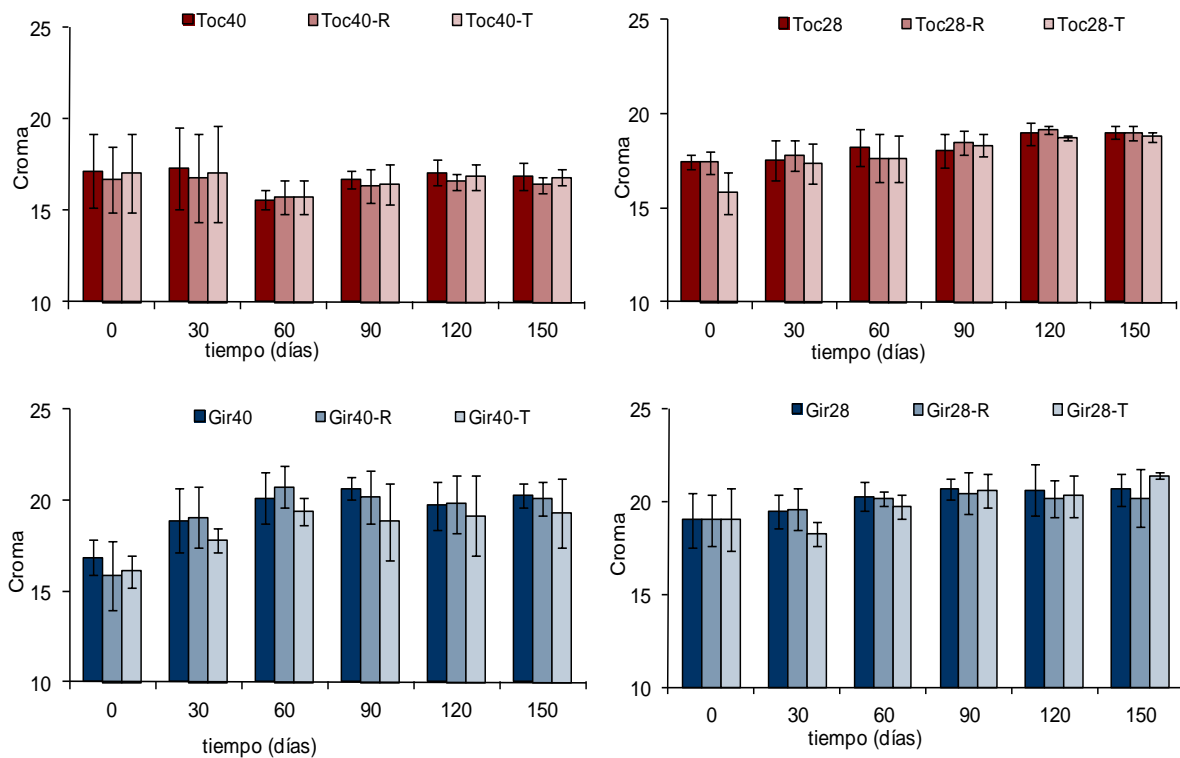


Figura 3.12. Evolución del croma interno para las distintas formulaciones de paté en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a 4 ± 1 °C. Las barras indican la desviación estándar

3.5.1.2.5. Ángulo Hue

Los valores del ángulo Hue calculados a partir de los parámetros a^* y b^* de cada formulación se presentan en la **Tabla 3.12**. Este parámetro se vio afectado por el tiempo de almacenamiento, el tipo y concentración de materia grasa y por los antioxidantes ensayados. El análisis estadístico indicó que la interacción de los

Tabla 3.12. Evolución del ángulo Hue (color interno) correspondiente a patés de hígado de pollo elaborados con tocino (Toc) 40 y 28% p/p o aceite de girasol (Gir) 40 y 28% p/p durante 150 días de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Efecto de la adición de antioxidantes naturales. -R (extracto de romero), -T (extracto de té verde)

Formulación	Almacenamiento (días)					
	0	30	60	90	120	150
Toc40	55,42 \pm 0,96 ^{b,c,α}	57,24 \pm 1,61 ^{b,β,γ}	58,94 \pm 2,11 ^{d, γ}	57,97 \pm 1,80 ^{d,β, γ}	56,74 \pm 3,46 ^{c,α,β}	56,68 \pm 3,30 ^{c,α,β}
Toc40-R	56,04 \pm 0,36 ^{c, α}	56,34 \pm 0,95 ^{b, α}	60,48 \pm 1,37 ^{d, β}	59,37 \pm 1,46 ^{d, β}	57,37 \pm 4,01 ^{c, α}	57,41 \pm 4,28 ^{d, α}
Toc40-T	53,06 \pm 2,13 ^{a, α}	53,93 \pm 2,84 ^{a, α}	55,81 \pm 0,72 ^{b, β}	54,71 \pm 0,98 ^{b,α,β}	54,72 \pm 2,24 ^{b,α,β}	54,04 \pm 2,37 ^{b,α,β}
Toc28	53,70 \pm 0,98 ^{b, β}	52,79 \pm 2,48 ^{a, β}	52,43 \pm 2,27 ^{a, β}	53,11 \pm 2,99 ^{a, β}	50,49 \pm 1,06 ^{a, α}	50,83 \pm 1,10 ^{a, α}
Toc28-R	53,63 \pm 0,84 ^{b, β}	53,89 \pm 2,66 ^{a, β}	53,08 \pm 2,67 ^{a, β}	52,77 \pm 1,86 ^{a,α,β}	51,41 \pm 0,98 ^{a, α}	51,11 \pm 0,98 ^{a, α}
Toc28-T	59,85 \pm 5,59 ^{a, γ}	52,77 \pm 2,18 ^{a, β}	52,08 \pm 2,58 ^{a,α,β}	52,23 \pm 2,33 ^{a,α,β}	50,70 \pm 0,89 ^{a, α}	50,56 \pm 0,41 ^{a, α}
Gir40	58,26 \pm 2,03 ^{d, β}	59,05 \pm 0,63 ^{c, β}	58,41 \pm 2,49 ^{c, β}	55,28 \pm 2,04 ^{c, α}	57,92 \pm 3,66 ^{c, β}	57,91 \pm 3,85 ^{d, β}
Gir40-R	57,85 \pm 2,26 ^{d,β,γ}	58,79 \pm 1,08 ^{c, γ}	56,67 \pm 0,63 ^{c,α,β}	55,58 \pm 1,29 ^{c, α}	58,43 \pm 4,04 ^{c,β,γ}	57,49 \pm 3,56 ^{d,β,γ}
Gir40-T	57,64 \pm 1,65 ^{d, β}	58,56 \pm 0,90 ^{c, β}	57,22 \pm 1,58 ^{c,α,β}	55,54 \pm 1,35 ^{c, α}	56,81 \pm 4,47 ^{c,α,β}	56,94 \pm 2,72 ^{d,α,β}
Gir28	56,03 \pm 0,64 ^{c, β}	55,90 \pm 2,02 ^{b, β}	55,01 \pm 1,78 ^{b,α,β}	53,53 \pm 0,87 ^{a,b,α}	56,47 \pm 1,94 ^{c, β}	54,87 \pm 1,97 ^{b,c,α,β}
Gir28-R	55,86 \pm 1,46 ^{c, α}	55,96 \pm 3,57 ^{b, α}	54,56 \pm 1,80 ^{b, α}	54,33 \pm 1,03 ^{b, α}	54,31 \pm 1,64 ^{b, α}	55,17 \pm 1,52 ^{c, α}
Gir28-T	56,35 \pm 0,52 ^{c, γ}	56,62 \pm 0,63 ^{b, γ}	56,16 \pm 1,11 ^{b,β,γ}	54,44 \pm 1,98 ^{b,α,β}	55,27 \pm 1,95 ^{b, β}	52,27 \pm 0,63 ^{b, α}

^{a,b,c,d} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

^{α , β , γ} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

cuatro factores fue significativa ($p < 0,05$) así como las demás interacciones. La reducción del porcentaje de materia grasa empleada en la elaboración de todos los patés produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) del Hue, mientras que a igual tenor graso, los productos obtenidos con aceite de girasol tuvieron mayores valores. Este parámetro disminuyó durante el almacenamiento refrigerado. Sin embargo, la formulación Gir40 con las mayores variaciones de a^* y b^* durante el almacenamiento, no mostró una tendencia tan marcada de disminución en el tiempo, indicando que las variaciones de las coordenadas primarias del color se compensan en esta relación. La adición de extracto de romero no provocó cambios significativos de este parámetro en el interior de los patés con respecto a los patés sin antioxidantes. En cambio, el extracto de té verde produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) en el ángulo Hue de los patés ensayados.

3.5.2. Análisis del Perfil de Textura (TPA)

La adecuada formación de la estructura y por consiguiente, de la textura de los productos cárnicos tales como el paté, depende principalmente de la habilidad de las proteínas de formar una matriz de consistencia adecuada. Durante la elaboración del paté se obtiene en principio una pasta cruda constituida por proteínas, glóbulos de grasa, agua y sales, la cual adquiere una estructura más rígida durante el proceso de cocción. Es decir que, la estructura existente en el material crudo es reforzada mediante la gelación de las proteínas durante el tratamiento térmico. Este proceso provoca la desnaturalización de las proteínas que participan en interacciones proteína-proteína consolidando así la matriz o red proteica (Barbut y col., 1996).

Según varios autores, se considera a los patés como emulsiones cárnicas, las que consisten en glóbulos de grasa que se hallan dispersos en una matriz semisólida constituida por agua, sales y proteínas solubles e insolubles, así como partículas de fibras musculares y tejido conectivo (fase continua). Es decir que serían emulsiones aceite en agua (O/W), en sentido estricto, según Hernández-Hernández y col. (2009) los patés no son verdaderas emulsiones dado que los glóbulos de grasa tienen un tamaño mayor a $20\mu\text{m}$. Según Barbut y col. (1996), la estabilidad de estas emulsiones puede explicarse a través de dos mecanismos. En uno de ellos se considera que la estabilidad es proporcionada por el film de proteínas interfaciales, las cuales recubren los glóbulos de grasa emulsificados. El

otro mecanismo, explica la estabilidad mediante un fenómeno físico en el cual los glóbulos de grasa quedan atrapados en la matriz proteica.

El análisis del perfil de textura (TPA) evidenció variaciones en los distintos parámetros estudiados en función del tiempo de almacenamiento refrigerado y de las distintas formulaciones ensayadas, las cuales se detallan a continuación.

Dureza

En la **Figura 3.13** se muestran los valores de dureza para las distintas formulaciones de patés en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. El análisis estadístico indicó que la dureza se incrementó significativamente ($p < 0,05$) con el tiempo de almacenamiento. Estos resultados han sido informados por Fernández-López y col. (2004) en patés de hígado de avestruz así como por Estévez y col. (2006) y Martín y col. (2008) en patés de hígado de cerdo.

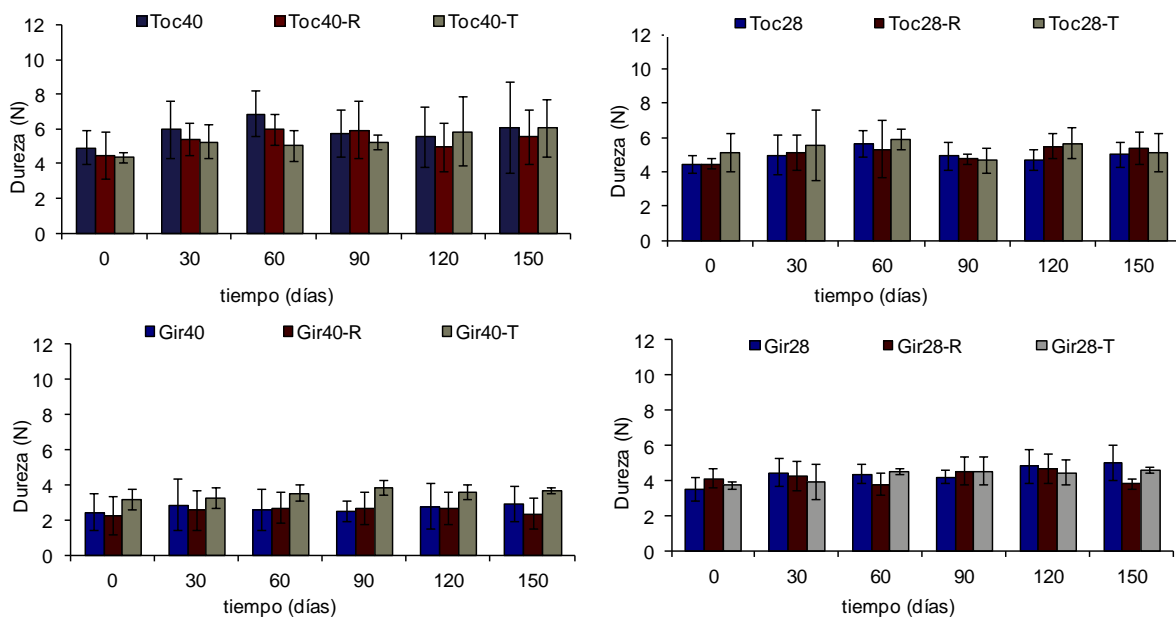


Figura 3.13. Dureza (N) en patés de hígado de pollo elaborados con tocino (Toc) 40 y 28% p/p o aceite de girasol (Gir) 40 y 28% p/p con y sin antioxidantes naturales, durante el almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Las barras indican la desviación estándar

El incremento de la dureza durante el almacenamiento refrigerado puede atribuirse según Fernández-López y col. (2004), a la desestabilización de las emulsiones, la separación del agua y la grasa de la matriz proteica así como la polimerización de lípidos y/o proteínas. En el caso de Toc28, la dureza fue máxima a los 60 días de almacenamiento, manteniéndose luego sin cambios significativos.

La formulación Gir28 mostró incrementos significativos de la dureza a partir de los 120 días de almacenamiento.

Los patés elaborados con aceite de girasol presentaron valores significativamente menores ($p < 0,05$) de este parámetro que los elaborados con tocino. El efecto del tipo de fase grasa en la dureza de los patés observados en este trabajo de Tesis es coincidente con los resultados de Martín y col. (2008) en patés con reemplazo parcial de grasa de cerdo por aceite de oliva enriquecido en CLA y Park y col. (1990) quienes estudiaron la sustitución total de tocino por aceite de girasol alto oleico, a igual concentración en salchichas. La disminución de grasas saturadas y el incremento de las grasas insaturadas, de menor punto de fusión podría ser uno de los factores responsables de la menor consistencia de los patés con aceite de girasol. Además, en los patés formulados con tocino, muchos adipocitos del mismo podrían conservar su estructura intacta en el paté terminado. La permanencia de la grasa en el interior de estas células originaría productos de mayor consistencia. La reducción del tenor porcentual de fase grasa dio lugar a productos de mayor dureza. Estévez y col. (2005 a) observaron el mismo resultado en patés de hígado de cerdo. Por consiguiente, la presencia de altas concentraciones de grasa originó patés más blandos.

La adición de los antioxidantes empleados en este estudio no afectó significativamente ($p > 0,05$) la dureza de los patés.

Elasticidad

Según Meullenet y col. (1997) este parámetro se define como la capacidad de la muestra para recuperar su forma/tamaño original luego de quitar la fuerza de deformación entre la lengua y el paladar. La elasticidad de los patés desarrollados disminuyó significativamente ($p < 0,05$) durante el periodo de almacenamiento refrigerado (**Figura 3.14**). Esto podría deberse también al fenómeno de desestabilización de las emulsiones con el tiempo de almacenamiento que podría disminuir la capacidad de recuperación de la estructura de los patés al ser aplicada la fuerza de deformación utilizada en este ensayo.

El tipo de fase grasa utilizado también afectó este parámetro de textura siendo mayor para los productos elaborados con aceite de girasol. Según Park y col. (1990) este efecto puede deberse a que la mejor distribución en la emulsión de

los aceites vegetales origina productos de mayor elasticidad debido a una mejor asociación entre proteínas y lípidos.

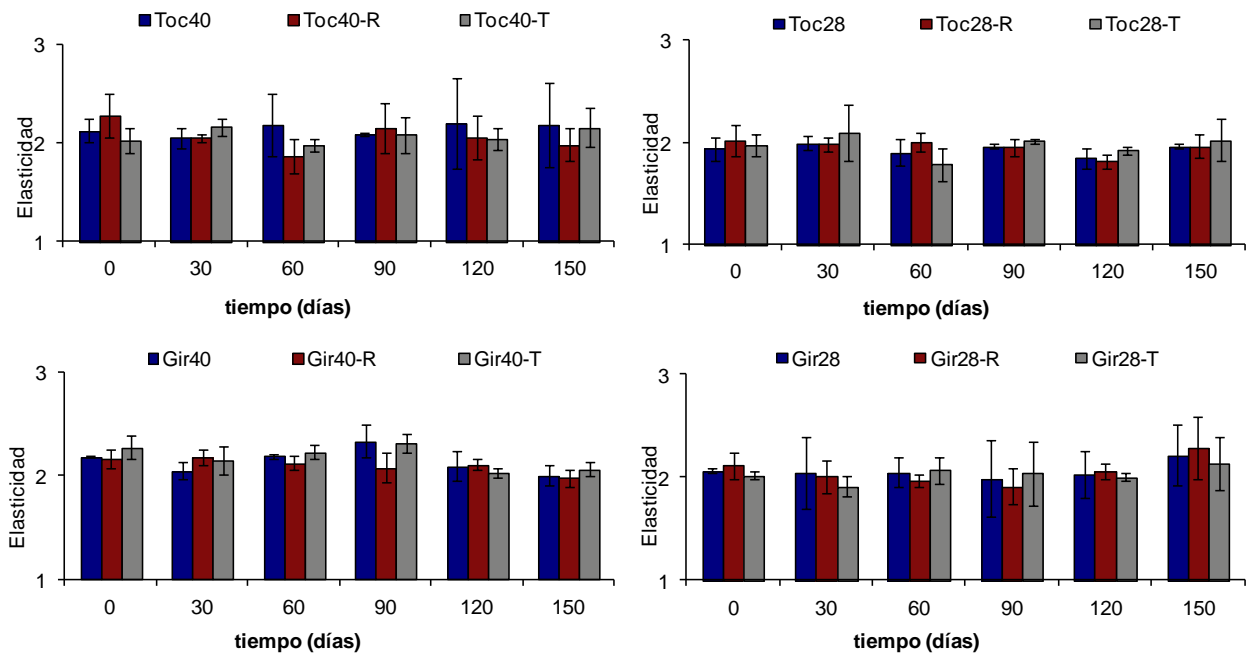


Figura 3.14. Elasticidad en patés de hígado de pollo elaborados con tocino (Toc) 40 y 28% p/p o aceite de girasol (Gir) 40 y 28% p/p con y sin antioxidantes naturales, durante el almacenamiento refrigerado a 4 ± 1 °C. Las barras indican la desviación estándar

La reducción del porcentaje de fase grasa se tradujo en una disminución significativa ($p < 0,05$) de la elasticidad de los patés. La presencia de antioxidantes en las formulaciones no modificó significativamente ($p > 0,05$) la elasticidad. La interacción entre los factores tiempo x concentración de fase grasa y tiempo x tipo x concentración de fase grasa fueron significativas ($p = 0,033$ y $p = 0,034$ respectivamente).

Cohesividad

La cohesividad es la deformación que muestra el alimento masticado completamente por los molares, antes de la ruptura (Meullenet y col., 1997). Los resultados se muestran en la **Figura 3.15**. La cohesividad no presentó cambios significativos en función del tiempo de almacenamiento refrigerado.

Sin embargo, si hubo modificaciones significativas ($p < 0,05$) con respecto al tipo y concentración de la materia grasa. La cohesividad fue mayor para los patés elaborados con aceite de girasol. Además, la reducción del tenor graso también produjo un incremento significativo ($p < 0,05$) de la misma. Estos resultados también

fueron observados por Park y col. (1990) y Choi y col. (2010). Estos últimos investigadores evaluaron emulsiones cárnicas bajas en grasa, donde el tocino fue sustituido parcialmente por crecientes cantidades de aceite.

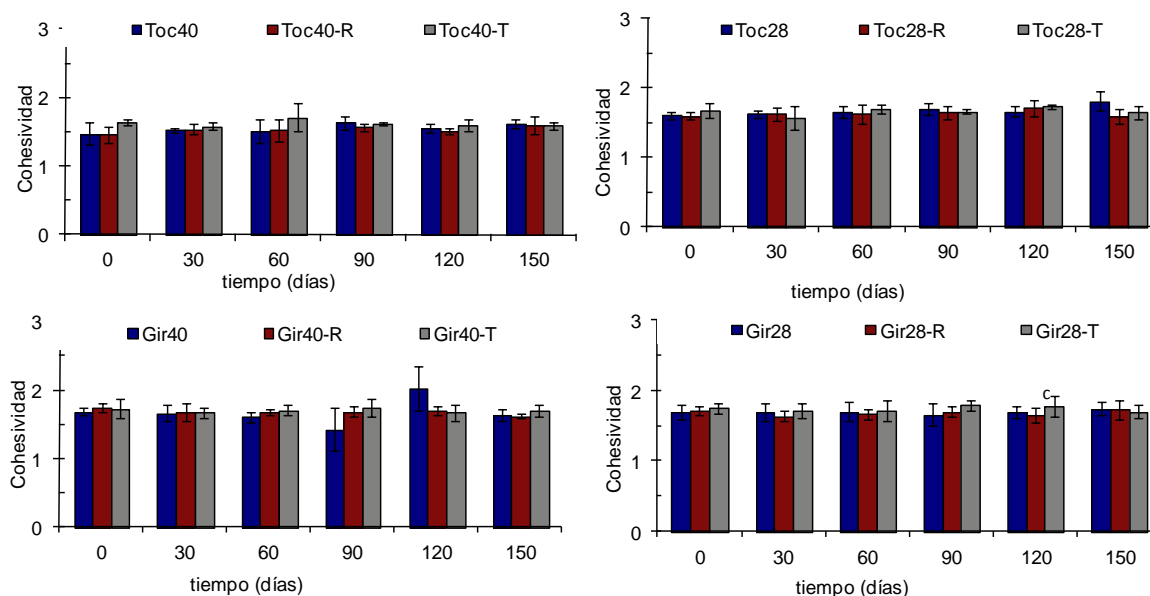


Figura 3.15. Cohesividad en patés de hígado de pollo elaborados con tocino (Toc) 40 y 28% p/p o aceite de girasol (Gir) 40 y 28% p/p con y sin antioxidantes naturales, durante el almacenamiento refrigerado a 4 ± 1 °C. Las barras indican la desviación estándar

La adición de los antioxidantes naturales en las concentraciones estudiadas no afectó significativamente los valores de este parámetro.

Gomosidad

Los resultados de gomosidad obtenidos se muestran en la **Figura 3.16**. Este parámetro de textura se define como la fuerza necesaria para desintegrar un alimento semisólido antes de su deglución. La gomosidad de las formulaciones de paté de hígado de pollo desarrolladas en este trabajo de Tesis se incrementó significativamente ($p < 0,05$) en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a 4 ± 1 °C. Los patés elaborados con aceite de girasol presentaron menores valores de gomosidad que los elaborados con tocino. Los productos de menor tenor graso tuvieron valores significativamente mayores de este parámetro ($p < 0,05$). La interacción tipo x concentración de materia grasa fue significativa. La presencia de antioxidantes en las formulaciones no modificó significativamente ($p > 0,05$) la gomosidad.

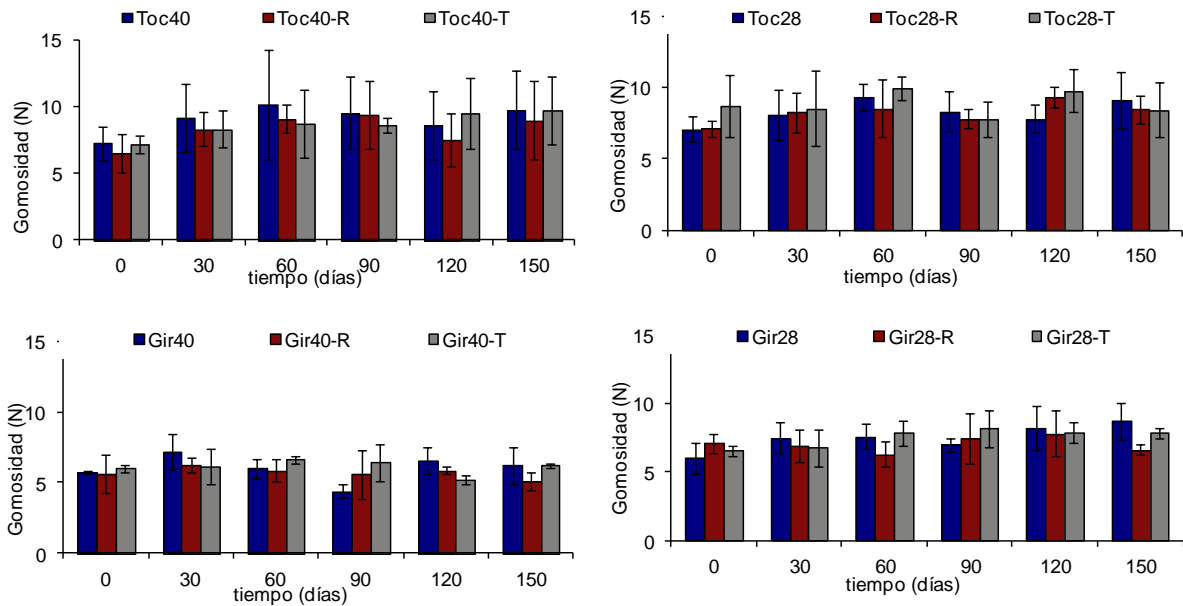


Figura 3.16. Gomosidad en patés de hígado de pollo elaborados con tocino (Toc) 40 y 28% p/p o aceite de girasol (Gir) 40 y 28% p/p con y sin antioxidantes naturales, durante el almacenamiento refrigerado a 4 ± 1 °C. Las barras indican la desviación estándar

Masticabilidad

La **Figura 3.17** muestra los valores correspondientes a la masticabilidad de las distintas formulaciones de paté ensayadas.

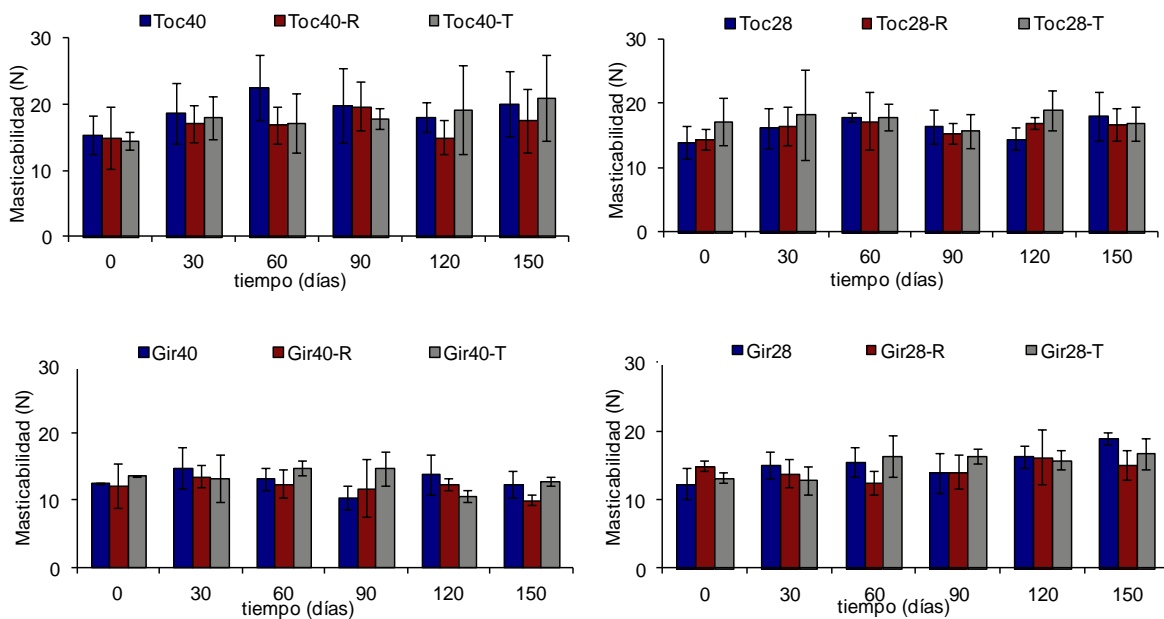


Figura 3.17. Masticabilidad en patés de hígado de pollo elaborados con tocino (Toc) 40 y 28% p/p o aceite de girasol (Gir) 40 y 28% p/p con y sin antioxidantes naturales, durante el almacenamiento refrigerado a 4 ± 1 °C. Las barras indican la desviación estándar

Este parámetro experimentó variaciones significativas por los mismos factores y en el mismo sentido que las observadas para la dureza y gomosidad, con las cuales está relacionada. Así, se observaron incrementos significativos con el tiempo de almacenamiento habiendo sido menor para los patés elaborados con aceite de girasol. La reducción del porcentaje de fase grasa produjo aumentos significativos ($p < 0,05$) de la masticabilidad.

3.5.3. Microestructura

El análisis de la microestructura de los patés de hígado de pollo realizado en el presente trabajo de Tesis, se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para todas las formulaciones con y sin antioxidantes, en función del tiempo de almacenamiento refrigerado.

En la **Figura 3.18**, se observan micrografías de todos los patés estudiados al inicio del almacenamiento, las cuales permiten apreciar adecuadamente su microestructura. Análogamente a lo informado por Cáceres y col., (2008), la microestructura de los patés revela estar constituida por una red o matriz de proteínas en la cual se hayan insertos los glóbulos de grasa.

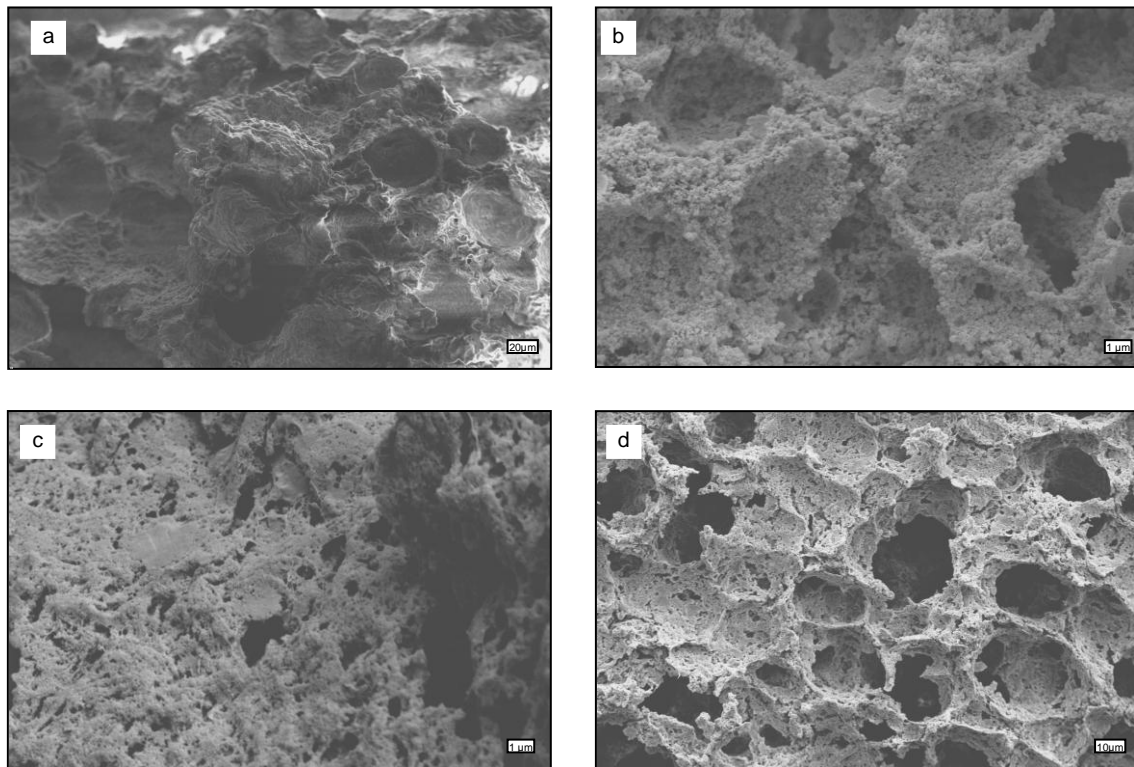


Figura 3.18. Micrografías SEM de patés de hígado de pollo, a: Toc40 (600X); b: Toc28 (10000X); c: Gir40 (10000X); d: Gir28 (1500X)

En el caso de los patés estudiados, la red proteica está constituida por las proteínas provenientes del hígado y músculo de pollo y por el caseinato de sodio (2% p/p), empleado como emulsificante. Esta red proteica estaría conformada tanto por proteínas fibrosas (colágeno, elastina, reticulina, actina y miosina) como por proteínas globulares (proteínas citoplasmáticas del tejido hepático, sarcoplásmicas, mioglobina y hemoglobina). Según Tornberg (2005), las proteínas fibrosas se desnaturalizan por calor, adquieren configuraciones al azar y se asocian a las proteínas globulares formando la red. La formación de agregados de proteínas globulares da lugar a geles opacos, como es el caso de los patés.

Se observaron estructuras con la presencia de poros, los cuales corresponden en su mayoría a los espacios donde se localizaba la grasa. Es posible observar un film blanquecino que delimita los espacios donde estaba la grasa, el cual puede identificarse como el correspondiente a las proteínas que actúan como emulsificantes formando un film proteico interfacial que coagula luego del tratamiento térmico.

En la **Figura 3.19** se muestran las micrografías correspondientes a las formulaciones con 40 y 28% p/p de tocino a tiempo inicial y final del almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. En los patés con 28% p/p de tocino se observaron glóbulos de grasa con superficies lisas atrapados en una densa matriz proteica (**Figura 3.19 c**) con un gran número de poros pequeños distribuidos homogéneamente en la red del gel. Estos poros pequeños podrían corresponder al agua o aire (incorporado durante la etapa de homogeneización de los componentes del paté) en el proceso de elaboración de las formulaciones. En cambio, en los patés con 40% p/p de tocino, estas estructuras no se observan en forma tan nítida, probablemente por la gran cantidad de materia grasa de la formulación, la cual si bien desaparece durante la preparación de las muestras contribuye a la conformación de la estructura de los patés (**Figura 3.19 a y b**).

Según Totosaus y Pérez-Chabela (2009), en emulsiones cárnicas con diferente contenido de fase grasa, la disminución del porcentaje de grasa provoca un incremento en el número de poros debido al mayor contenido de humedad. Esto puede explicar la diferencia en la microestructura de los patés con diferente tenor de materia grasa (**Figura 3.19**). Asimismo, se observaron diferencias en función del tiempo de almacenamiento; dicho factor se tradujo en microestructuras con mayor nivel de agregación a tiempos largos del almacenamiento.

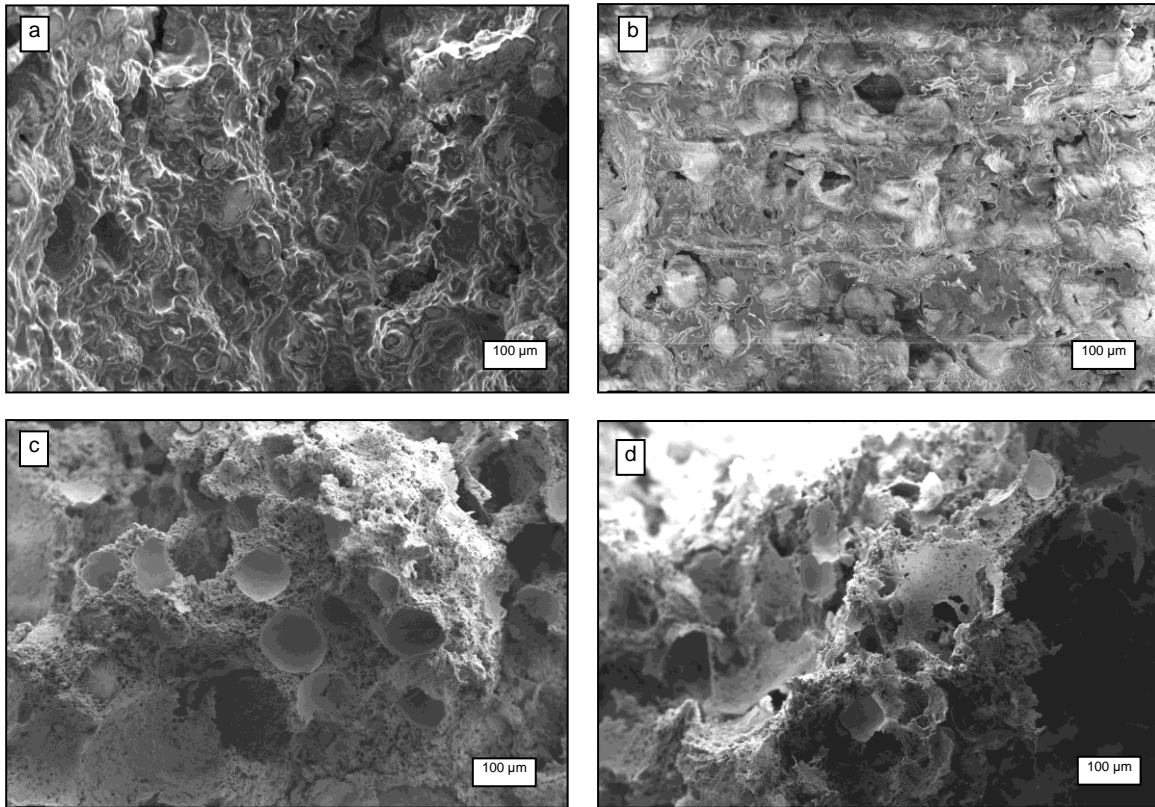


Figura 3.19. Micrografías obtenidas por microscopía de barrido electrónico (SEM) de patés de hígado de pollo, (a) Toc40 a t=0 d; (b):Toc40 a t=150d; (c): Toc28 a t=0 d y (d): Toc28 a t=150 d de almacenamiento refrigerado. (345X)

Tal como fue descrito en la sección 3.3.2., las proteínas de los patés presentaron daño oxidativo, el cual se incrementó significativamente durante el almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Estos procesos oxidativos podrían modificar según Lund y col. (2007) los residuos de aminoácidos, alterar la estructura de las proteínas y promover las interacciones proteína-proteína causando matrices con mayor grado de agregación conforme aumenta el tiempo de almacenamiento respecto de las redes más abiertas de los patés recién elaborados.

En la **Figura 3.20** se observan las micrografías correspondientes a las formulaciones con 40 y 28% p/p de aceite de girasol a tiempo inicial y final del almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Los patés Gir28 presentaron una microestructura regular con glóbulos de grasa y poros de pequeño tamaño al inicio del almacenamiento, tal como puede observarse en la **Figura 3.20 c**. En cambio, los patés Gir40 revelaron a tiempo inicial una microestructura menos regular y más laxa que la de los patés Gir28 lo cual coincide con las diferencias significativas en la dureza de estos patés hallados en el

análisis del perfil de textura realizado. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que la formulación Gir28 tiene un mayor porcentaje de proteínas (ver sección 3.1) lo que lleva a la formación de una estructura de mayor consistencia y menor elasticidad.

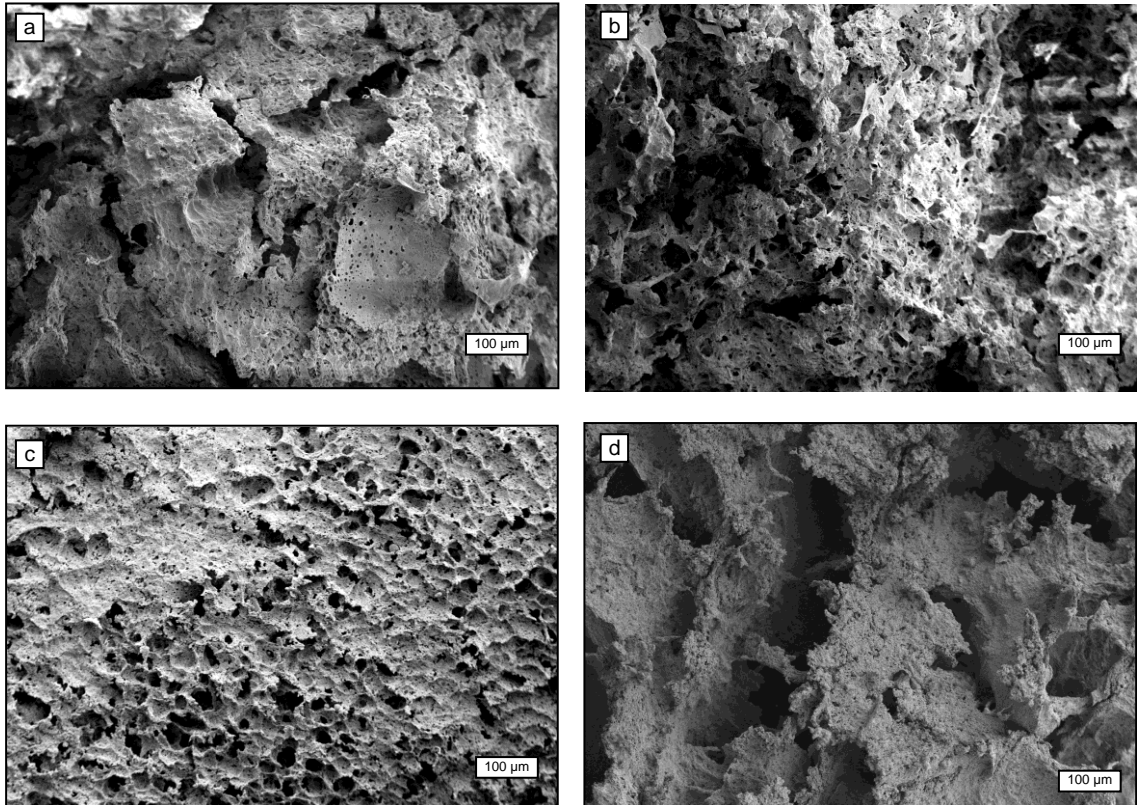


Figura 3.20. Micrografías obtenidas por microscopía de barrido electrónico (SEM) de patés de hígado de pollo, (a):Gir40 t=0d; (b):Gir40 t=150d; (c): Gir28 t=0d (d): Gir28 t=150d de almacenamiento refrigerado. (345 X)

Análogamente a lo observado los patés elaborados con tocino, se visualizaron diferencias en función del tiempo de almacenamiento, con microestructuras de un mayor nivel de agregación a tiempos prolongados del almacenamiento.

El patrón de distribución, forma y tamaño de los glóbulos de grasa varía según el tipo y concentración de materia grasa empleada. A igual aumento, puede observarse que el tamaño de los glóbulos de grasa es mayor en los patés elaborados con tocino. Asimismo, los patés formulados con tocino mostraron una trama más compacta que los patés con aceite de girasol para igual tenor graso a tiempo inicial de almacenamiento (**Figuras 3.19 y 3.20**).

La observación de las micrografías correspondientes a los patés elaborados con la adición de los antioxidantes naturales empleados en este trabajo de Tesis

(extracto de romero y extracto de té verde) revelaron microestructuras similares a las de los patés sin antioxidantes (datos no mostrados).

3.5.4. Análisis sensorial

A fin de estudiar si los evaluadores pueden detectar diferencias entre las formulaciones Toc40, Toc28, Gir40 y Gir28 se realizó la prueba del triángulo. Los ensayos realizados evidenciaron que dichos evaluadores encontraron diferencias entre las formulaciones con respecto al tipo y a la concentración de fase grasa con un nivel de significación del 5 %.

En la **Tabla 3.13** se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis de aceptabilidad sensorial. En la misma, se indica además, el porcentaje de panelistas que evaluaron cada atributo con puntajes mayores o iguales a 6. Todos los patés, excepto Gir40, fueron evaluados entre 6 y 9 puntos por más del 50% de los panelistas. Si bien las diferencias no fueron significativas, las formulaciones de menor tenor graso (Toc28 y Gir28) obtuvieron los mayores puntajes en textura, sabor y aceptabilidad general. El color fue el atributo que presentó una diferencia significativa de aceptabilidad registrando los patés de bajo contenido graso las mayores puntuaciones. En este sentido, el paté Gir28 fue el de mayor aceptabilidad de color seguido de Toc28.

Tabla 3.13. Valores medios de atributos sensoriales de patés de hígado de pollo en escala hedónica de 9 puntos. Entre paréntesis se indica el porcentaje de panelistas que evaluaron cada atributo entre 6 y 9 puntos

Atributo	Formulación			
	Toc40	Toc28	Gir40	Gir28
Aceptabilidad general	5,90 (57)	6,22 (74)	5,75 (63)	6,32 (73)
Color	6,32 ^b (71)	6,55 ^b (81)	5,59 ^a (45)	6,87 ^c (81)
Textura	5,67 (61)	5,95 (76)	5,49 (53)	6,36 (72,5)
Untabilidad	5,91 (67)	6,10 (71)	5,95 (72)	5,89 (61)
Sabor	5,92 (60)	6,23 (70)	5,65 (53)	6,18 (67,5)

^{a,b,c} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05)

En la **Tabla 3.14** pueden observarse las puntuaciones obtenidas en el ensayo de aceptabilidad realizado para la formulación más saludable (Gir28) con y sin la adición de los antioxidantes naturales empleados (extractos de romero y de té verde).

Tabla 3.14. Efecto de extracto de romero y de té verde sobre los valores medios de los atributos sensoriales de paté Gir 28 en escala hedónica de 9 puntos. Entre paréntesis se indica el porcentaje de panelistas que evaluaron cada atributo entre 6 y 9 puntos

Atributo	Formulación		
	Gir28	Gir28-R	Gir28-T
Aceptabilidad general	6,59 (82)	6,97 (87)	6,92 (87)
Color	7,28 (90)	7,38 (87,5)	7,35 (87,5)
Textura	6,53 (80)	6,88 (80)	6,95 (87,5)
Untabilidad	6,15 (72)	6,63 (77,5)	6,70 (72,5)
Sabor	6,48 (75)	6,90 (77,5)	7,10 (82,5)

En el ensayo se utilizaron 40 panelistas (45% varones y 55% mujeres). El análisis estadístico de estos resultados no reveló diferencias significativas entre los patés sin y con la adición de antioxidantes para ninguno de los atributos evaluados. Esto estaría indicando que los antioxidantes naturales en las dosis empleadas, no modificaron la aceptabilidad que poseen los patés desarrollados.

3.5.5 Perfil de aroma

El estudio realizado sobre las distintas formulaciones de patés a diferentes tiempos de almacenamiento fue llevado a cabo mediante el empleo de sensores de óxido metálico de la Nariz Electrónica. Cabe señalar que estos sensores son semiselectivos frente a los distintos grupos de compuestos volátiles (aldehídos, cetonas, alcoholes, etc.) presentes en el alimento y el “software” del equipo permite seleccionar aquellos sensores que mejor explican la diferenciación de los perfiles de aroma. Los sensores seleccionados fueron los más sensibles para la detección de los compuestos volátiles generados durante la oxidación lipídica y para los habitualmente presentes en alimentos frescos.

a) Efecto del tipo y concentración de materia grasa sobre el perfil de aroma

A fin de estudiar las posibles modificaciones del perfil de aroma de las diferentes formulaciones en relación al tipo (tocino o aceite de girasol) y concentración (40 ó 28%) de materia grasa empleada en la manufactura de los patés de hígado de pollo, se realizó el estudio de los perfiles de aroma de las mismas (sin antioxidantes): Toc40, Toc28, Gir40 y Gir28 a tiempo inicial del almacenamiento refrigerado a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Por medio del Análisis de Componentes Principales (PCA) se seleccionaron dos componentes C1 y C2 los cuales representaron el 74,00 y 17,92% de la varianza, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.21**, donde puede apreciarse que todas las formulaciones presentaron un perfil de aroma diferente, es decir que tanto el tipo como la concentración de materia grasa modificaron las características del aroma del producto. Cabe señalar que el componente C1 podría explicar el porcentaje de la materia grasa.

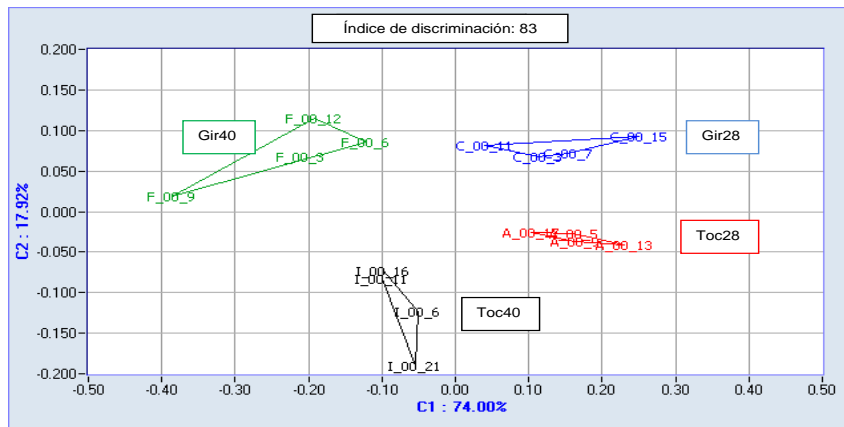


Figura 3.21. Análisis de componentes principales del perfil de aroma de patés de hígado de pollo (Toc40, Toc28, Gir40, Gir28) al inicio del almacenamiento refrigerado analizado por Nariz Electrónica

b) Efecto de los compuestos volátiles inherentes a los antioxidantes sobre el perfil de aroma

Con respecto al efecto generado por los compuestos presentes en los extractos de antioxidantes naturales utilizados sobre el perfil de aroma de los patés de hígado obtenidos, se llevó a cabo el análisis de los patés sin antioxidantes así como de aquéllos a los que se le adicionaron los antioxidantes naturales (extractos de romero o de té verde) a tiempo inicial.

En la **Figura 3.22 a** se muestra el gráfico correspondiente al PCA para la formulación Toc40 sin y con la adición de los antioxidantes estudiados.

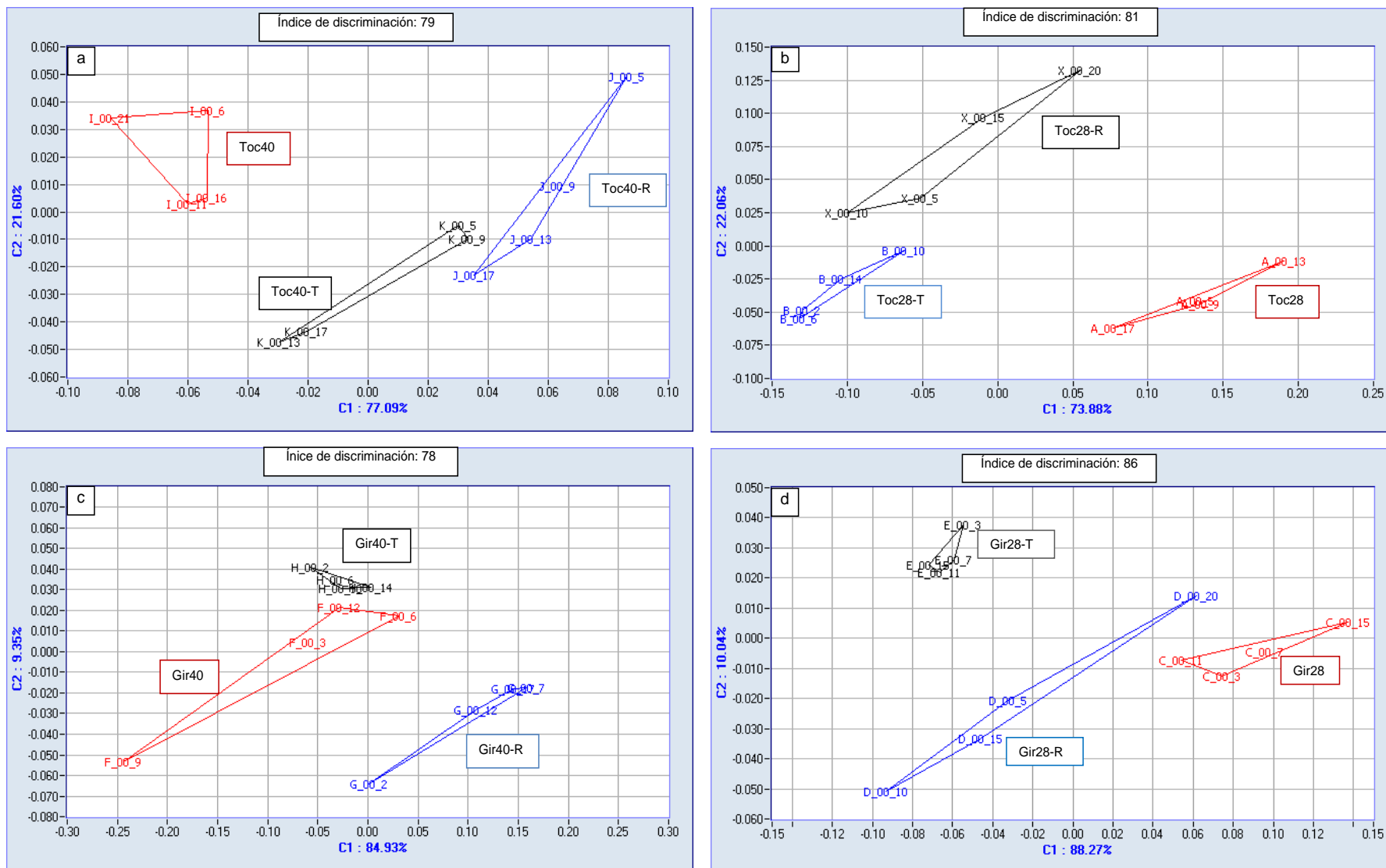


Figura 3.22. PCA del perfil de aroma analizado por NE de patés de hígado de pollo (a)Toc40, (b)Toc 28, (c) Gir40 y (d) Gir28 al inicio del almacenamiento refrigerado a 4±1°C. Efecto de antioxidantes: -R extracto de romero, -T extracto de té verde

Así, pudieron seleccionarse dos componentes, los cuales explicaron el 77,09 y el 21,60% de la variabilidad, observándose una clara diferenciación entre los perfiles de aroma provenientes de aquellas muestras adicionadas con antioxidantes (Toc40-R y Toc40-T) y la muestra sin antioxidantes (Toc40). El componente C1 diferencia los patés sin antioxidantes de aquéllos que los contienen. Del mismo modo, se procedió con los patés obtenidos por reducción del porcentaje de tocino (Toc28), cuyos resultados se muestran en la **Figura 3.22 b**. Los componentes C1 y C2 seleccionados explicaron el 73,88 y 22,06% de la varianza. También en este caso se observó una clara diferencia entre Toc28 y los tratamientos con antioxidantes (Toc28-R y Toc28-T) explicada por el componente C1, mientras que C2 permitió diferenciar los perfiles de aroma de acuerdo al tipo de antioxidante empleado.

En los patés elaborados con aceite de girasol, la diferenciación fue de menor magnitud, tanto para los patés con 40% p/p de aceite como para aquéllos en los que el contenido de la fase grasa se redujo a 28% p/p. En el caso de la formulación con 40% p/p de aceite de girasol (**Figura 3.22 c**), el PCA permitió seleccionar dos componentes que representaron el 84,93 y el 9,35% de la variabilidad (C1 y C2 respectivamente). En la formulación sin antioxidantes (Gir40) se observó un acercamiento al perfil de aroma correspondiente a Gir40-T. Por otra parte, en las formulaciones Gir28 con y sin antioxidantes (**Figura 3.22 d**) se seleccionaron los siguientes componentes principales: C1 que representó el 88,27% de la variabilidad y C2 con 10,04%. La formulación Gir28-R es la que más se acerca a la formulación Gir28. El componente C1 diferencia razonablemente Gir28 de Gir28-T.

Dichos resultados evidencian que los extractos utilizados proveen compuestos volátiles que contribuyen a la formación de un perfil de aroma característico de cada producto. Estévez y col. (2004) han informado que los extractos de salvia y romero producen efectos diferentes sobre la generación de compuestos volátiles derivados de lípidos en patés de hígado de cerdo de diferentes razas, caracterizados por presentar diferente composición de ácidos grasos. Estos autores también han identificado un gran número de terpenos volátiles en los patés adicionados con aceites esenciales de salvia y romero, los que pueden contribuir al aroma característico de los patés.

c) Efecto del tiempo de almacenamiento sobre los perfiles de aroma

En la **Figura 3.23** se muestran los gráficos correspondientes al PCA de las formulaciones de paté elaboradas con 40% p/p de tocino en función del tiempo de almacenamiento refrigerado. Las muestras Toc40 exhibieron perfiles de aroma que variaron considerablemente en función del tiempo de almacenamiento refrigerado.

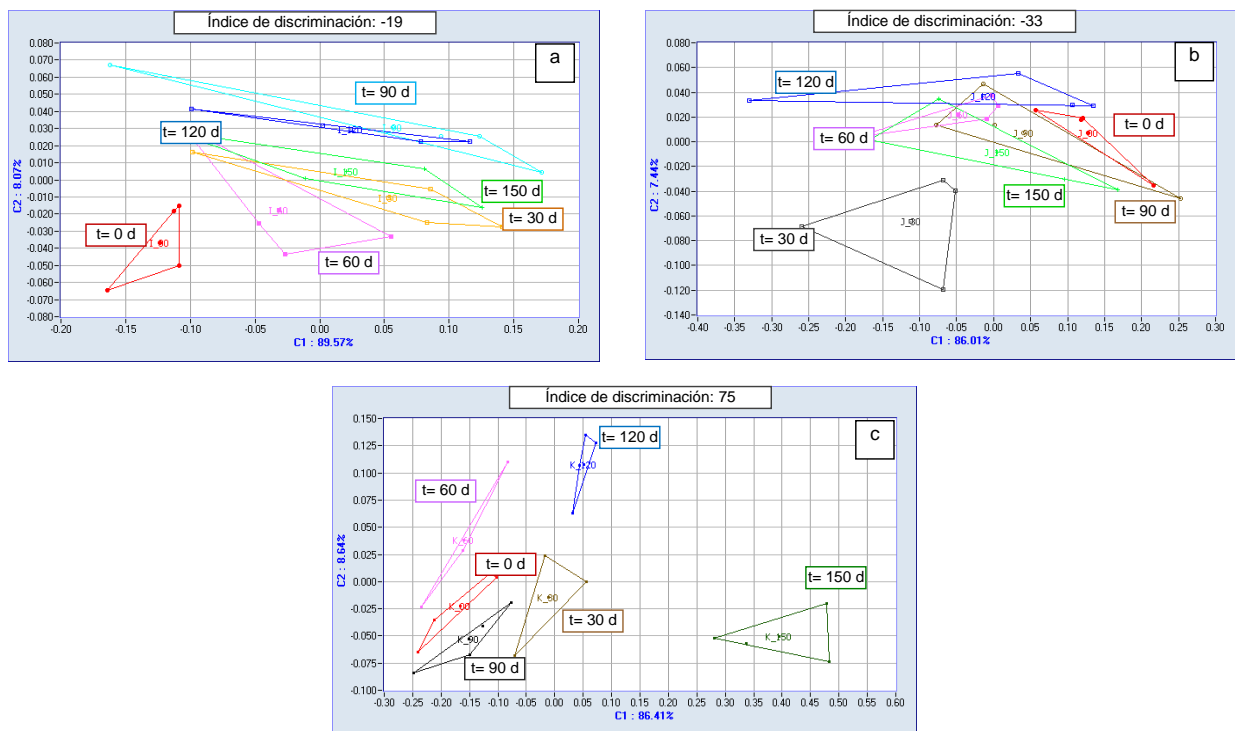


Figura 3.23. Análisis de principales componentes del perfil de aroma de patés Toc40 (a), Toc40-R (b) y Toc40-T (c) durante el almacenamiento refrigerado (t=0, 30, 60, 90, 120 y 150 días). -R extracto de romero, -T extracto de té verde

El estudio de estos grupos mediante PCA (**Figura 3.23 a**) permitió la selección de dos componentes que explicaron el 89,57 y el 8,07% de la variabilidad, observando diferencias entre las muestras según hubieran sido sometidas o no al almacenamiento, es decir considerando dos grandes grupos de perfiles de aroma: aquéllos que corresponden a muestras a t= 0 y los correspondientes a t= 30, 60, 90, 120 y 150 d. A partir de los 30 días de almacenamiento y hasta el final del ensayo se obtuvieron muestras que presentaron perfiles de aroma de características similares.

En muestras pertenecientes a Toc40-R (**Figura 3.23 b**) pudo apreciarse que, si bien existe diferencia entre ciertos perfiles de aroma evaluados, aquellas muestras correspondientes al inicio del ensayo, prácticamente no presentaron

diferencias de las almacenadas al cabo de distintos tiempos. En este caso, se seleccionaron dos componentes, los que explicaron el 93,45% de la variabilidad. Con respecto a este tratamiento, las muestras almacenadas durante 30 días exhibieron perfiles que se diferenciaron con una mayor magnitud del resto, posiblemente debido a algún efecto ajeno a la oxidación lipídica, lo cual requiere la realización de estudios adicionales para dilucidar su posible causa.

Las muestras de paté con adición de extracto de té verde (Toc40-T) presentaron un comportamiento similar a los adicionados con extracto de romero. En este caso (**Figura 3.23 c**) se seleccionaron dos componentes que explicaron el 86,41 (C1) y el 8,64% (C2) de la variabilidad. El perfil de aroma si bien no presenta solapamientos en el caso de los patés a $t=0$, se encuentran en una misma región que el resto de las muestras almacenadas durante los distintos periodos ensayados, sugiriendo el posible efecto antioxidante. Las muestras correspondientes al inicio del ensayo se diferencian levemente de aquéllas almacenadas durante 30, 60 y 90 días. Las muestras correspondientes a 120 días de almacenamiento si bien se diferencian de las muestras de tiempo inicial, 30, 60 y 90 días, se encuentran en la misma región del gráfico indicando nuevamente el posible efecto antioxidante del extracto de té verde. En cambio, las muestras almacenadas durante 150 días mostraron una clara diferencia en su perfil de aroma. Estos resultados podrían ser esperables ya que a este periodo de almacenamiento son más notorias las reacciones químicas entre los componentes del producto que pueden llevar entre otras, a la oxidación lipídica. Además, permitirían estimar un mayor efecto antioxidante del extracto de romero con respecto al de té verde en las formulaciones con 40% p/p de tocino, posibilitando una vida útil sensorial potencialmente superior.

Un comportamiento similar al observado en los patés Toc40, Toc40-R y Toc40-T se obtuvo con los patés obtenidos con 28% p/p de tocino con y sin antioxidantes (datos no mostrados).

Los mapas de aroma bidimensionales en función del tiempo de almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ de la **Figura 3.24** corresponden a los patés obtenidos por la sustitución del tocino por aceite de girasol 40% p/p, y aquéllos adicionados con los antioxidantes naturales estudiados. En los patés Gir40, se seleccionaron dos componentes principales que representaron el 85,63% (C1) y el 8,48% (C2) de la variabilidad, presentándose un solapamiento entre dos grupos de muestras: las correspondientes a 0, 30, 60 y 120 días y las almacenadas durante 90 y 150 días.

Estos resultados sugieren que no hay un efecto definido del almacenamiento sobre el mapa de aroma, lo cual indicaría una estabilidad del perfil de aroma durante el almacenamiento refrigerado.

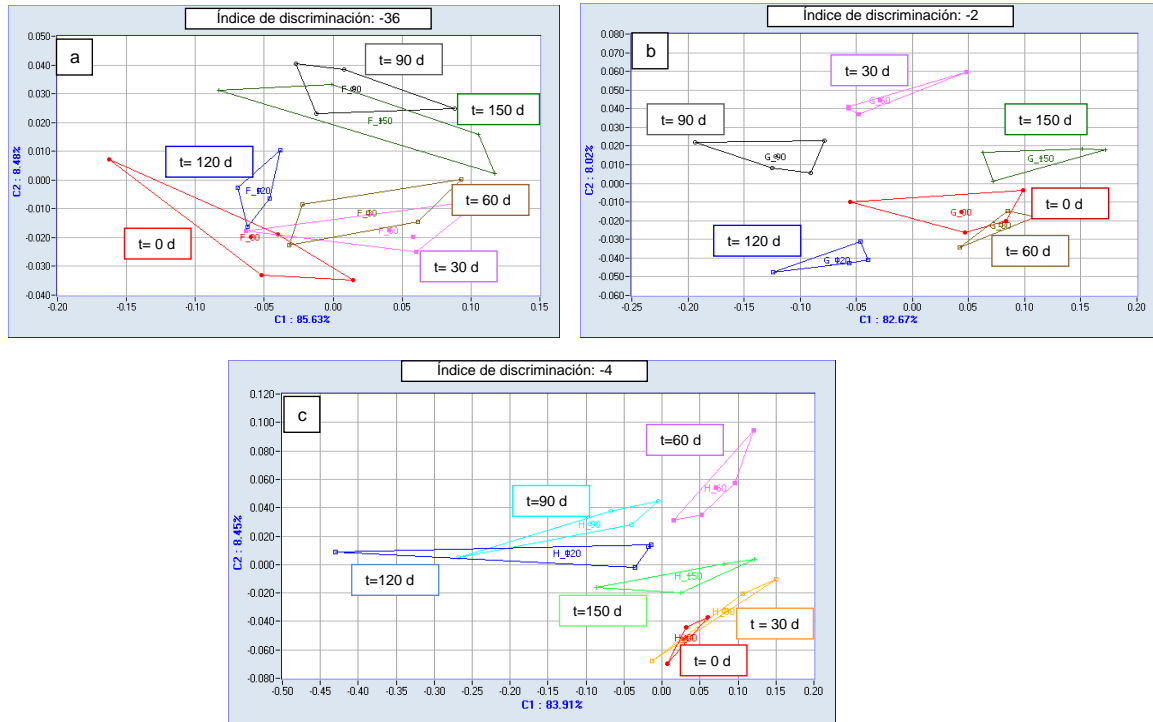


Figura 3.24. Análisis de principales componentes del perfil de aroma de patés Gir40 (a), Gir40-R (b) y Gir40-T (c) durante el almacenamiento refrigerado (t=0, 30, 60, 90, 120 y 150d). -R extracto de romero, -T extracto de té verde

En el caso de Gir40-R se seleccionaron dos componentes principales C1 y C2, los que representaron el 82,67 y el 8,02% de la variabilidad, respectivamente. Para Gir40-T los componentes seleccionados explicaron el 83,91 % (C1) y el 8,45 % (C2) de la variabilidad. En los patés Gir40-R y Gir40-T se observó un fenómeno de solapamiento entre las muestras de algunos tiempos de almacenamiento, aunque en la formulación Gir40-R las muestras almacenadas 30, 90 y 120 días se diferenciaron del resto. Al igual que para los patés Gir40, este comportamiento es deseable desde el punto de vista de la estabilidad del aroma durante el almacenamiento refrigerado. Esto podría explicarse según Estévez y col. (2005 a) debido a que un gran contenido de materia grasa hace que los compuestos volátiles responsables del aroma puedan quedar más retenidos en la matriz del alimento.

Los perfiles de aroma obtenidos en función del tiempo de almacenamiento refrigerado para los patés Gir28, Gir28-R y Gir28-T se muestran en la **Figura 3.25**.

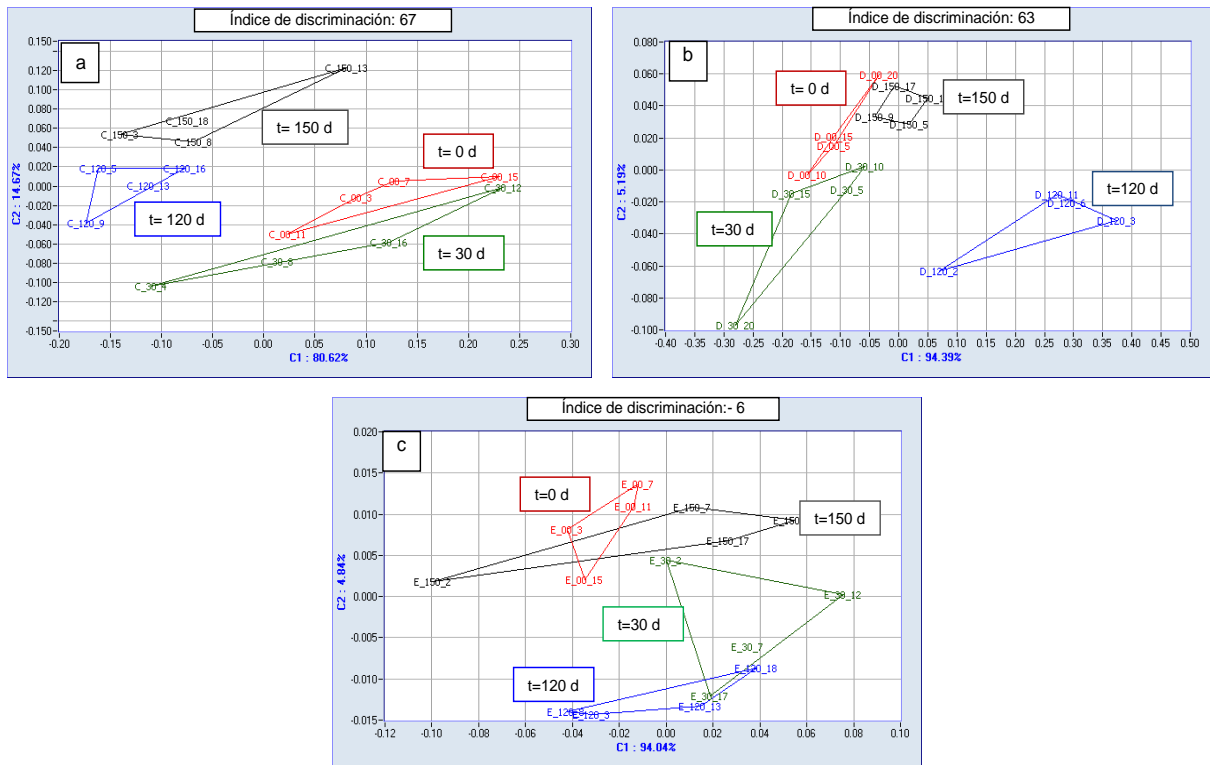


Figura 3.25. Análisis de principales componentes del perfil de aroma de patés Gir28 (a), Gir28-R (b) y Gir28-T (c) durante el almacenamiento refrigerado (t=0, 30, 60, 90, 120 y 150 días). -R extracto de romero, -T extracto de té verde

En el análisis de los componentes principales para Gir28, los componentes seleccionados representaron en total el 95,29% de la variabilidad, mientras que para los patés con antioxidantes explicaron el 99,58 y el 98,88% de la variabilidad en Gir28-R y Gir28-T, respectivamente. En los patés sin antioxidantes se observa una marcada diferenciación en las muestras a t=0 y 30d respecto de aquellas almacenadas durante tiempos prolongados (t=120 y 150d). Es decir, el almacenamiento influyó en el perfil de aroma de los patés Gir28. Con la adición de extracto de romero, las muestras correspondientes a tiempos 0, 30 y 150 días, si bien se diferenciaron, se encuentran en una misma región del gráfico, evidenciando el posible efecto antioxidante del extracto de romero. En Gir28-T se observó una similitud entre los perfiles de aroma pertenecientes a tiempos extremos de almacenamiento en dos grupos: t=0 d está solapado con t=150 d y t=30 d está solapado con t=120 d.

Los resultados obtenidos a través de este tipo de ensayos han permitido complementar la información previamente comentada acerca del deterioro oxidativo de los patés de hígado de pollo.

Conclusiones

El presente trabajo de Tesis permitió desarrollar una serie de productos elaborados en base a hígado de pollo, subproducto de la industria avícola de alto valor nutricional.

Este estudio permitió la caracterización integral de las diversas formulaciones de patés desarrolladas. Asimismo, permitió la evaluación de la influencia de la reducción y la sustitución de la fase grasa tradicional (tocino) por aceite refinado de girasol, en cuanto a los atributos de calidad del producto durante el almacenamiento refrigerado. Además, proporcionó una interesante información acerca del deterioro oxidativo y las condiciones de conservación más adecuadas del producto, contemplando nuevas alternativas tales como la adición de antioxidantes naturales. Los resultados obtenidos pueden constituir un aporte para su potencial aplicación en la industria alimentaria.

En virtud de ello pueden expresarse las siguientes conclusiones:

Composición química

- La disminución del contenido de fase grasa permitió obtener patés de menor valor calórico y mayor contenido de proteínas, con un perfil de ácidos grasos más saludable mediante la sustitución de grasa de cerdo (tocino) por aceite refinado de girasol.
- La composición lipídica de los patés reflejó diferencias en los porcentajes de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados según el tipo de fase grasa, mostrando los patés con aceite de girasol una mayor relación PUFAs/SFAs y por ende, un mejor perfil nutricional debido al aporte del ácido graso esencial linoleico. Cabe señalar que dichos perfiles no presentaron modificaciones a lo largo del tiempo de almacenamiento refrigerado.

Evaluación del deterioro oxidativo

- En el estudio del deterioro oxidativo de los patés se observaron diferentes comportamientos según las formulaciones estudiadas. Así, Toc28 y Gir28 registraron un incremento de la oxidación lipídica durante el almacenamiento refrigerado evidenciado a través del aumento del N° de

TBA y de compuestos carbonílicos proteicos. En contraste, Toc40 y Gir40 se mantuvieron estables. El tipo de fase grasa no tuvo un efecto significativo sobre estos parámetros. Este hecho podría deberse a la presencia de tocoferoles provenientes de las materias primas y de aditivos involucrados en la manufactura de los patés.

- La adición de antioxidantes naturales -extractos de romero y de té verde- en los niveles empleados, fue efectiva para disminuir la oxidación lipídica, especialmente en las formulaciones Toc28 y Gir28, las cuales exhibieron un incremento significativo de este tipo de deterioro durante el almacenamiento refrigerado. El extracto de té verde tuvo asociado un mayor efecto protector.
- Las distintas formulaciones de patés estudiadas en función del almacenamiento refrigerado se encontraron en un rango aceptable de rancidez oxidativa, según lo descrito en literatura.
- El deterioro oxidativo de las hemoproteínas provocó la degradación del grupo hemo y la disminución del contenido de hierro hemínico durante el almacenamiento refrigerado. La adición de antioxidantes naturales permitió evitar la pérdida de hierro hemínico de alta biodisponibilidad para ambos extractos utilizados.
- Los compuestos volátiles derivados de la oxidación lipídica determinados mediante SPME-GC revelaron la presencia de alcoholes, aldehídos y cetonas, los que aportaron tanto aromas agradables como desagradables y en su conjunto constituyen el perfil de aroma característico de los diferentes tipos de patés.

Análisis microbiológico

- El análisis microbiológico reflejó una adecuada calidad higiénico-sanitaria durante el periodo de almacenamiento estudiado en todas las formulaciones de paté desarrolladas.

Análisis organoléptico

- *Color.* Los distintos tipos de patés mostraron diferencias de color entre el interior y la superficie de los mismos. El tipo y la concentración de fase grasa tuvieron influencia modificando los parámetros de color. Las coordenadas primarias (L^* , a^* y b^*) mostraron incrementos significativos en función del tiempo de almacenamiento refrigerado. La adición de los extractos antioxidantes disminuyó los valores de luminosidad, b^* y croma, siendo esta disminución mucho más notoria para el extracto de té verde, especialmente a nivel superficial. En esta localización, el parámetro a^* fue mayor para los patés con extracto de romero.
- *Textura.* Las formulaciones de paté estudiadas exhibieron diferencias en sus perfiles de textura, presentando una menor dureza los productos de alto tenor graso elaborados con aceite de girasol. Los parámetros de textura se vieron afectados por el almacenamiento refrigerado, produciéndose un incremento de la dureza y de otros parámetros relacionados tales como la gomosidad y la masticabilidad. Esto puede deberse al daño oxidativo de las proteínas, ya que mediante procesos de “cross-linking” podría ocasionarse la formación de agregados proteicos.
- *Microestructura.* El estudio de la microestructura de los patés determinada por microscopía de barrido electrónico evidenció variaciones en el patrón de distribución, la forma y el tamaño de los glóbulos de grasa, según el tipo y concentración de materia grasa. Los patés elaborados con tocino presentaron una trama más compacta que los patés con aceite de girasol y glóbulos de grasa de mayor tamaño para igual tenor graso al tiempo inicial. Durante el almacenamiento refrigerado se observaron microestructuras con un mayor nivel de agregación en todos los casos.
- *Análisis sensorial.* Los productos obtenidos presentaron una buena calidad y resultaron aceptables desde el punto de vista sensorial. La prueba del triángulo indicó que los evaluadores pudieron diferenciar entre las formulaciones de distinta composición, si bien las mismas no presentaron diferencias significativas de aceptabilidad global. El análisis sensorial realizado sobre la formulación más saludable (Gir28) con la adición de los

antioxidantes naturales (Gir28-R y Gir28-T) en las concentraciones ensayadas, indicó que su inclusión no modificó la aceptabilidad de los patés.

- *Nariz electrónica.* Los resultados obtenidos mediante la nariz electrónica reflejaron que la composición de la fase grasa de los patés tiene influencia en el perfil de aroma obtenido en cada caso.
- La adición de los extractos de romero y de té verde produjo una variación en el perfil de aroma característico de los patés, debido probablemente a los compuestos volátiles presentes en dichos aditivos. No obstante, estas diferencias no fueron detectadas en el análisis sensorial realizado por los consumidores habituales del producto.
- Los perfiles de aroma correspondientes a las formulaciones Toc28 y Toc40, presentaron modificaciones en función del tiempo de almacenamiento refrigerado. En contraste, la adición de los antioxidantes naturales no evidenció la diferenciación de dichos perfiles. Este comportamiento fue observado en mayor medida en los patés con extracto de romero.
- En los patés con 40% p/p de aceite de girasol con y sin antioxidantes naturales no se observó un efecto definido del almacenamiento sobre el mapa de aroma. En cambio, la formulación Gir28 registró una importante variación del perfil de aroma entre tiempos cortos y prolongados de almacenamiento. La adición de antioxidantes naturales -en este caso- contribuyó a la estabilidad del perfil de aroma durante el periodo estudiado.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Del estudio de los patés desarrollados en este trabajo de Tesis se presentaron los siguientes trabajos:

Trabajos publicados en revistas periódicas

- “Influencia de la fase grasa en los atributos de calidad de emulsiones cárnicas (tipo paté) durante el almacenamiento refrigerado”. Ana M. Terrasa, Marina Dello Staffolo, Mabel C. Tomás (2011). A & G. Aceites y Grasas, 82, Tomo XXI, Vol.1, 628-630. ISSN: 0328-381 X.

Participación en Congresos y Simposios

- “Influencia de la fase grasa en los atributos de calidad de emulsiones cárnicas (tipo paté) durante el almacenamiento refrigerado”. Ana M. Terrasa, Marina Dello Staffolo, Mabel C. Tomás. XIII Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites. Asociación Argentina de Grasas y Aceites (ASAGA). Rosario. Argentina. Noviembre de 2009.
- “Evaluación de la calidad de emulsiones cárnicas (tipo paté) adicionadas con extracto de té verde durante su almacenamiento refrigerado”. Ana M. Terrasa, Marina Dello Staffolo, Mabel C. Tomás. 2º Congreso Internacional en Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Mendoza. Argentina. 20 y 21 de agosto de 2010. Poster.
- “Estudio de los atributos de calidad de patés de hígado de pollo desarrollados con modificaciones de la fase grasa”. Ana M. Terrasa, Marina Dello Staffolo, Mabel C. Tomás. XIII Congreso CYTAL – AATA. Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 4º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. II Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos. Centro de Convenciones UCA, Puerto Madero.

Buenos Aires, Argentina. 19 al 21 de octubre de 2011. Poster y trabajo completo.

- “Adición de antioxidantes naturales en pastas de hígado de pollo y su relación con el aroma”. Langman, Leandro, Terrasa, Ana M., Fernández Valeria, Negri, Livia, Dello Staffolo Marina y Tomás, Mabel. XIII Congreso CYTAL – AATA. Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 4º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. II Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos. Centro de Convenciones UCA, Puerto Madero, Buenos Aires, Argentina. 19 al 21 de octubre de 2011. Poster y trabajo completo.
- “Efecto de la adición de antioxidantes naturales en la calidad de patés de hígado de pollo con modificaciones en la fase grasa” Terrasa, Ana M., Dello Staffolo Marina y Tomás, Mabel, C. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba 2012 (CICYTAC 2012) Pabellón Argentina, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba – Argentina. 14, 15 y 16 de Noviembre de 2012. Poster y trabajo completo.

Bibliografía

- Adamiec J., Rössner J., Velišek J. Cejpek K. and Šavel J. (2001). Minor Strecker degradation products of phenylalanine and phenylglycine. *European Food Research and Technology* 212: 135-140
- Ahn D.U. y Kim S.M. (1998). Prooxidant effects of ferrous iron, hemoglobin, and ferritin in oil emulsion and cooked-meat are different from those in raw-meat homogenates. *Poultry Science* 77: 348-355
- Ahn D.U., Nam K.C., Du M., Jo C. (2001). Effect of irradiation and packaging conditions after cooking on the formation of cholesterol and lipid oxidation products in meats during storage. *Meat Science* 57: 413-418
- Ahn J., Grun I.U., Fernando L.N. (2002). Antioxidant properties of natural plant extracts containing poliphenolic compounds in cooked ground beef. *Journal of Food Science* 67: 1364-1369
- Andrés S.C., Zaritzky N.E., Califano A.N. (2009). Innovations in the development of healthier chicken sausages formulated with different lipid sources. *Poultry Science* 88:1755-1764
- AOAC (1984). *Official Methods of Analysis* (14th ed.) Washington, DC. Association of Official Analytical Chemists
- AOCS (1998). *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. AOCS Press, Champaign, USA
- Aquerreta Y., Astiasarán I., Mohino A., Bello J. (2002). Composition of pâtés elaborated with mackerel flesh (*Scomber scombrus*) and tuna liver (*Thunnus thynnus*): comparison with commercial fish pâtés. *Food Chemistry* 77: 147-153

- Arihara K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science* 74: 219-22
- Ayo J., Carballo J., Serrano J., Olmedilla-Alonso B., Ruiz-Capillas C., Jiménez-Colmenero F. (2007). Effect of total replacement of pork back fat with walnut on the nutritional profile of frankfurters. *Meat Science* 77: 173-181
- Barbut S., Gordon A., Smith A. (1996). Effect of cooking temperature on the microstructure of meat batters prepared with salt and phosphate. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 29: 475-480
- Beltrán E., Pla R., Yuste J., Mor-Mur M. (2003). Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat Science* 64:19-25
- Beltrán E., Pla R., Yuste J., Mor-Mur M. (2004). Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries. *Meat Science* 66: 719-725
- Benincá J.P., Dalmarco J.B., Pizzolatti M.G., Fröde T.S. (2011). Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L in mice. *Food Chemistry* 124: 468-475
- Bloukas J.G. y Paneras E.D. (1993). Substituting olive oil for pork backfat affects quality of low-fat frankfurters. *Journal of Food Science* 58: 705-709
- Bloukas J.G., Paneras E.D., Fournitzis G.C. (1997) Effect of replacing pork back fat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science* 45:133-144

- Bloukas J.G., Arvanitoyannis I.S., Siopi A.A. (1999). Effect of natural colourants and nitrites on colour attributes of frankfurters. *Meat Science* 52: 257-265
- Boles J.A. y Parrish F.C. Jr. (1990). Sensory and chemical characteristics of precooked microwave-reheatable pork roasts. *Journal of Food Science* 55: 618-620
- Bozkurt H. (2006). Utilization of natural antioxidants: green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage. *Meat Science* 73: 442-450
- Brito G., Andrade J.M., Havel J., Díaz C., García F.J., Peña-Méndez E.M. (2006). Classification of some heat-treated liver pastes according to container type, using heavy metals content and manufacturer's data, by principal components analysis and potential curves. *Meat Science* 74 296-302
- CAA. Código Alimentario Argentino Capítulo VI Alimentos Cárneos y Afines. Actualizado 12/2010
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
- Cáceres E., García M.L., Selgas M.D. (2008). Effect of pre-emulsified fish oil as source of PUFA n-3- on microstructure and sensory properties of mortadella, a Spanish bologna-type sausage. *Meat Science* 80: 183-193
- Campo M.M., Nute G.R., Hughes S.I., Enser M., Wood J.D., Richardson R.I. (2006). Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science* 72: 303-311
- CEPA Cámara de Empresarios Productores Avícolas (2012)
<http://www.aviculturaargentina.com.ar/> evolución_avicultura. 13/01/2012

- Chaiyasit W., McClements D.J., Decker E.A. (2005). The relationship between the physicochemical properties of antioxidants and their ability to inhibit lipid oxidation in bulk oil and oil in water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4982-4988
- Chen Q., Zhao J., Chaitep S., Guo Z. (2009). Simultaneous analysis of main catechins contents in green tea (*Camellia Sinensis* L.) by Fourier transform near infrared reflectance (FT-NIR) spectroscopy. *Food Chemistry* 113: 1272-1277
- Chen X., Jo C., Lee J. I., Ahn D. U. (1999). Lipid oxidation, volatiles and color changes of irradiated pork patties as affected by antioxidants. *Journal of Food Science* 64: 16-19
- Cheng J.H. y Ockerman H.W. (2003). Effect of phosphate with tumbling on lipid oxidation of precooked roast beef. *Meat Science* 65: 1353-1359
- Cheng J.H., Wang S.T., Ockerman H.W. (2007). Lipid oxidation and color change of salted pork patties. *Meat Science* 75: 71-77
- Choe E., Min D.B. (2006). Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5: 169-186
- Choi Y.S., Choi J.H., Han D.J., Kim H.Y., Lee M.A., Kim H.W., Jeong J.Y., Kim C.J. (2009). Characteristics of low-fat meat emulsion systems with pork fat replaced by vegetable oils and rice bran fiber. *Meat Science* 82: 266-271
- Choi Y.S., Choi J.H., Han D.J., Kim H.Y., Lee M.A., Kim H.W., Lee J.W., Chung H.J, Kim C. J. (2010). Optimization of replacing pork back fat with grape seed oil and rice bran fiber for reduced-fat meat emulsion systems. *Meat*

Science 84: 212-218

Clark E.M., Mahoney A.W., Carpenter C.E. (1997). Heme and total iron in ready-to-eat chicken. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*. 45: 124-126

Cofrades S., López-López I., Solas M.T., Bravo I., Jiménez-Colmenero F. (2008). Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low-salt gel/emulsion meat systems. *Meat Science* 79: 767-776

Coronado S.A., Trout G.R., Dunshea F.R., Shah N. P. (2002). Antioxidant effects of rosemary extract and whey powder on the oxidative stability of wiener sausages during 10 months frozen storage. *Meat Science* 62: 217-224

Crehan C.M., Hughes E., Troy D.J., Buckley D.J. (2000). Effects of fat level and maltodextrin on the functional properties of frankfurters formulated with 5, 12 and 30% fat. *Meat Science* 55: 463-469

Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329: 23-38

D'Arrigo M., Hoz L., Cambero I., Lopez-Bote C.J., Pin C., Ordóñez J.A. (2004). Production of n-3 fatty acid enriched pork liver paté. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol. LWT* 37: 585-591

Dean R.T., Fu S., Stocker R. Davies M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* 324: 1-18

- Del Campo J., Amiot M.J., Nguyen-The C. (2000). Antimicrobial effect of Rosemary extracts. *Journal of Food Protection* 63: 1359-1368
- Delgado-Pando G., Cofrades S., Rodríguez-Salas I., Jiménez-Colmenero F. (2011). A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver paté. *Meat Science* 88: 241-248
- Djenane D., Sánchez-Escalante A., Beltrán J. A., Roncalés P. (2003). Extension of the shelf life of beef steaks packaged in a modified atmosphere by treatment with rosemary and displayed under UV-free lighting. *Meat Science* 64: 417-426
- Doolaeghe E.H.A., Vossen E., Raes K., De Meulenaer B., Verhé R., Paelinck H., De Smet S. (2012). Effect of rosemary extract dose on lipid oxidation, colour stability and antioxidant concentrations, in reduced nitrite liver patés. *Meat Science* 90:925-931
- Du M., Ahn D.U., Nam K.C., Sell J.L. (2000). Influence of dietary conjugated linoleic acid on volatile profiles, color and lipid oxidation of irradiated raw chicken meat. *Meat Science* 56: 387-395
- Echarte M., Conchillo A., Ansorena D., Astiasarán I. (2004). Evaluation of the nutritional aspects and cholesterol oxidation products of pork liver and fish patés. *Food Chemistry* 86: 47–53
- Enser M., Richardson R.I., Wood J.D., Gill B.P., Sheard P.R. (2000). Feeding linseed to increase the n-3 PUFA of pork: fatty acid composition of muscle, adipose tissue, liver and sausages. *Meat Science* 55:201-212
- Estévez M., Morcuende D., Ventanas S., Cava R. (2003). Analysis of volatiles in meat from iberian pigs and lean pigs after refrigeration and coking by

using SPME-GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3429-3435

Estévez M., Ventanas S., Ramírez R., Cava R. (2004). Analysis of volatiles in porcine liver pâtés with added sage and rosemary essential oils using SPME-GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5164-5174

Estévez M. y Cava R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver paté. *Meat Science* 68: 551-558

Estévez M. y Cava R. (2006). Effectiveness of rosemary essential oil an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different type of frankfurters. *Meat Science* 72: 348-355

Estévez M., Ventanas S., Cava R. (2005a). Physicochemical properties and oxidative stability of liver paté as affected by fat content. *Food Chemistry* 92: 449-457

Estévez M., Ventanas J. Cava R. Puolanne E. (2005b). Characterization of a traditional finnish liver sausage and different types of Spanish liver patés: a comparative study. *Meat Science* 71: 657-669

Estévez M., Ventanas S., Cava R. (2006). Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver paté. *Meat Science* 74: 396-403

Estévez M., Ramírez R., Ventanas S., Cava R. (2007). Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver paté. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol. LWT* 40: 58-65

- Estévez M. (2011). Protein carbonyls in meat systems. A review. *Meat Science* 89: 259-279
- Fernández-Ginés J.M., Fernández-López J., Sayas-Barberá E., Sendra E., Pérez-Alvarez J.A. (2003). Effects of storage condition on quality characteristics of bologna sausages made with citrus fiber. *Journal of Food Science* 68: 710-715
- Fernández-Ginés J.M., Fernández-López J., Sayas-Barberá E., Pérez-Alvarez J.A. (2005). Meat products as functional foods: A review. *Journal of Food Science* 70: 37-43
- Fernández-López J., Sevilla I., Sayas-Barberá E., Navarro C. Marín F., Pérez-Alvarez J.A. (2003). Evaluation of the antioxidant potential of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in cooked pork meat. *Journal of Food Science* 68: 660-664
- Fernández- López J., Sayas-Barberá E., Sendra E., Pérez-Alvarez J.A. (2004). Quality characteristics of ostrich liver pâté. *Journal of Food Science* 69: 85-91
- Fernández-López J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Pérez-Alvarez J.A., Kuri V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science* 69: 371-380
- Folch J., Lees M. y Sloane-Stanley G.M. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-508
- Frankel E.N. Lipid Oxidation. Second Edition (2005). The Oily Press. Bridgwater U.K.

- Friedman, H.H., J.E. Whitney, and A.S. Szczesniak. (1963). The texturometer: a new instrument for objective texture measurement. *Journal of Food Science*, 28: 390-396
- Georgantelis D., Blekas G., Katikou P., Ambrosiadis I., Fletouris D.J. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. *Meat Science* 75: 256-264
- Grigelmo-Miguel N., Abadías-Serós M.I., Martín-Belloso O. (1999). Characterization of low-fat high-dietary fiber frankfurters. *Meat Science* 52: 247-256
- Grigioni G.M., Margaría C.A., Pensel. A., Sánchez G., Vaudagna S.R. (2000). Warmed -over flavour analysis in low temperature-long time processed meat by an "electronic nose". *Meat Science* 56: 221-228
- Hernández-Hernández E., Ponce-Alquicira E, Jaramillo-Flores M.E., Legarreta I.G. (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science* 81: 410-417
- Higdon J.V., Frei B. (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43: 89-143
- Hong G.P., Lee S., Min SG. (2004). Effects of replacement pork backfat with soybean oil on the quality characteristics of spreadable liver sausage. *Food Science and Biotechnology* 13: 51-56
- Hornsey H.C. (1956). The color of cooked cured pork. I. Estimation of the nitric

oxide-haem pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 7: 534-540

Houben J.H., van Dijk A., Eikelenboom G., Hoving-Bolink A.H. (2000). Effect of dietary vitamin E supplementation, fat level and packaging on colour stability and lipid oxidation in minced beef. *Meat Science* 55: 331-336

Hu F.B., Manson J.E., Willett W.C. (2001). Types of dietary fat and risk of coronary heart disease a critical review. *Journal of the American College of Nutrition* 20: 5-19

Huang S-W., Frankel E.N. (1997). Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* 45: 3033-3038

Im S., Hayakawa F., Kurata T. (2004). Identification and sensory evaluation of volatile compounds in oxidized porcine liver. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* 52: 300-305

Ismail H.A., Lee E.J., Ko K.Y., Paik H.D., Ahn D.U. (2009). Effect of antioxidant application methods on the color, lipid oxidation, and volatiles of irradiated ground beef. *Journal of Food Science* 74: 25-32

IUPAC (1992). *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivates*, (7th ed.) Eds. Paquot C., Hautffenne A. International Union of Pure and Applied Chemistry, Backwell Scientific Publications Inc., Oxford, UK

Jeun-Horng L., Yuan-Hui L., Chun-Chin K. (2002). Effect of dietary fish oil on fatty acid composition, lipid oxidation and sensory property of chicken frankfurters during storage. *Meat Science* 60: 161-167

- Jiménez Colmenero F. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends in Food Science & Technology* 11: 56-66
- Jiménez Colmenero F., Carballo J., Cofrades S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science* 59: 5-13
- Jiménez Colmenero F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science & Technology* 18:567-578
- Jo C., Jin S.K., Ahn D.U. (2000). Color changes in irradiated cooked pork sausage with different fat sources and packaging during storage. *Meat Science* 55: 107-113
- Jo C., Son J.H., Son C.B., Byun M.W. (2003). Functional properties of raw and cooked pork patties with added irradiated, freeze-dried green tea leaf extract powder during storage at 4°C. *Meat Science* 64: 13-17
- Juncher D., Vestergaard C. S., Soltoft-Jensen J., Weber C.J., Bertelsen G., Skibsted L.H. (2000). Effects of chemical hurdles on microbiological and oxidative stability of a cooked cured emulsion type meat product. *Meat Science* 55: 483-491
- Kilic B. (2003). Effect of microbial transglutaminase and sodium caseinate on quality of chicken doner kebab. *Meat Science* 63: 417-421
- Lee S., Hernández P., Djordjevic D., Faraji H., Hollender R., Faustman C., Decker E. A. (2006a). Effect of antioxidants and cooking on stability of n-3 fatty acids in fortified meat products. *Journal of Food Science* 71: 233-238

- Lee S., Faustman C., Djordjevic D., Faraji H., Decker E.A. (2006b). Effect of antioxidants on stabilization of meat products fortified with n-3 fatty acids. *Meat Science* 72: 18-24
- Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 233: 346-357
- Levine R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radical Biology & Medicine* 32: 790-796
- Lombardi-Boccia G., Martínez-Dominguez B., Aguzzi A. (2002a). Total heme and non-heme iron in raw and cooked meats. *Journal of Food Science* 67: 1738-1741
- Lombardi-Boccia G., Martínez-Dominguez B., Aguzzi A., Rincón-León F. (2002b). Optimization of heme iron analysis in raw and cooked red meat. *Food Chemistry* 78: 505-510
- Lund M. N., Hviid M.S., Skibsted L.H. (2007). The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Science* 76: 226-233
- Martin D., Ruiz J., Kivikari R., Puolanne E. (2008). Partial replacement of pork fat by conjugated linoleic acid and/or olive oil in liver pâtés: Effect on physicochemical characteristics and oxidative stability. *Meat Science* 80: 496-504
- Martin D., Antequera T., Muriel E., Pérez-Palacios T., Ruiz J. (2009). Liver pâté from pigs fed conjugated linoleic acid and monounsaturated fatty acids. *European Food Research and Technology* 228: 749-758

- Masuda T., Inaba Y., Maekawa T., Takeda Y., Tamura H., Yamaguchi H. (2002). Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* 50: 5863-5869
- McCarthy T.L., Kerry J.P., Kerry J.F., Lynch P.B., Buckley D.J. (2001a) Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science* 57: 45-52
- McCarthy T.L., Kerry J.P., Kerry J.F., Lynch P.B., Buckley D.J. (2001b) Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science* 57: 177-184
- Meullenet J.-F.C., Carpenter J.A., Lyon B.G., Lyon C.E. (1997). Bi-cyclical instrument for assessing texture profile parameters and its relationship to sensory evaluation of texture. *Journal of Texture Studies* 28: 101-118
- Mitsumoto M., O'Grady M.N., Kerry J.P., Buckley D.J. (2005). Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. *Meat Science* 69: 773-779
- Mossel D.A.A., Moreno García B., Struijk C.B. (2003). *Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos. Segunda Edición.* Editorial Acribia. Zaragoza, España
- Muguerza E., Gimeno O., Ansorena D., Bloukas J.G., Astiasarán I. (2001). Effect of replacing pork backfat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of Chorizo de Pamplona- a traditional

Spanish fermented sausage. *Meat Science* 59: 251-258

Muguerza E., Fista G., Ansorena D., Astiasarán I., Bloukas J.G. (2002). Effect of fat level and partial replacement of pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science* 61: 397-404

Muguerza E., Ansorena D., Astiasarán I. (2003). Improvement of nutritional properties of Chorizo de Pamplona by replacement of pork backfat with soy oil. *Meat Science* 65: 1361-1367

Muguerza E., Gimeno O., Ansorena D., Astiasarán I. (2004). New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. *Trends in Food Science and Technology* 15: 452-457

Muguruma M., Tsuruoka K., Katayama K., Erwanto Y., Kawahara S., Yamauchi K., Sathe S.K., Soeda T. (2003). Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. *Meat Science* 63: 191-197

Nawar W.W. (1996). Lipids. En *Food Chemistry* Ed. Fennema O., Marcel Dekker Inc., New York, USA

Nissen L.R., Byrne D.V., Bertelsen G., Skibsted L.H. (2004). The antioxidative activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Science* 68: 485-495

Oliver C.N., Ahn B.W., Moerman E.J., Goldstein S., Stadtman E.R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 262: 5488-5491

- O'Regan J. y Mulvihill D.M. (2009). Preparation, characterization and selected functional properties of sodium caseinate-maltodextrin conjugates. *Food Chemistry* 115: 1257-1267
- Pandit V.A. y Shelef L.A. (1994). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) *Food Microbiology* 11: 57-63
- Pappa I.C., Bloukas J.G., Arvanitoyannis I.S. (2000). Optimization of salt, olive oil and pectin level for low-fat frankfurters produced by replacing pork backfat with olive oil. *Meat Science* 56: 81-88
- Park J., Rhee K.S., Zipirin Y.A. (1990). Low-fat frankfurters with elevated levels of water and oleic acid. *Journal of Food Science* 55: 871-874
- Park D. y Xiong Y.L. (2007). Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. *Food Chemistry* 103: 607-616
- Park S.Y., Yoo S.S., Uh J.H., Eun J.B., Lee H.C., Kim Y.J., Chin K.B. (2007). Evaluation of lipid oxidation and oxidative products as affected by pork meat cut, packaging method, and storage time during frozen storage (-10 °C). *Journal of Food Science* 72: 114-118
- Park S.Y., Kim Y.J., Lee H.C., Yoo S.S., Shim J.H., Chin K.B. (2008). Effect of pork meat and packaging type on lipid oxidation and oxidative products during refrigerated storage (8°C). *Journal of Food Science* 73: 127-133
- Pennisi Forell S.C., Ranalli N., Zaritzky N.E., Andrés S.C., Califano A.N. (2010). Effect of type of emulsifiers and antioxidants on oxidative stability, colour and fatty acid profile of low-fat beef burgers enriched with unsaturated fatty acids and phytosterols. *Meat Science* 86: 364-370

- Perlo F., Gago-Gago A., Rosmini M., Cervera-Pérez R., Pérez-Alvarez J., Pagan-Moreno M., López-Santovenia F., Aranda-Catala V. (1995). Modification of physico-chemical and colour parameters during the marketing of paté. *Meat Science* 41: 325-333
- Phillips A.L., Faustman C., Lynch M.P., Govoni K.E., Hoagland T.A., Zinn S.A. (2001). Effect of dietary α -tocopherol supplementation on color and lipid stability in pork. *Meat Science* 58: 389-393
- Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O., Oliveira M.B.P.P., Ferreira M.A. (1998). FIA valuation of nitrite and nitrate contents of liver pâtés. *Food Chemistry* 62: 359-362
- Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O., Oliveira M.B.P.P., Ferreira M.A. (2000). Quantification of synthetic phenolic antioxidants in liver pâtés. *Food Chemistry* 68: 353-357
- Purchas R.W., Rutherford S.M., Pearce P.D., Vather R., Wilkinson B.H.P. (2004). Cooking temperature effects on the forms of iron and levels of several other compounds in beef semitendinosus muscle. *Meat Science* 68: 201-207
- Ramos A., Cabrera M.C., del Puerto M., Saadou A. (2009). Minerals, haem and non-haem iron contents of rhea meat. *Meat Science* 81: 116-119
- Reznick A.Z., Packer L. (1994) Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology* 233: 357-363
- Rhee K.S., Ziprin Y.A. (2001). Pro-oxidative effects of NaCl in microbial growth-controlled and uncontrolled beef and chicken. *Meat Science* 57: 105-112

- Rincón F., Martínez B., Delgado J. M. (2003). Detection of factors influencing nitrite determination in meat. *Meat Science* 65: 1421-1427
- Riznar K., Celan S., Knez Z., Skerget M., Bauman D., Glaser R. (2006). Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary extract in chicken frankfurters. *Journal of Food Science* 71: 425-429
- Rodríguez Carpena J.G., Morcuende D., Estévez M. (2012). Avocado, sunflower and olive oils as replacers of pork back-fat in burger patties: effect on lipid composition, oxidative stability and quality traits. *Meat Science* 90: 106-115
- Rosmini M.R., Perlo F., Pérez-Alvarez J.A., Pagan-Moreno M.J., Gago-Gago A., López-Santovenia F., Aranda-Catalá V. (1996). TBA test by an extractive method applied to paté. *Meat Science* 42: 103-110
- Rueda-Lugo U., González-Tenorio R., Totosaus A. (2006). Sustitución de lardo por grasa vegetal en salchichas: Incorporación de pasta de aguacate. Efecto de la inhibición del oscurecimiento enzimático sobre el color. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26: 441-445
- Russell E.A., Lynch A., Lynch P.B., Kerry J.P. (2003). Quality and shelf life of duck liver pâté as influenced by dietary supplementation with tocopheryl acetate and various fat sources. *Journal of Food Science* 68: 799- 802
- Sakai T., Munasinghe D.M.S., Kashimura M., Sugamoto K., Kawahara S. (2004). Effect of NaCl on lipid peroxidation-derived aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal formation in minced pork and beef. *Meat Science* 66: 789-792

- Sánchez-Escalante A., Djenane D., Torrescano G., Beltrán J. A., Roncalés P. (2001). The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science* 58: 421-429
- Sasaki K., Mitsumoto M., Kawabata K. (2001). Relationship between lipid peroxidation and fat content in Japanese Black beef *Longissimus* muscle during storage. *Meat Science* 59: 407-410
- Schricker B.R., Miller D.D., Stouffer J.T. (1982). Measurement and content of nonheme and total iron in muscle. *Journal of Food Science* 47: 740-743
- Schricker B.R., Miler D.D. (1983). Effects of cooking and chemical treatment on heme and nonheme iron in meat. *Journal of Food Science* 48: 1340-1349
- Sebranek J.G., Sewalt V.J.H., Robbins K.L., Houser T.A. (2005). Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science* 69: 289-296
- Seyfert M., Kropf D.H., Hunt M.C. (2004). Final cooked temperature effects of ground pork on its ability to react with nitrite. *Journal of Food Science*. 69: 506-510
- Shahidi F. (1997). Natural Antioxidants: an overview. En *Natural Antioxidants* Ed. Shahidi F., AOCS Press, Illinois, USA
- Sheely P.I.A., Morrissey P.A., Flynn A. (1991). Influence of dietary α -tocopherol on tocopherol concentrations in chicken muscle. *British Poultry Science* 32: 391-397

- Silva J.G., Morais H.A., Oliveira A.L., Silvestre M.P.C. (2003). Addition effects of bovine blood globin and sodium caseinate on the quality characteristics of raw and cooked ham pâté. *Meat Science* 63: 177-184
- Stadtman E.R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annual Review of Biochemistry* 62: 797-821
- Su Y.K., Bowers J.A., Zayas J.F. (2000). Physical characteristics and microstructure of reduced-fat frankfurters as affected by salt and emulsified fats stabilized with nonmeat proteins. *Journal of Food Science* 65: 123-128
- Systat[®] 12 Statistics-I. Copyright[©] 2007 by Systat Software, Inc. Chicago, IL, USA.
- Tan S.S., Aminah A., Zhang X.G., Abdul S.B. (2006). Optimizing palm oil and palm stearin utilization for sensory and textural properties of chicken frankfurters. *Meat Science* 72: 387-397
- Tang S.Z., Kerry J.P., Sheehan D., Buckley D.J., Morrissey P.A. (2000). Dietary tea catechins and iron-induced lipid oxidation in chicken meat, liver and heart. *Meat Science* 56: 285-290
- Tang S.Z., Kerry J.P., Sheehan D., Buckley D.J., Morrissey P.A. (2001a). Antioxidative effect of dietary tea catechins on lipid oxidation of long-term frozen stored chicken meat. *Meat Science* 57: 331-336
- Tang S.Z., Kerry J.P., Sheehan D., Buckley D.J., Morrissey P.A. (2001b). Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Research*

International 34: 651-657

Tang S.Z., Ou S.Y., Huang X.S., Li W., Kerry J.P., Buckley D.J. (2006). Effects of added tea catechins on colour stability and lipid oxidation in minced beef patties held under aerobic and modified atmospheric packaging conditions. *Journal of Food Engineering* 77: 248-253

Totosaus A. y Pérez-Chabela M.L. (2009). Textural properties and microstructure of low-fat and sodium-reduced meat batters formulated with gellan gum and dicationic salts. *LWT-Food Science and Technology* 42: 563-569

Tornberg E. (2005). Effects of heat on meat proteins-Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science* 70: 493-508

Turhan S., Altunkaynak T.B., Yazici F. (2004). A note on the total heme iron contents of ready-to-eat doner kebabs. *Meat Science* 67: 191-194

Ureña, P., D'Arrigo, H. y Giron M. (1999). En "Evaluación sensorial de los alimentos: aplicación didáctica". Editorial Agraria, pág. 72. Lima.

Utrera M., Morcuende D., Rodriguez-Carpena J.G., Estévez M. (2011). Fluorescent HPLC for detection of specific protein oxidation carbonyls α -aminoadipic and γ -glutamic semialdehydes in meat systems. *Meat Science* 89: 500-506

Valencia I., Ansorena D., Astiasarán I. (2006). Stability of linseed oil and antioxidants containing dry fermented sausages: A study of the lipid fraction during different storage conditions. *Meat Science* 73: 269-277

- Vandendriessche F. (2008). Meat products in the past, today and in the future. *Meat Science* 78: 104-113
- Vasavada M.N., Dwtvedi S., Cornforth D. (2006). Evaluation of garam masala species and phosphates as antioxidants in cooked ground beef. *Journal of Food Science* 71: 292-297
- Viana F.R., Silva V.D.M., Delvivo F.M., Bizzotto C.S., Silvestre M.P.C. (2005). Quality of ham pâté containing bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Science* 70: 153-160
- Waszkowiak K., Dolata W. (2007). The application of collagen preparations as carriers of rosemary extract in the production of processed meat. *Meat Science* 75: 178-183
- WHO (2003). World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO technical report series 916. Geneva.
- Wong J.W., Hashimoto K., Shibamoto T. (1995). Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2707-2712
- Wu C.F.J., Hamada M. (2000). Experiments: Planning Analysis and Parameter Design Optimization. John Wiley & Sons, Inc. U.K
- Yang H.S., Choi S.G., Jeon J.T., Park G.B., Joo S.T. (2007). Textural and sensory properties of low fat pork sausages with added hydrated oatmeal and tofu as texture-modifying agents. *Meat Science* 75: 283-289
- Yen G-C., Chen H.Y., Peng H.H. (1997). Antioxidant and pro-oxidant effects

of various tea extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 30-40

Yilmaz I., Simsek O, Isikli M. (2002). Fatty acid composition and quality characteristic of low-fat cooked sausages made with beef and chicken meat, tomato juice and sunflower oil. *Meat Science* 62: 253-258

Youssef M.K. y Barbut S. (2009). Effects of protein level and fat/oil on emulsion stability, texture, microstructure and color of meat batters. *Meat Science* 82: 228-233

Yu L., Scanlin L., Wilson J., 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: 582-585

Zheng W. and Wang S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5165-5170