

11-
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

EVALUACIÓN DEL DETERIORO QUÍMICO DE
LÍPIDOS DE CARNE DE RES CONSERVADA
EN CONGELACIÓN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
GABRIELA DÍAZ ARGOMEDO



MÉXICO, D.F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

275030



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

P/D

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	<i>Prof. Zoila Nieto Villalobos</i>
VOCAL	<i>Prof. Francisca Aida Iturbe Chiñas</i>
SECRETARIO	<i>Prof. María De Los Ángeles Valdivia López</i>
<i>1er. Suplente</i>	<i>Prof. Bertha Julieta Sandoval Guillen</i>
<i>2do. Suplente</i>	<i>Prof. Eduardo Mendoza Martínez</i>

Sitio donde se desarrolló el TEMA:

*Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Facultad de Química, Ciudad Universitaria.*

ASESOR *Prof. Francisca Aida Iturbe Chiñas*

Francisca Aida Iturbe Chiñas

SUSTENTANTE *Gabriela Díaz Argomedo*

Gabriela Díaz Argomedo

*Señor gracias por la dicha de la vida, así como
por las bendiciones que a través de mi
familia me haces llegar.*

*Mi más sincero agradecimiento
a la M. en C. Francisca A. Iturbe Chiñas por su
asistencia, interés, y apoyo mostrados
en la dirección de este trabajo.*

*A los profesores de la Facultad de Química, y en especial
a la M. en C. Ángeles Valdivia y M. en C. Zoila Nieto
por el tiempo dedicado a la revisión y mejora
de este trabajo.*

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

*De manera muy especial dedico este trabajo a
mis padres: Graciela Argomedo y Víctor Díaz
que con su amor incondicional, ejemplo y apoyo me
impulsan en la realización de mis metas.*

Y a todos y cada uno de mis amigos.

ÍNDICE

Página

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	i
OBJETIVO	iii
II. ANTECEDENTES	1
1. CARNE DE RES _____	1
1.1 Composición _____	2
1.2. Distribución y composición lipídica _____	4
2. CONSERVACIÓN DE LA CARNE _____	6
2.1 Refrigeración _____	7
2.2 Congelación _____	8
3. DETERIORO QUÍMICO DE LOS LÍPIDOS _____	11
3.1 Lipólisis _____	11
3.2 Oxidación de lípidos _____	12
3.2.1 Autooxidación _____	12
3.2.2 Papel del oxígeno en el proceso oxidativo _____	14
3.2.3 Autooxidación del ácido linoleico _____	15
3.2.4 Descomposición de los peróxidos _____	17
3.2.5 Formación de Malonaldehído _____	19
3.2.6 Interacción del medio en la velocidad de oxidación _____	23

4. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE RANCIDEZ OXIDATIVA _____	29
4.1 Índice de Peróxidos _____	30
4.2 Índice de TBA _____	32
4.3 Índice de Kreis _____	33
III. METODOLOGÍA _____	35
1. Selección y preparación de la muestra _____	35
2. Seguimiento del deterioro oxidativo _____	36
IV. RESULTADOS _____	37
1. Selección y preparación de la muestra _____	37
2. Seguimiento del deterioro oxidativo _____	38
V. CONCLUSIONES _____	52
VI. BIBLIOGRAFÍA _____	55
VII. APÉNDICE A _____	59

LISTA DE FIGURAS

Figura

- | | |
|---|----|
| 1. Esquema general de la Autooxidación: Mecanismo simplificado por radicales libres _____ | 13 |
| 2. Reacciones de iniciación en la oxidación del ácido linoleico _____ | 16 |
| 3. Reacciones secundarias en la oxidación del ácido linolénico _____ | 21 |
| 4. Esquema general de la autooxidación de los lípidos _____ | 22 |

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico

- | | |
|------------------------------|----|
| 1. Índice de Peróxidos _____ | 41 |
| 2. Índice de TBA _____ | 44 |
| 3. Índice de KREIS _____ | 47 |

LISTA DE TABLAS

Tabla

- | | |
|---|----|
| 1. Composición del tejido muscular magro de diferentes especies ____ | 3 |
| 2. Contenido de ácidos grasos presentes en los triglicéridos de la carne de res _____ | 5 |
| 3. Tiempo recomendado de almacenamiento, para conservar la calidad óptima de la carne fresca a diversas temperaturas _____ | 10 |
| 4. Grado de saturación de los ácidos grasos constituyentes de los lípidos del tejido muscular de diversas especies _____ | 24 |
| 5. Concentración de hierro en músculo de diversas especies _____ | 26 |
| 6. Contenido de grasa de los cortes Sirlón y New York, obtenido experimentalmente _____ | 37 |
| 7. Evolución de los índices de oxidación de los lípidos de carne de res (corte New York), almacenada a una temperatura de -18°C _____ | 39 |

RESUMEN

Los procedimientos más comúnmente empleados en la preservación de las características de frescura de la carne son la utilización de depósitos refrigerados así como la congelación; a pesar de que existen otros métodos eficaces para su conservación como la deshidratación y/o tratamientos térmicos entre otros, estos promueven cambios importantes en las características de la carne, dando origen a un producto diferente.

La aplicación de temperaturas de congelación a la carne fresca garantiza una larga capacidad de conservación, provocando alteraciones relativamente escasas en las características sensoriales, tras un prolongado tiempo de almacenamiento tiene como limitante la aparición de olores y sabores típicamente rancios que hacen al producto inaceptable para el consumo; actualmente la presencia de productos de oxidación en alimentos, ha adquirido relevancia en lo referente a la salud, ya que algunos de ellos se han relacionado con problemas vasculares y enfermedades cardíacas en el hombre.

El seguimiento del deterioro oxidativo de los lípidos de carne de res preservada bajo condiciones de congelación, se llevó acabo a través del monitoreo de algunos productos de oxidación, por medio de las determinaciones del Índice de Peróxidos, Índice del Ácido Tiobarbitúrico (TBA), e Índice de Kreis. Las muestras (carne de res corte New York) empaquetadas de manera comercial, permanecieron almacenadas a una temperatura de $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (0°F) por espacio de 300 días.

A través del índice de peróxido se determinó que la muestra, de acuerdo con la AOAC, estuvo fuera de especificación entre los 60 y 105 días de

almacenamiento al presentar un valor de peróxidos superior a los 10.0 meq/kg grasa.

Los productos secundarios tipo malonaldehído se hicieron evidentes a través de la determinación de TBA, una vez transcurridos 45 días, coincidiendo con la superación del límite crítico de aceptabilidad, al corresponderle un valor de peróxidos superior a 5.0 meq/kg grasa. Por su parte el índice de Kreis reportó que la muestra estuvo oxidada a partir de los 60 días.

Se concluye por lo tanto que, los cortes grasos de res similares al New York, transcurridos 45 días de permanencia en congelación, a una temperatura de -18°C en empaque comercial, presentan una pérdida considerable en sus características de frescura aunada una disminución en el valor nutricional.

I. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de alimentos asciende actualmente a unos 3 000 m.t. anuales, la mitad de cuya cantidad corresponde a productos perecederos que requieren ser objeto de algún proceso de conservación a través de procedimientos químicos (modificando la composición de los productos) y/o físicos (por acción de factores externos), dentro de estos últimos, desempeñan un importante papel aquellos basados en la aplicación de bajas temperaturas en depósitos refrigerados y la congelación.

La preservación de la carne fresca a gran escala, haciendo uso de la congelación, data de 1880, año en que por primera vez se pudo transportar carne desde Australia hasta el Reino Unido (Lawrie 1991). Los beneficios proporcionados por la congelación han permitido que sea ampliamente utilizada en la distribución de cortes de carne tanto al mayoreo como al menudeo; además de que aproximadamente entre el 70 y 87% de la carne sin congelar, distribuida al menudeo, una vez adquirida por los consumidores es colocada en congeladores caseros hasta su consumo.

Al inhibirse las reacciones de alteración microbiana durante la congelación, la oxidación lipídica, también conocida como rancidez oxidativa, se convierte en un proceso relativamente más importante en el tejido muscular congelado que en el fresco.

Trabajos previos (Balarezo 1998, Donoso 1996), demuestran que las condiciones de congelación no logran inhibir el deterioro oxidativo de los lípidos en productos

cámicos, observándose también, que los diversos compuestos generados a lo largo del proceso oxidativo, pueden tener repercusiones perjudiciales sobre las características sensoriales y valor nutritivo de la carne (Fennema 1993), por lo que el monitoreo de dichos compuestos, constituye una importante pauta para el establecimiento de parámetros de calidad que beneficien tanto a productores como consumidores de productos cárnicos congelados.

Este estudio, desarrollado en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, pretende dar a conocer la evolución del proceso oxidativo de los lípidos en carne de res almacenada en congelación; contribuyendo en el proyecto global de Evaluación del Deterioro Oxidativo de Lípidos en diversos Productos Cárnicos.

OBJETIVO

Objetivo General

Conocer la evolución del proceso oxidativo de los lípidos presentes en carne de res, almacenada bajo condiciones de congelación.

Objetivos Particulares

- Realizar el seguimiento del deterioro oxidativo de los lípidos en muestras de carne de res, almacenadas en empaque comercial a una temperatura de -18°C .
- Establecer la vida útil de la carne de res preservada en empaque comercial, a una temperatura de -18°C .

II. ANTECEDENTES

1. Carne de Res.

El término carne, se refiere a la fibra muscular, principalmente de mamíferos, que después de la muerte del animal sufre cambios físicos y bioquímicos denominados *post-mortem*; la transformación del músculo a carne involucra una serie de importantes modificaciones fisicoquímicas en el tejido muscular, las cuales dan lugar a un producto que estará en condiciones de ser consumido por el hombre.

La carne constituye uno de los alimentos de mayor importancia dentro de la dieta humana; por su alto valor nutritivo, y sus características sensoriales se convirtió en un producto altamente apreciado desde la antigüedad, sin embargo y debido a que es un producto perecedero, fue necesario desarrollar diversas prácticas que permitieran mantener su calidad óptima desde los centros de producción hasta su llegada a manos del consumidor.

Los agentes más frecuentes de deterioro son microorganismos contaminantes, capaces de utilizar amino ácidos existentes en el músculo *post-mortem* generando diversos productos de degradación tales como aldehídos, cetonas, sulfuros, disulfuros, mercaptanos y aminas que imparten características sensoriales desagradables, y que en ocasiones se han asociado a intoxicaciones; una vez que el músculo se ha transformado en un producto apto para el consumo humano, el alto contenido de humedad le hace ser susceptible a la acción

degradativa de diversos microorganismos, así como de reacciones enzimáticas y/o químicas.

La aplicación de bajas temperaturas han permitido disminuir el efecto de algunos de los agentes de degradación, sin embargo en el caso específico de la congelación aplicada a carne fresca, se ha observado que el proceso oxidativo de los lípidos no logra detenerse (Balarezo 1998, Donoso 1996), promoviendo un importante decremento en la calidad.

La pérdida de las características de frescura de la carne, tiene además repercusiones en el aspecto económico, afectando a productores y consumidores, por lo que el conocimiento del perfil de oxidación en productos cárnicos congelados permitirá el establecimiento de parámetros de calidad adecuados, así como la estimación del periodo de vida útil, de forma que su seguimiento e implementación permitan a productores y distribuidores de carne ofrecer productos cuyas características sensoriales sean óptimas.

1.1 Composición

Agua, proteínas y lípidos son los constituyentes primarios de la carne, la proporción de cada uno de ellos está en función de la actividad desarrollada por el músculo del que provenga, adicionalmente se encuentran pequeñas cantidades de minerales (hierro, zinc, magnesio, potasio, sodio y calcio), carbohidratos (intermedarios de la glicólisis y glucógeno) así como algunos compuestos inorgánicos.

El contenido de agua representa entre el 68 y 80% del peso de la carne; la mayor de la cual se encuentra localizada en el interior de las células (miofibrillas) como principal constituyente del sarcoplasma.

Por su parte las proteínas son los constituyentes más importantes de la fracción comestible de la carne, representan el 19 a 23% del peso de la misma; consideradas de gran valor nutricional al contener todos los amino ácidos esenciales para el hombre, y presentar una digestibilidad superior al 95%.

La composición de la carne varía notoriamente entre las diferentes especies y cortes existentes, siendo la principal fuente de variación el contenido de lípidos que depende entre otros factores del consumo y tipo de alimento ingerido por el animal, llegando a representar entre el 0.5 y 20% (o más) del peso, cantidad aportada tanto por la grasa localizada alrededor del músculo como por la que se encuentra en su interior (Forrest. 1987).

Tabla 1.

Composición del tejido muscular magro de diferentes especies				
g / 100g carne				
Especie	Agua	Proteína	Lípidos	Cenizas
Vacuno	70-73	20-22	4-8	1.0
Cerdo	68-70	19-20	9-11	1.4
Pollo	73.7	20-23	4.7	1.0
Cordero	73	20	5-6	1.6
Bacalao	81.2	17.6	0.3	1.2

(Fennema 1993)

La composición de la carne (Tabla 1) puede verse modificada por otros elementos como son el hueso y piel que puedan estar incluidos en la pieza.

1.2. Distribución y composición lipídica

El componente graso de la carne, constituido por triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y algunas vitaminas liposolubles, es de gran relevancia para el consumidor ya que contribuye al sabor y aroma de las piezas, así como a la sensación bucal, sin embargo cantidades excesivas disminuyen la porción magra utilizable sin mejorar la calidad sensorial; en la actualidad existe una marcada tendencia a reducir la ingesta de calorías aportada por lípidos, por lo que el contenido de grasa en las piezas adquiridas por los consumidores tiende a ser baja.

En el tejido muscular, las células grasas se encuentran localizadas fuera de los haces musculares primarios de manera subcutánea, mientras que los lípidos situados en el área endomisial ordinariamente están asociados a estructuras celulares como pared celular, mitocondrias y/o microsomas; existe otra fracción que se encuentra en forma de gotitas de grasa muy finas, distribuidas en la fibra muscular, responsable del marmoreado de la carne (Fennema 1993), por lo que la composición lipídica de la carne puede dividirse en lípidos del tejido muscular y lípidos del tejido adiposo.

Los lípidos de la porción magra o muscular asociada a estructuras celulares, constituye entre el 2-4% del total de los lípidos presentes en la res, sin embargo, y a pesar de ser una fracción muy pequeña, son de gran trascendencia en el proceso

oxidativo debido a su alto contenido en ácidos grasos insaturados. Esta porción, contienen proporciones mayores de fosfolípidos que los lípidos del tejido adiposo, contenido que va del 0.8 al 1.0%, siendo sus ácidos grasos más insaturados que los triacilgliceridos del tejido adiposo (Frankel 1993, Lundberg 1962), esta fracción lipídica presenta un contenido de triglicéridos que va del 2-4%.

Cabe hacer notar en el caso de la carne de res magra, que de los ácidos grasos que presentan 2 ó 3 insaturaciones (de un total de 31.1%), el 25.2% de ellos se encuentra en fosfolípidos, mientras que los triglicéridos solo los contienen en un 6.1%; comportamiento similar se presenta con los ácidos grasos con 4 o más insaturaciones ya que de los 19.3% presentes, los fosfolípidos los contiene en un 19.2%, y los triglicéridos solo en 0.1% (Labuza 1971).

Tabla 2.

Contenido de ácidos grasos presentes en los triglicéridos de la carne de res	
Acido graso	g / 100 g grasa
Mirístico (14:0)	3.1
Palmítico (16:0)	29.1
Estearico (18:0)	18.9
Oleico (18:1)	44
Linoleico (18:2)	0.3
Linolénico (18:3)	trazas
Araquídico (20:0)	trazas

(Labuza 1971)

Por otro lado, son los triglicéridos junto con los ácidos grasos libres los lípidos más abundantes del tejido adiposo. En lo que se refiere a su composición, se sabe que la grasa animal posee en general un alto contenido de ácidos grasos C16 y

C18, cantidades intermedias de ácidos insaturados (principalmente oleico y linoleico) y pequeñas cantidades de ácidos grasos de cadena impar (Fennema 1993), como lo muestra para el caso de la grasa de carne de res la Tabla 2.

2. Conservación de la Carne

Los métodos de preservación de la carne fresca, por diferentes que sean, tienen en común la manipulación de las condiciones ambientales con el fin de reprimir el desarrollo microbiano, pudiéndose agrupar en tres grandes categorías basadas en el control de: temperatura, humedad y más directamente con la aplicación de agentes letales como bactericidas, bacteriostáticos, fungicidas, etc. Dentro de las prácticas económicas que emplea la industria cárnica, se busca adicionalmente evitar en lo posible pérdidas de peso y modificaciones en apariencia, sabor o textura.

La aplicación de temperaturas que se encuentran por debajo o por encima del intervalo óptimo de desarrollo microbiano tienen un efecto preventivo; sin embargo si lo que se desea es preservar y conservar la calidad óptima de la carne fresca, es necesario someter a las piezas a condiciones más extremas, donde sea posible inhibir la actividad microbiana o incluso eliminar a los microorganismos presentes. Los métodos de conservación que encontramos dentro de esta categoría de control de la temperatura, son la refrigeración y congelación por el lado del uso de bajas temperaturas y a los tratamientos térmicos por el lado de aplicación de calor (Lawrie

1991), estos últimos tienen el inconveniente de modificar las características fisicoquímicas y sensoriales de la carne dando origen a productos diversos.

2.1 Refrigeración

La refrigeración es el método de conservación más utilizado en la preservación de carne fresca así como de otros productos cárnicos debido a los beneficios ofrecidos, que además de flexibilidad y menor costo comparado con la congelación, son los de provocar cambios mínimos en apariencia, textura y/o sabor de los productos (Zbignieco 1987). Sin embargo el almacenamiento en refrigeración se limita a períodos de tiempo cortos.

Este procedimiento de preservación consiste en mantener a las piezas a bajas temperaturas, comprendidas entre los 3 y 5 °C (38-41°F), que evitan el desarrollo de bacterias patógenas y limitan la actividad de las bacterias psicrófilas.

Bajo condiciones comerciales, durante su exhibición para la venta, el período de tiempo que la carne mantiene un aspecto aceptable es de aproximadamente 2 ó 3 días (Hotchkiss 1996); una vez adquirida y preservada en refrigeradores caseros, deberá ser consumida dentro de los cuatro días siguientes a su compra.

Son la carga microbiana original, las condiciones de temperatura y humedad, así como la presencia o ausencia de envolturas protectoras, los principales factores que afectan la vida útil de la carne así preservada.

2.2 Congelación

La misión principal de la congelación en términos económicos estriba en conservar la calidad de las materias primas y productos alimenticios durante periodos prolongados de almacenamiento (Zbignieco 1987). La preservación por medio de la congelación se consigue aplicando temperaturas inferiores a la zona térmica en la cual son posibles la proliferación de microorganismos y la actividad de la mayoría de las enzimas, a la vez que semeja la "deshidratación" del producto, mediante el paso paulatino del agua desde el estado líquido al estado de agregación sólido, promoviendo una disminución en la actividad de agua (a_w).

La congelación presenta el beneficio adicional de que los cambios perjudiciales sobre las propiedades cualitativas y organolépticas de la carne fresca son mínimos, sin embargo y dependiendo del manejo y las condiciones, puede promoverse la aparición de defectos, ya sea durante el congelado, almacenamiento, distribución y/o descongelado de las piezas, como:

- a) problemas en la apariencia, por modificación en el color (rojo oscuro o café, desigualdad y/o decoloración),
- b) quemaduras por frío, debidas a la sublimación de cristales de hielo hacia la atmósfera del contenedor, observándose como decoloraciones o manchas de color ámbar sobre la superficie de la carne, causadas por pequeñas bolsas de aire disipan la luz incidente,
- c) deshidratación por el paso paulatino del agua de la superficie de la carne hacia la atmósfera del contenedor, y/o

- d) goteo, consecuencia de la pérdida de agua no reabsorbida por proteínas y que se pone de manifiesto durante el descongelado, perdiéndose con ella otros componentes hidrosolubles (proteínas, péptidos, amino ácidos, ácido láctico, vitaminas y minerales).

Defectos que parecen estar asociados a:

- 1) naturaleza y localización de los cristales de hielo que se forman en el interior del músculos,
- 2) daño mecánico de las estructuras celulares debido a los cambios de volumen, causado por fluctuaciones de temperatura por encima del punto de congelación, provocando que los cristales de hielo pequeños sublimen y resucristalizan en otros de mayor tamaño,
- 3) incremento en la fuerza iónica debida a la concentración de solutos provocando la desnaturalización de las proteínas,
- 4) sublimación del agua, y
- 5) oxidación de lípidos y proteínas.

La gravedad atribuible a estos factores dependen de la velocidad de congelación, tiempo y condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad), así como a la presencia o ausencia, y tipo de material de empaque (Bowers 1992, Forrest 1987).

La temperatura de almacenamiento seleccionada, tiene un marcado efecto en la estabilidad de los productos; en el caso de la carne magra se sabe ésta comienza a congelarse a partir de los -1°C , y que incluso a temperaturas inferiores a los -20°C la congelación no ha tenido lugar en su totalidad, debido a la depresión en el punto de congelación. La aplicación de temperaturas normales de

almacenamiento en congelación, -18°C (0°F), permite que aproximadamente el 99.8% del agua de la carne se encuentre congelada; a esta temperatura la velocidad del proceso oxidativo es substancialmente menor que a temperaturas cercanas a los -10°C , puesto que se ha observado que cuando ocurre una aceleración en la velocidad de reacción inducida por la congelación, como sucede con la oxidación de los lípidos, generalmente ésta es más evidente pocos grados por debajo del punto de congelación inicial de la muestra (Fennema 1993, Forrest 1987).

El tiempo que la carne puede permanecer almacenada en congelación, manteniendo una calidad aceptable, depende en gran medida de la especie de la que provenga, sobretodo de la naturaleza y composición de su grasa; puesto que la grasa de aves y cerdo es más insaturada que la de bovinos y ovinos, es de esperar que sea más susceptible al proceso oxidativo, por lo que el tiempo de almacenamiento recomendado para las primeras es menor, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3.

Tiempo recomendado de almacenamiento para conservar la calidad óptima de la carne fresca a diversas temperaturas.				
Producto	Meses			
	-12°C	-18°C	-24°C	-30°C
Vaca	4	6	12	12
Oveja	3	6	12	12
Tenera	3	4	8	10
Cerdo	2	4	6	8
Aves	2	4	8	10

(Forrest 1987)

La congelación habitual de la carne en forma de canales enteras, medianas o cuartos obedece a necesidades económicas; sin embargo una forma tan extendida de conservación de la carne como lo es la congelación, es susceptible de modificaciones que conlleven a prácticas más eficaces entre las que se encuentran, la congelación de productos como: carne deshuesada, carne en bloques o cortes, porciones de carne picada, entre otros.

La aplicación de congelación a este tipo de productos permite un mejor aprovechamiento del espacio en depósitos de almacenamiento y transporte, evita el congelar, almacenar y sacar al mercado parte de los huesos (20-23% del peso de la canal), además de que satisfacer mejor las demandas de los consumidores. El empaquetado de estos productos, limita además la pérdida de peso así como mermas en la calidad de la carne (Hotchkiss 1996, Zbignieco 1987).

3. Deterioro Químico de los Lípidos

3.1. Lipólisis

Es la hidrólisis de los enlaces éster de los lípidos, liberando a los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos y fosfolípidos, provocando un incremento en el índice de acidez. La lipólisis es catalizada por enzimas lipolíticas denominadas lipasas, pudiendo también ser el resultado del calentamiento de los lípidos en presencia de agua, como ocurre durante el freído de los alimentos.

A lo largo del almacenamiento en congelación de la carne de res, cerdo y aves, el efecto de la lipólisis no es significativo puesto que la actividad lipolítica se ve inhibida por las bajas temperaturas involucradas así como por la poca disponibilidad de agua; sin embargo es importante considerar el efecto sobre los triglicéridos y fosfolípidos durante el tiempo previo a la congelación de las piezas, ya que la liberación de los ácidos grasos hace más susceptible a los lípidos de sufrir rancidez oxidativa (Fennema 1993, Smith 1987).

3.2. Oxidación de lípidos

La oxidación de los lípidos es la principal causa de deterioro de los alimentos ricos en grasa cuando las condiciones de almacenamiento inhiben el desarrollo de microorganismos así como las reacciones enzimáticas, dando lugar a una reducción en el valor nutricional de los alimentos, y a la generación de sabores y olores desagradables; debido a lo cual el proceso oxidativo es de gran relevancia económica en la industria de los alimentos (Vercellotti 1992).

3.2.1 Autooxidación

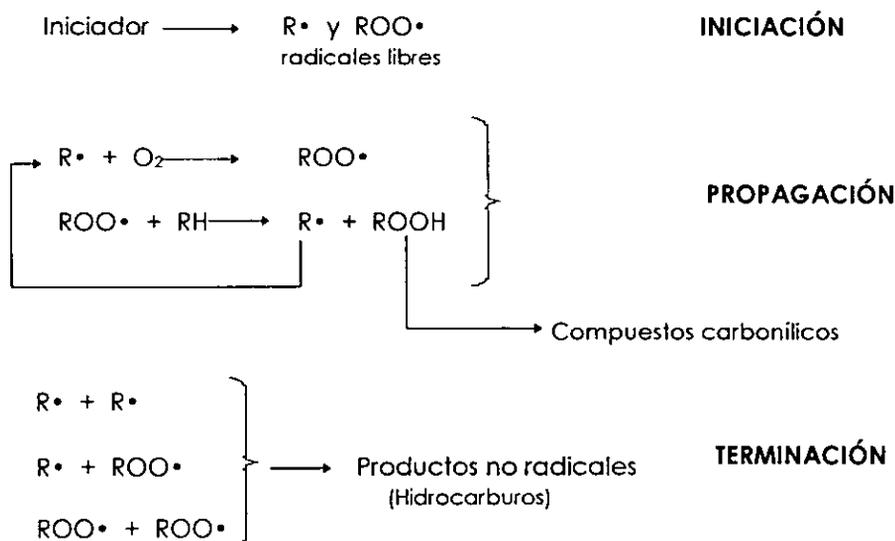
A la interacción del oxígeno molecular con compuestos orgánicos se le conoce como **autooxidación** (Chan 1987), reacción que actúa en forma autocatalítica siguiendo un mecanismo típico de radicales libres, y que se caracteriza por su alta producción de hidroperóxidos (ROOH), y ser catalizada por metales así como por exposición a la luz.

El proceso de autooxidación de manera condensada se lleva a cabo en tres etapas: Iniciación, Propagación y Terminación como lo ilustra la Figura 1., y que a continuación se describen.

a) **Iniciación.** Se da la formación de los primeros radicales libres ($R\cdot$) a partir de algún componente de la matriz que pierde un átomo de hidrógeno ya sea por acción de un catalizador metálico, descomposición de un hidroperóxido o por exposición a la luz. En una matriz rica en lípidos con alto contenido de ácidos grasos insaturados, se producirán los radical libres correspondientes a los ácidos grasos presentes.

Fig. 1.

Esquema general de la Autooxidación: Mecanismo simplificado por radicales libres



b) **Propagación.** En esta etapa, la formación de radicales libres continua, y una vez alcanzado un número suficiente de los mismos, la reacción se propaga por medio de reacciones en cadena que consumen oxígeno produciendo radicales peróxido ($\text{ROO}\cdot$); estos compuestos inestables son capaces de captar átomos de hidrógeno de otros componentes de la matriz formándose los hidroperóxidos (ROOH) y nuevos radicales libres ($\text{R}\cdot$) repitiéndose la secuencia.

En el caso de los lípidos, los átomos de hidrógeno de las posiciones α a dobles enlaces en los ácidos grasos son los más susceptibles a ser sustraídos por los radicales peróxido, dando lugar a la formación de los peróxidos de los ácidos grasos. La descomposición de los hidroperóxidos por medio de numerosas y complejas reacciones, da origen a diversos compuestos denominados productos de oxidación secundarios tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, etc.; algunos de ellos de bajo peso molecular, son los responsables del olor y sabor rancio.

c) **Terminación.** En esta última etapa de la autooxidación, los diversos radicales libres formados pueden interaccionar entre sí dando origen a una gran variedad de compuestos no radicales. La autooxidación de los lípidos en esta etapa dará origen a un gran número de hidrocarburos capaces de polimerizarse, modificando la textura de la matriz alimenticia (Fennema 1993).

3.2.2 Papel del Oxígeno en el proceso oxidativo

Se cree que es la reacción con oxígeno molecular la principal reacción implicada en el deterioro oxidativo de los lípidos (Fennema 1993). El átomo de

oxígeno presenta en sus orbitales más externos dos electrones desapareados, los cuales pueden alinearse en forma paralela o antiparalela dando lugar a dos estados denominados triplete y singulete.

En el estado triplete (3O_2), el más estable, los dos electrones desapareados están colocados en distintos orbitales, teniendo el mismo spin; en este estado es poco probable que tenga lugar un ataque directo del oxígeno a los doble enlaces de los ácidos grasos puesto que sus electrones también se encuentran en estado triplete, sin embargo en este estado, el oxígeno si puede interaccionar fácilmente con los radicales libres ($RO\cdot$) dando origen a los radicales peróxido ($ROO\cdot$).

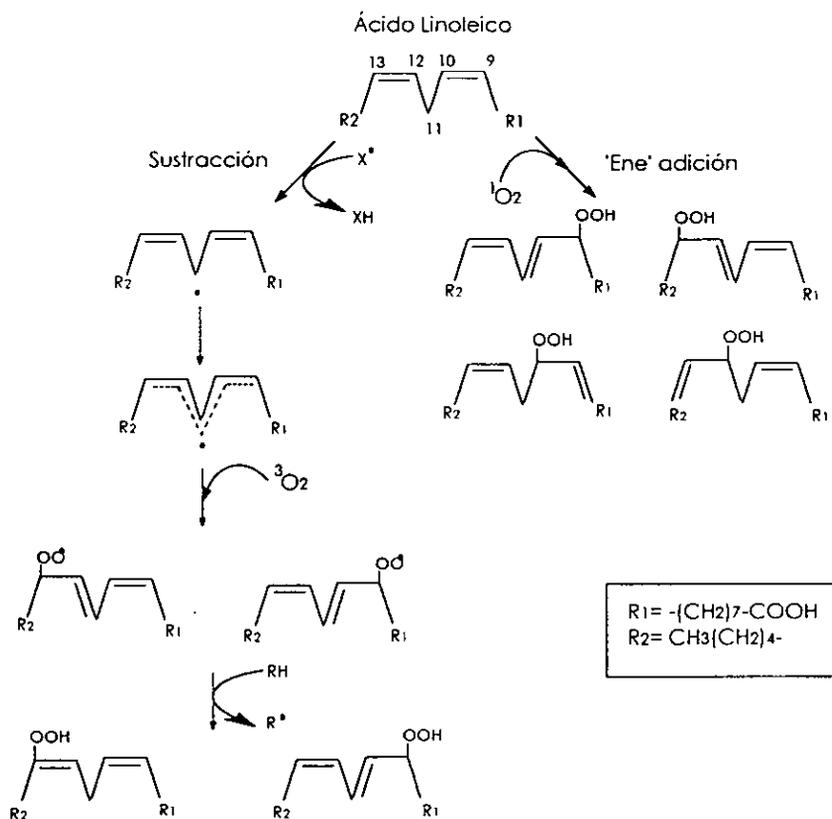
En el estado singulete (1O_2), los electrones tienen espines opuestos, por lo que la repulsión electrostática es grande, encontrándose en estado excitado; al ser una molécula muy electrofílica puede reaccionar con zonas de densidad electrónica alta como los dobles enlaces carbono-carbono. La adición del oxígeno singulete se da por medio de la reacción *eno*, la cual da lugar a la formación de hidroperóxidos, que una vez formados siguen el mecanismo por radicales libres típico de la autooxidación.

3.2.3 Autooxidación del ácido linoleico

Usando al ácido linoleico como ejemplo, el inicio de la oxidación puede seguir dos mecanismos básicos que son **sustracción** (autooxidación) y la **ene adición**, como ilustra la Figura 2.

La **sustracción** ocurre cuando un electrón o un átomo de hidrógeno es removido del ácido graso al reaccionar con una especie electrofílica como $\cdot\text{OH}$ o $\cdot\text{X}$ o por interacción con la luz. El metileno o bien los hidrógenos alílicos del pentadieno son los más susceptibles a la sustracción.

Fig. 2.
Reacciones de iniciación en la oxidación del ácido linoleico.



La sustracción inicial provoca la formación del radical libre del ácido graso, el cual puede estabilizarse por resonancia a lo largo del pentadieno original, siendo susceptible a la adición de oxígeno en estado triplete ($^3\text{O}_2$) cuando el pentadieno tiene sus electrones desapareados más deslocalizados o bien localizados en los sitios terminales (C9 y C13) dando por resultado en primera instancia la formación de los radicales hidropéroxido 9- y 13- del ácido linoleico, para finalmente formarse los hidropéroxidos 9- y 13-OOH.

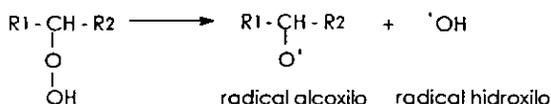
La **ene adición** que puede iniciar la oxidación de los lípidos, es causada por el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), que al tener sus electrones desapareados es capaz de adicionarse directamente a la doble ligadura del pentadieno, al encontrarse aquí la mayor densidad electrónica, produciendo una mezcla de hidropéroxidos 9-, 10-, 12- y 13- en la reacción con el ácido linoleico.

3.2.4 Descomposición de los peróxidos

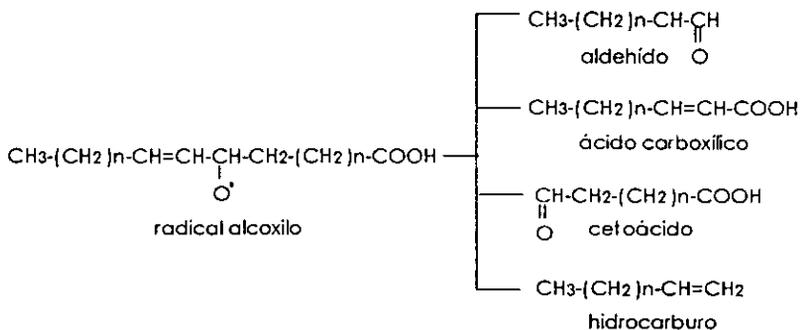
La descomposición de los hidropéroxidos da lugar a una amplia variedad de compuestos, que de manera general se denominan secundarios, los cuales a su vez pueden experimentar subsecuentes oxidaciones, dando origen a productos complejos. La descomposición de los peróxidos se pone de manifiesto una vez que ha transcurrido la etapa de inducción y propagación, debido a que la velocidad de descomposición comienza a ser mayor a la de formación, provocando que su concentración en la muestra disminuya.

Se ha propuesto que las primeras etapas de descomposición de los peróxidos están conformadas por:

- 1.- Ruptura del enlace oxígeno-oxígeno del grupo hidroperóxido, dando lugar a un radical alcoxilo y un radical hidroxilo:

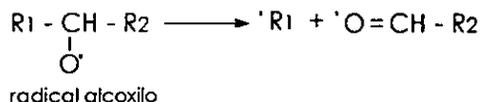


- 2.- Ruptura del enlace carbono-carbono a uno u otro lado del grupo alcoxilo. La ruptura por el lado ácido (carboxílico o éster) da lugar a la formación de un aldehído y un ácido o éster; si se presenta por el lado hidrocarbonado o metílico, se produce un hidrocarburo y un oxoácido (cetoácido) u oxoéster:



Los radicales alcoxilo, formados previamente pueden interaccionar también con otros componentes de la matriz dando origen a una gran diversidad de productos al experimentar diversas reacciones entre las que destacan:

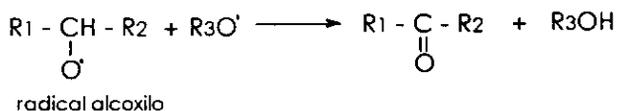
a) Fisión del radical alcoxilo, liberando un nuevo radical y un aldehído:



b) Sustracción de un hidrógeno de otro componente de la matriz, generando un nuevo radical y un alcohol:



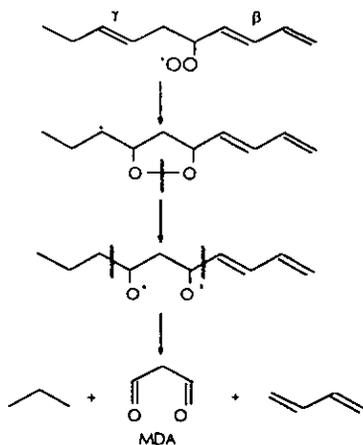
c) Interacción con otros radicales dando origen a compuestos terminales:



3.2.5 Formación de Malonaldehído

Se ha propuesto un mecanismo de formación de malonaldehído (MDA) que involucra a los ácidos grasos que presentan tres o más dobles ligaduras; los radicales libres que presentan en su estructura un doble enlace β - γ respecto al carbono que sostienen al grupo peróxido pueden ciclarse para formar un anillo de

cinco miembros, el cual al descomponerse por ruptura genera malonaldehído (Fennema 1993).



La relevancia del MDA es debida a que es uno de los productos secundarios más abundantes, y a su interacción con el ácido tiobarbitúrico que constituye el fundamento de la determinación del índice de TBA, utilizada para evaluar el deterioro oxidativo de las grasas.

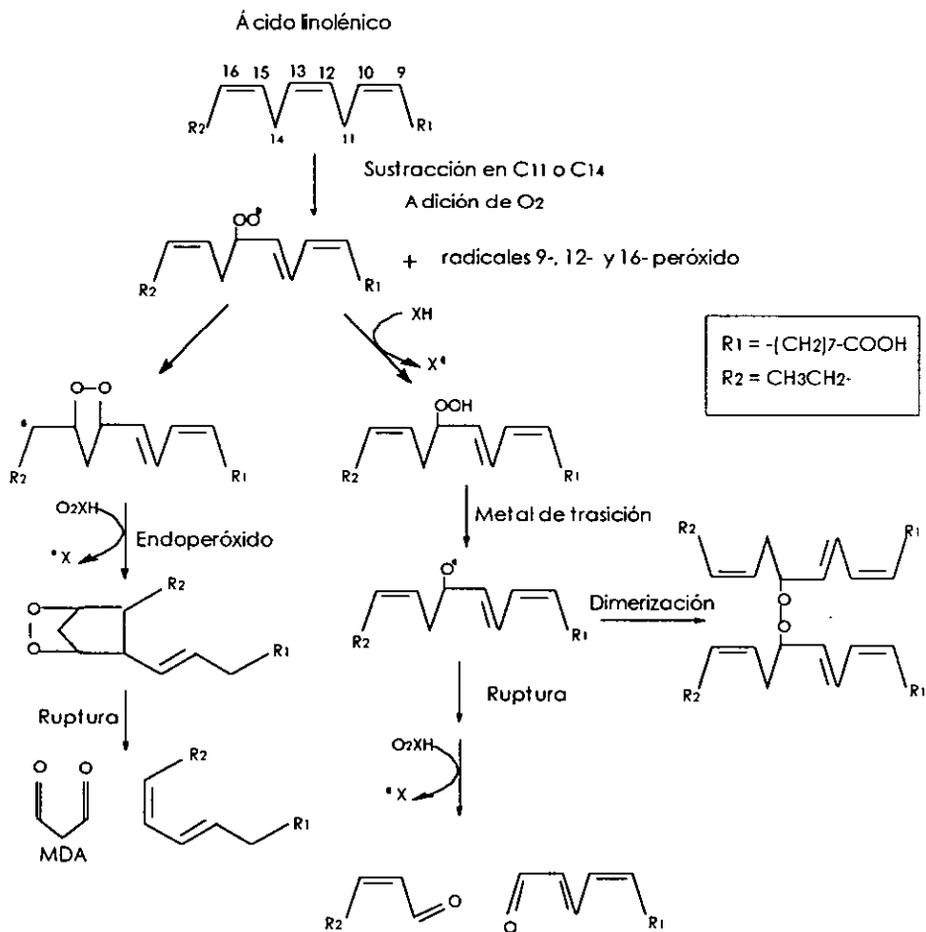
La Figura 3., muestra las reacciones secundarias del ácido linoléico (18:3), en ella se explica la formación de MDA, así como la generación de otros compuestos por diversas vías.

Los estudios realizados en oxidación de lípidos han demostrado que este es un proceso sumamente complejo, en el cual ocurren numerosas reacciones que dan lugar a una gran variedad de compuestos como lo muestra la Figura 4., y aunque ciertas etapas de este proceso están bien caracterizadas, aun no se cono-

cen en su totalidad los mecanismos implicados, además de que la mayor parte de la información generada con respecto al deterioro oxidativo de los lípidos deriva de

Fig. 3.

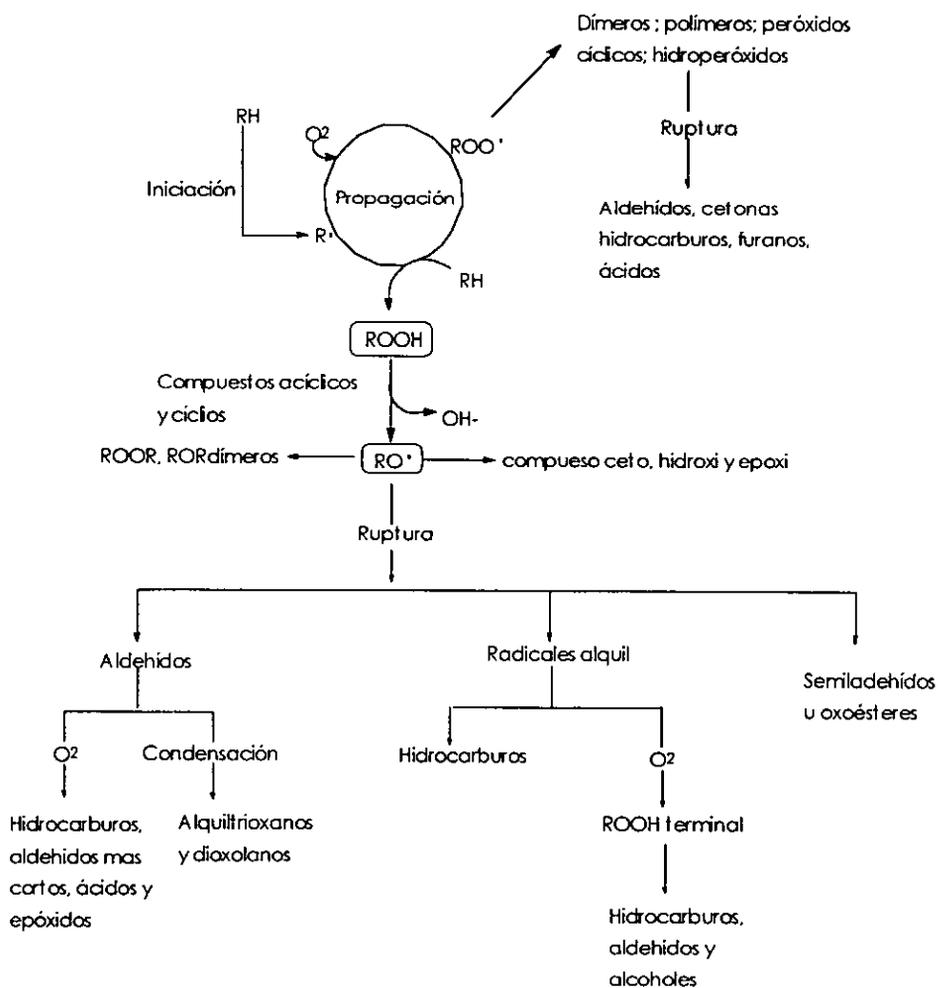
Reacciones secundarias en la oxidación del ácido linoléico.



modelos puros y resulta complicado entender y establecer las interacciones con otros componentes cuando se presenta en matrices complejas como la carne.

Fig. 4.

Esquema general de la autooxidación de los lípidos.



(Fennema 1993)

3.2.6 Interacción del medio en la velocidad de oxidación

Existen diversos factores que influyen en la velocidad de oxidación de los lípidos en los alimentos, entre los que destacan:

- Temperatura
- Humedad (relacionada con el aw)
- Superficie expuesta
- Composición de los ácidos grasos (grado de insaturación)
- Composición de la matriz alimenticia

Existe una marcada relación entre la **actividad acuosa** (aw) del alimento y la velocidad de oxidación de los lípidos¹, y debido a que la **temperatura** de almacenamiento se relaciona con el aw, se presentan como resultado de su manipulación modificaciones en la estabilidad de los alimentos. Durante el almacenamiento en congelación, el proceso oxidativo se ve favorecido, debido a que la disminución en la actividad acuosa, pasando de 0.99 en carne fresca a 0.6 en carne congelada (Riëtte 1996), incrementa la posibilidad de interacción entre los componentes de la matriz, así como la solubilidad del oxígeno, además de que por las modificaciones causadas por la congelación, pueden encontrarse expuestos más sitios catalíticos.

¹ A valores de aw muy bajos, el agua presente se encuentra fuertemente ligada a la matriz, e interfiere con la oxidación al ligar hidroperóxidos evitando su descomposición. Se ha observado que la velocidad de oxidación es mínima a valores de 0.2-0.3, ya que al formarse las sales hidratadas de los metales presentes se hacen menos solubles en la grasa; además de evitar la descomposición de hidroperóxidos al establecerse puentes de hidrógeno, y promover la descomposición de los radicales libres, vía oscurecimiento no enzimático, a compuestos antioxidantes.

A valores de aw de 0.80, el agua presenta un efecto prooxidante al incrementar la movilidad de los solutos, favoreciendo su interacción (Fennema 1993, Frankel 1993).

La composición de los ácidos grasos presentes tiene un marcado efecto en la velocidad de oxidación, ya que los ácidos grasos que presentan un mayor número de insaturaciones son más susceptibles al deterioro oxidativo, así como las dobles ligaduras conjugadas sobre las no conjugadas.

Dependiendo de la especie de la cual provenga la carne, se presenta un distinto grado de insaturación en los ácidos grasos, el cual da un indicio de la susceptibilidad de cada especie ante la oxidación.

Tabla 4.

Grado de saturación de los ácidos grasos constituyes del tejido muscular de diversas especies			
g/100g grasa			
Especie	Saturados	Monoinsaturados	Poliinsaturados
Vacuno	40-71	41-53	0-6
Cerdo	39-49	43-70	3-18
Carnero	46-64	36-47	3-5
Aves	28-33	39-51	14-23
Bacalao (magro)	30	22	48
Caballa (graso)	30	44	26

(Fennema 1993)

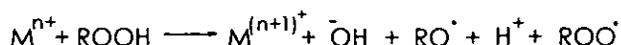
La autooxidación de los ácidos grasos saturados es extremadamente lenta, de tal forma que prácticamente estos no han sufrido cambios cuando se detecta el enranciamiento por oxidación de los ácidos grasos insaturados (Fennema 1993).

Debido a que los alimentos son matrices complejas, pueden contener numerosos compuestos no lipídicos que ejercen algún efecto en la velocidad de oxidación; en el caso de la carne algunos componentes pueden actuar como prooxidantes o antioxidantes como a continuación se describe.

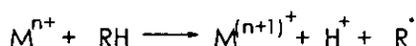
Los **fosfolípidos** presentes pueden actuar como antioxidantes al tener un efecto quelante sobre los metales, efecto que se ve favorecido por la facilidad que tienen éstos de interactuar con los hidroperóxidos formando polímeros inertes; sin embargo es de esperarse que los ácidos grasos poliinsaturados presentes en su estructura se oxiden con facilidad promoviendo con ello la rancidez (Frankel 1993).

En presencia de **metales de transición** como fierro, cobre y manganeso, entre otros, se ha observado una disminución en el período de inducción (Decker & Hultin 1992), algunos mecanismos que explican esta catálisis se han propuesto (Fennema 1993), y se presentan a continuación:

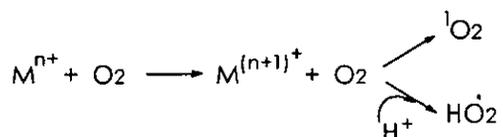
- 1.- Aceleración de la descomposición de los hidroperóxidos, generando nuevos radicales libres.



- 2.- Reacción directa con el sustrato no oxidado, produciendo el radical libre correspondiente.



- 3.- Activación del oxígeno molecular para dar oxígeno singlete y radicales peróxido.



Dentro de los metales que pueden actuar como prooxidantes en la carne destaca el papel del **hierro**, metal que se encuentra ampliamente distribuido en el tejido muscular, y cuya concentración varía entre tipos de músculo y especies (Tabla 6).

En el músculo, el hierro puede encontrarse libre como constituyente de una molécula de bajo peso molecular (NAD(P)H, AMP, ADP y ATP, amino ácidos o ácidos carboxílicos), o bien unido a proteínas como mioglobina (Mb) y hemoglobina (Hb) (Decker & Hultin 1990). Más del 90% del hierro soluble presente en el músculo se encuentra ligado a proteínas, y por lo general la res, cordero y cerdo presentan un mayor contenido de Mb que de Hb, presentándose el caso contrario en el pollo (Decker & Hultin 1992), ambas contribuyen con el 95.0, 86.1 y 67.6% del hierro soluble de res, cerdo y pollo respectivamente (Hazell 1982).

Tabla 5.

Concentración de hierro en el músculo de diversas especies		
µg Fe/g músculo		
Especie	Hierro soluble	Hierro libre "catalítico"
Vaca	20.0	0.7
Cerdo	3.6	0.2
Pollo	3.4	0.2
Pavo	-	0.9

(Hazell 1982)

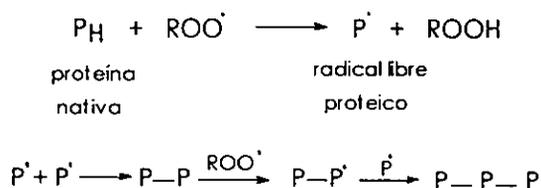
El hierro del grupo hemo, facilita la oxidación de los lípidos mediante la reacción hemoglobina-oxígeno que produce oxígeno singulete, o bien por exposición del hierro a consecuencia del desplegamiento que pueden sufrir las proteínas durante el almacenamiento en congelación (Decker & Hultin 1990). Sin

embargo parece ser que es el hierro libre el principal responsable de la catálisis en la oxidación lipídica (Hazell 1982) siguiendo cualquiera de los mecanismos propuestos antes presentados. La catálisis por hierro requiere de la presencia del ion ferroso (Fe^{2+}), por lo que además de la concentración de hierro depende de la presencia de sistemas o agentes reductores que promuevan la presencia del hierro en su forma reducida (Decker & Hultin 1990).

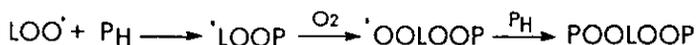
Los residuos de **amino ácidos** en presencia de radicales peróxido o compuestos de oxidación secundaria de los lípidos, pueden ser oxidados, siendo metionina, cisteína, histidina y lisina, los amino ácidos más susceptibles (Fennema 1993, Frankel 1993).

En los alimentos ricos en **proteína**, sometidos a almacenamiento en presencia de lípidos en proceso de oxidación, pueden presentarse enlaces cruzados covalentes inter o intramoleculares, la polimerización producto de estas interacciones, provoca cambios en la textura de la carne.

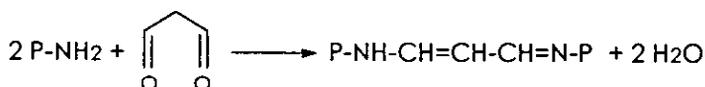
Se piensa que son dos los mecanismos involucrados (Fennema 1993); el primero de ellos, es inducido por la presencia de radicales alcoxilo ($\text{RO}\cdot$) y/o peróxido ($\text{ROO}\cdot$); que al interaccionar con las proteínas forman radicales libres proteicos ($\text{P}\cdot$), que se polimerizan fácilmente:



El segundo mecanismo, involucra la formación de un radical libre lípido-proteína, producto de la unión de radicales libres lipídicos ($\text{LOO}\cdot$) y proteínas nativas (P_H):



También, el MDA puede reaccionar con los grupos amino de los residuos de lisina, formando enlaces intermoleculares que pueden modificar algunas propiedades funcionales de las proteínas como solubilidad o capacidad de retención de agua.



En presencia de compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas derivados de la oxidación de los lípidos) se produce pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard, proceso que se ve favorecido durante la cocción liberando compuestos volátiles de aroma desagradable, disminuyendo la digestibilidad de la fracción proteica por la formación de melanoïdinas de color pardo o negro (Fennema 1993, Sanier 1992).

Pérdidas adicionales en el valor nutricional de los alimentos pueden presentarse como consecuencia del proceso oxidativo de los lípidos, en el caso del tejido muscular, considerado como una excelente fuente de vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina, B_6 , y B_{12}) en presencia de hidroperóxidos, peróxidos y epóxidos se promueve la oxidación de la vitamina B_{12} y tocoferoles (provenientes

de la dieta); algunos compuestos carbonílicos derivados de la descomposición de los peróxidos generan pérdidas en la vitamina B₆.

Por otro lado se sabe que existe cierta relación entre la oxidación de los pigmentos de la carne y la oxidación de los lípidos que no ha sido explicada del todo, sin embargo parece ser que una vez que la oxidación se ha iniciado en cualquiera de los dos componentes se estimula la oxidación del otro (Akamittach 1990). Por lo general se presenta una discriminación de la carne que ha perdido su color rojo característico, dado por la mioglobina oxigenada (Fe^{2+}) al oxidarse y generar metamioglobina (Fe^{3+}) (Brewer & Wu 1993).

4. Técnicas de Evaluación para el Análisis de Rancidez Oxidativa

Con el fin de evaluar el deterioro de los lípidos se han desarrollado diversos métodos tanto físicos como químicos, siendo necesario considerar las diferentes etapas en las que puede encontrarse el proceso oxidativo y la gran diversidad de compuestos generados, así como las características de la matriz alimenticia aunado al manejo y tipo de almacenamiento al que ha sido sometida, por lo que es recomendable, y en ocasiones necesario, realizar más de una determinación analítica para obtener la visión más amplia posible del estado que guardan los lípidos en la muestra (Ajuyah 1993).

Existen una gran diversidad de métodos empleado en la caracterización de los productos de oxidación, ya sean primarios o secundarios; en la carne y productos

cámicos, el método más común para monitorear la oxidación primaria es por medio de los cambios en el valor de peróxido, mientras que para los productos secundarios de la oxidación se recomienda el índice de TBA. La aplicación de otros ensayos como la determinación de ácidos grasos que monitorea los cambios en los ácidos grasos poliinsaturados, la determinación de carbonilos totales por medio de la 2,4-dinitrofenilhidrazina, el índice de anisidina que monitorea la generación de aldehídos, o el índice de Kreis entre otras, presenta el inconveniente de que algunas de estas pruebas no son específicas y/o presentan problemas en su interpretación al no existir valores de referencia, así como no presentar alta repetibilidad y/o reproducibilidad.

A continuación se describen los fundamentos de las determinaciones que para el caso del presente estudio se han seleccionado.

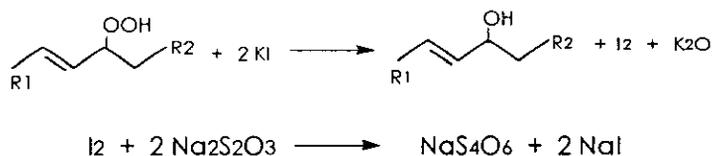
4.1 Índice de Peróxido

El índice de peróxido es una medida de la cantidad de peróxidos presentes en la muestra, el valor encontrado por medio de esta determinación constituye un indicativo del grado de deterioro en etapas tempranas del proceso oxidativo, ya que los peróxidos son los productos primarios más abundantes.

Durante esta determinación es importante tomar en cuenta que durante el almacenamiento la formación de peróxidos es lenta en un principio, durante el periodo de inducción, el cual puede variar desde unas semanas a varios meses dependiendo de la composición de la grasa evaluada y de las condiciones de

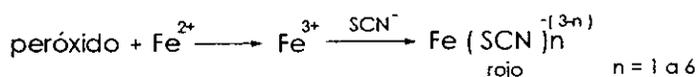
almacenamiento, hasta alcanzar un valor máximo, para posteriormente disminuir resultado de su descomposición.

El valor de peróxido puede ser determinando por medio de métodos volumétricos o bien por medio de técnicas colorimétricas. Usualmente se utiliza el procedimiento recomendado por la AOAC, método volumétrico basado en la reacción del yoduro de potasio, en solución ácida, con el oxígeno combinado en forma de peróxido, seguida de la titulación del yodo liberado con tiosulfato de sodio:



Esta determinación es base de la norma para aceites puros y mantecas que indica como límite de aceptabilidad un valor de 10.0 meq/kg grasa, sin embargo ha sido criticada argumentando que los valores obtenidos pueden ser bajos por presentarse liberación de yodo del yoduro de potasio al contacto con el oxígeno presente en la solución titulante, además de ser muy susceptible a variaciones en el tiempo y temperatura de reacción (Gray 1978).

Dentro de los métodos colorimétricos con sales ferrosas, se encuentra el método de Stine (Stine 1954), el cual mide la intensidad del color producto de la formación de un complejo de tiocianato férrico, según la siguiente reacción:



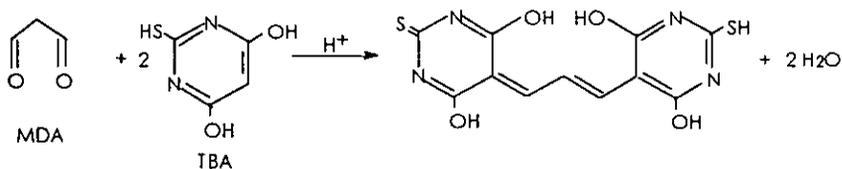
Este método es de los más utilizados dentro de los métodos fotométricos, teniendo como único inconveniente el hecho de que su estequiometría no ha sido explicada plenamente (Beerthel & Grosh 1974).

Al comparar ambas metodologías, se observa que la técnica recomendada por la AOAC transfiere dos electrones por cada peróxido, mientras que la técnica colorimétrica transfiere aproximadamente cuatro electrones (Beerthel & Grosh 1974). Estudios realizados en diversos productos cárnicos (Pikul & Kimmrou 1989) relacionan esta discrepancia en el número de electrones transferidos, estableciendo para estos productos un límite crítico de aceptabilidad de 5.0 meq/kg grasa extraída.

4.2 Índice de TBA

El índice del ácido tiobarbitúrico (TBA) es una de las determinaciones más utilizadas, ya que nos permite evaluar el grado de deterioro de los lípidos en etapas intermedias y avanzadas de la oxidación.

Los productos secundarios de oxidación del tipo MDA generan compuestos coloridos al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico, desarrollo de color se cree está



dado por la condensación de dos moléculas de TBA con una de MDA, que es uno de los productos secundarios más abundante del proceso oxidativo.

La prueba del TBA parece medir el deterioro tanto en lípidos extraídos de la matriz alimenticia, como en aquellos que se encuentran inmersos, se ha aplicado con frecuencia directamente en alimentos grasos particularmente en productos cármicos (Raharjo 1992, Salih 1987), en un destilado (Rhee 1978) o bien en un extracto del alimento (Witte 1970). A pesar de que la destilación es el método más utilizado, es preferible la utilización de métodos que no requieren aplicación de calor, ya que durante la destilación se promueve la descomposición térmica de los precursores de MDA, generando interpretaciones erróneas (Rhee 1978, Witte. 1970).

4.3 Índice de Kreis

El Índice de Kreis involucra la producción de un color rojo cuando el floroglucinol reacciona con la grasa oxidada en solución ácida, cuya intensidad aumenta con el deterioro (Egan 1988). Las sustancias responsables de la reacción son epoxialdehídos o sus acetales (Gray 1978), de acuerdo con Patton (Patton 1951) el color formado parece estar relacionado con la formación creciente de epihidrin aldehído (2,3-epoxipropanal), según este autor el MDA también puede reaccionar dando prueba positiva, lo cual la hace una prueba inespecífica, pero que relaciona bien el grado de oxidación de los lípidos.

La formación de los epóxidos, aparentemente involucrados, se da por resonancia de los radicales epóxido que presentan dobles ligaduras adyacentes, o

III. METODOLOGÍA

Trabajos realizados sobre diversos productos cármicos han llegado a la conclusión de que el disolvente empleado es un factor de gran importancia en la cuantificación de lípidos, así como en la determinación de los índices de oxidación, requiriéndose para cada alimento un tratamiento especial de acuerdo a sus características (Balarezo 1998, Donoso 1996, Hubbard 1977). En el caso de la carne de res, se recomienda el uso del método Bligh & Dyer para la extracción y cuantificación de los lípidos, empleando como disolvente la mezcla diclorometano:metanol (1:1), así como la utilización de dicha mezcla de disolventes en la determinación de índices de oxidación en procedimientos que requieran lípidos aislados de la matriz (Donoso 1996).

1. Selección y Preparación de la Muestra

Fue necesario seleccionar una muestra de carne que se comercialice y almacene bajo condiciones de congelación y cuyo contenido de grasa sea alto; poniéndose en consideración los cortes Sirlón y New York.

Las piezas de carne, cuyo peso osciló alrededor de 300g, una vez hecha la selección, se empaquetaron individualmente de manera comercial, utilizando charolas de poliestireno y cobertura de PVC (PVC[®], transferencia de oxígeno: 5000 cc/m² x 24h); las muestras así preparadas se almacenaron a $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (0°F), durante un tiempo aproximado de 10 meses.

2. Seguimiento del Deterioro Oxidativo

Se realizó a través de la determinación y monitoreo de productos de oxidación primarios y secundarios, mediante :

- a) Índice de Peróxidos, por el método colorimétrico (Egan 1988, Stine 1954).
- b) Índice de TBA (Brewer 1992, Witte 1970).
- c) Índice de Kreis (Hart 1991, Pool & Prater 1974).

Determinaciones cuya utilización en diversos productos cárnicos, así como las modificaciones hechas a los procedimientos han sido validadas en los trabajos de Donoso 1996 y Balarezo 1998, en los que también se pone de manifiesto que, la determinación de estos productos de oxidación permiten su en conjunto obtener una visión clara del proceso oxidativo de los lípidos inmersos en la carne.

Los procedimientos empleados en el presente trabajo se encuentran descritos en el Apéndice A.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Selección y Preparación de la Muestra

Los cortes Sirlón y New York, considerados para la realización de esta primera etapa del estudio, provienen de los músculos de las patas traseras de la res (cuadriceps), y se caracterizan por ser jugosos, tiernos, grasos, y no presentar tejido conjuntivo intermuscular.

Con el fin del facilitar el manejo de la muestra así como la extracción del material lipídico se buscó contar con piezas cuyo contenido de grasa fuera alto; gracias a la información contenida en la Tabla 6, podemos observar que dependiendo del lugar de adquisición, la cantidad de lípidos totales determinada ex-

Tabla 6.

Contenido de grasa de los cortes Sirlón y New York, obtenido experimentalmente ^a				
(g / 100g carne) ^b				
Determinación	Sirlón ^c	New York ^c	Sirlón ^d	New York ^d
1	6.51	7.15	5.43	10.47
2	6.22	7.79	5.84	10.21
3	6.97	7.09	6.7	9.71
4	6.14	7.56	5.98	10.20
prom.	6.46 ± 0.37	7.39 ± 0.33	5.98 ± 0.53	10.14 ± 0.31

a. Método Bligh & Dyer, disolvente diclorometano metanol (1:1).

b. Contenido de humedad promedio 73.5 ± 0.36 g agua/ 100 g carne.

c. Lugar de adquisición Tienda UNAM (Av. Dalias, Cd. Universitaria).

d. Lugar de adquisición autoservicio Sumesa (Av. Revolución # 1816, Sn. Ángel).

perimentalmente varía notoriamente, lo cual obedece entre otras cosas a la cantidad y tipo de alimento ingerido por el animal durante su crianza así como por la preparación que cada expendio comercial destina a los cortes.

La inclusión de estos datos nos permite justificar tanto el corte seleccionado como el lugar de adquisición de la muestra; teniendo como parámetros de decisión el mayor contenido de grasa presentado por el corte New York procedente del autoservicio Sumesa (Av. Revolución #1816), así como la disponibilidad del corte efectuándose en dicho lugar, y en un solo tiempo la adquisición y preparación de la totalidad de muestra requerida para llevar a cabo el seguimiento del deterioro oxidativo de los lípidos.

2. Seguimiento del Deterioro Oxidativo

En la Tabla 7, se presentan los datos obtenidos a través del monitoreo de los productos de oxidación de los lípidos presentes en la carne de res (corte New York), muestra que como se mencionó con anterioridad se mantuvo almacenada bajo condiciones de congelación a una temperatura de $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (0°F) empaquetada de manera comercial (charola de poliestireno y cobertura de PVC), por espacio de 300 días.

A través del índice de peróxidos, se obtiene un indicio del estado de la muestra en las etapas tempranas del proceso oxidativo; ya que estos son los productos primarios de la oxidación, puede observarse (Gráfico 1) que durante el periodo comprendido entre los 0 y 45 días, estos compuestos comenzaron a formarse lentamente (periodo de inducción), y una vez alcanzada cierta concentra-

Tabla 7.

Evolución de los índices de oxidación de los lípidos de carne de res (corte New York), almacenada a una temperatura de -18°C																	
Parámetro	Tiempo de almacenamiento (días)																
	0	15	30	45	60	105	135	150	165	180	195	210	225	240	255	270	300
% GRASA	10.870	10.354	11.536	11.109	12.744	10.168	11.617	10.103	11.956	8.152	10.403	14.318	10.210	11.417	12.031	12.426	10.885
I. PERÓXIDOS (mg/kg grasa)	0.107	2.509	3.639	5.848	9.687	17.993	21.197	24.574	27.360	38.136	40.983	43.600	49.892	39.626	26.915	23.431	24.230
I. TBA (mg MDAt/kg muestra)	0	0	0	2.033	2.609	2.984	3.953	4.261	5.044	6.483	6.859	7.114	7.713	10.102	11.381	15.099	14.995
I. KREIS (índice/g grasa)	0	0	0	0	0.620	1.825	2.208	2.451	2.604	2.788	3.686	3.622	3.642	6.403	6.444	8.916	13.206
% T	89.6	89.5	87.0	82.9	68.1	66.7	65.6	65.3	64.9	64.7	64.3	64.1	63.7	43.4	43.1	35.6	21.0

ción, se dispara la reacción en cadena, momento que se puso de manifiesto con el rápido incremento que se observa entre los 45 y 105 días de almacenamiento aumentando el valor de peróxidos de 5.84 a 17.99 meq/kg grasa.

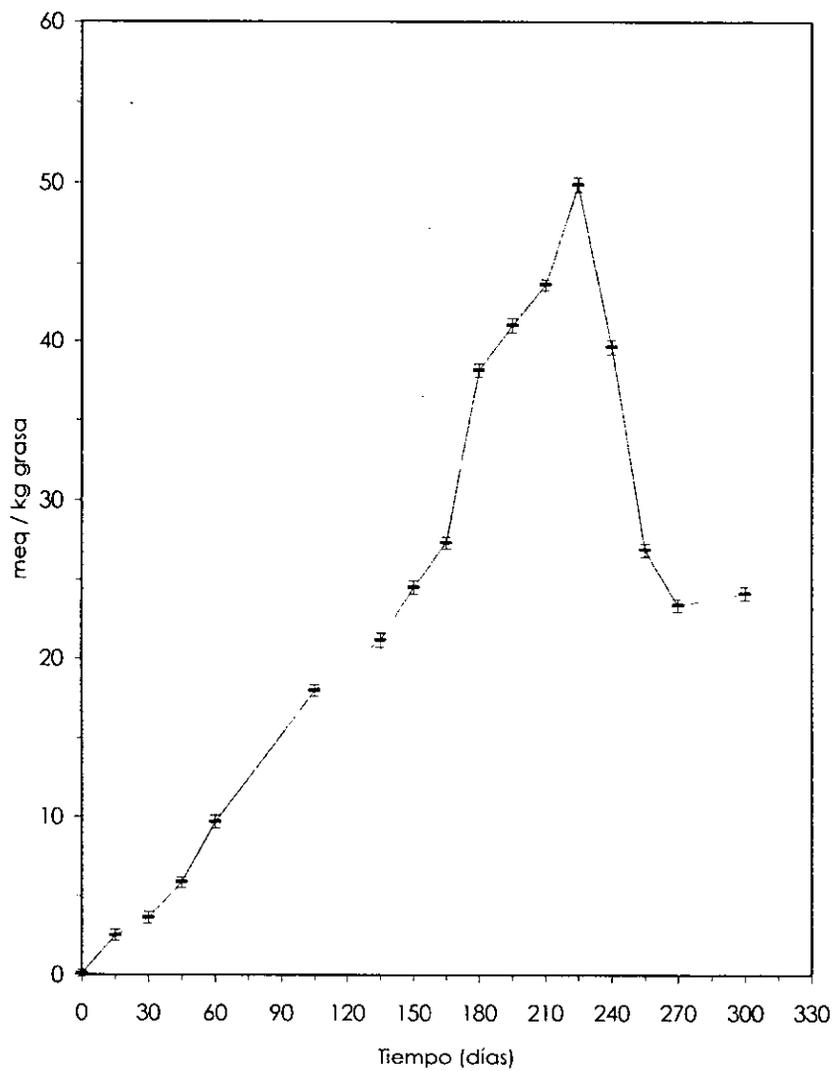
Conforme transcurre la formación de los peróxidos, pueden verse favorecidas interacciones entre estos compuestos altamente reactivos y otros componentes de la matriz como sucede con las proteínas, la polimerización producto de estas interacciones modifica la textura y propiedades fisicoquímicas de la carne. La unión de los peróxidos a otros compuestos impide su determinación, resultando en un lento incremento en el valor de peróxidos (periodo comprendido entre los 105 y 175 días); sin embargo una vez que los sitios de interacción (al menos los más accesibles) han sido ocupados, podrá presentarse una mayor acumulación de estos productos de oxidación como se observa transcurridos 180 días de monitoreo, al alcanzar un valor de 38.14 meq/kg grasa, siendo que 15 días antes este valor fue de 27.36 meq/kg grasa.

El incremento en el valor de peróxidos de la muestra continuó hasta alcanzar un valor máximo de 49.89 meq/kg grasa, obtenido 225 días después de haberse iniciado el estudio, a partir de este momento, consecuencia del cambio en la velocidad de descomposición de los peróxidos que comienza a ser superior a la formación, se observa un paulatino decremento en el índice de peróxidos.

Por otro lado, la AOAC acepta como límite de aceptabilidad para aceites puros y mantecas comestibles un valor de peróxidos de 10.0 meq/kg grasa, de acuerdo con lo cual la muestra se encuentra fuera de especificación entre los 60 y 105 de almacenamiento al pasar de 9.68 a 17.99 meq/kg de grasa. Otros autores han encontrado que la mayoría de las muestras de carne presentan como límite crítico

Gráfico 1.

OXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN CARNE DE RES.
Índice de Peróxidos.
Almacenamiento a -18°C .



de aceptabilidad un valor de peróxidos de 5.0 meq/kg grasa extraída (Pikul & Kimmemrou 1989), al observar el gráfico correspondiente, se observa que dicho límite fue rebasado por las muestras de New York al cumplirse 45 días de almacenamiento, alcanzado un número de peróxido de 5.848 meq/kg grasa, considerándose a partir de este momento fuera de especificación. El empleo de distintos procedimientos en la determinación del valor de peróxido es la principal causa de discrepancia en los límites de aceptabilidad, ya que mientras el método oficial transfiere 2 electrones por cada peróxido, la técnica colorimétrica, empleada en el presente trabajo, transfiere aproximadamente 4 electrones, sin embargo este último procedimiento tiene ventaja de ser más rápido y presentar una mayor reproducibilidad y repetibilidad al no ser tan susceptible al tiempo y temperatura de reacción como lo es el método volumétrico.

Pikul & Kimmemrou, mencionan también, que al superarse los 5.0 meq/kg grasa aunada a la presencia de productos de oxidación secundarios, pueden originarse, durante la cocción de la carne, olores y/o sabores típicamente rancios perceptibles a los consumidores, pudiéndose también formar melanoidinas que disminuyen el valor nutritivo y digestibilidad de las proteínas, con lo que la calidad del producto habrá disminuido notoriamente. En el caso de la carne de res, por medio de la determinación del índice de TBA, los productos de oxidación secundarios del tipo MDA, se hicieron presentes transcurridos 45 días de almacenamiento (2.033mg MDA/kg muestra), coincidiendo con la superación del límite crítico de aceptabilidad de peróxidos establecido por Pikul & Kimmemrou, por lo que puede pensarse que estas muestras serán rechazadas al momento de ser preparadas para su consumo si llegasen a ser adquiridas por los consumidores con tal estado de deterioro en su fracción lipídica.

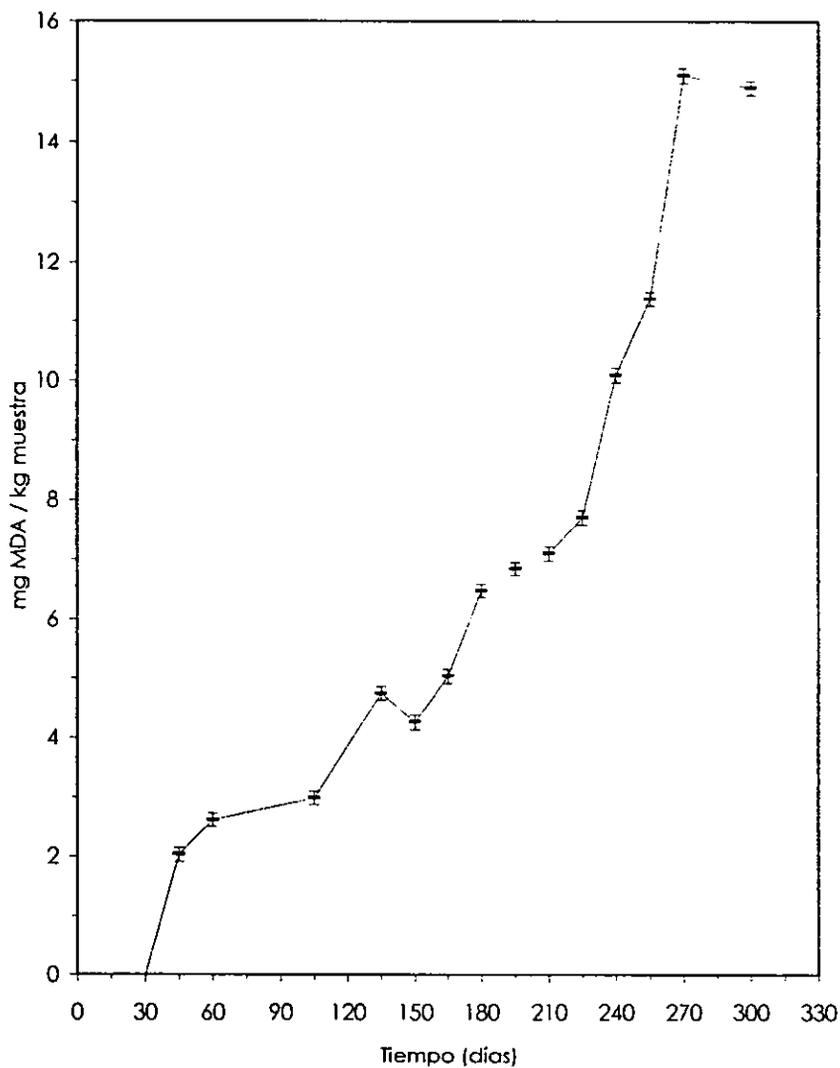
En el gráfico correspondiente al índice de TBA (Gráfico 2), se observa que una vez que estos compuestos comenzaron a formarse (habiendo transcurrido mes y medio), se presentó un continuo incremento en la cantidad de MDA presente, sin embargo la magnitud del cambio en el número de TBA fue mayor a partir del sexto mes y hasta el noveno, a pesar de que al inicio de este periodo no se había establecido la etapa de franca descomposición de los peróxidos, lo cual ocurrió transcurridos 240 días de almacenamiento.

Conforme la velocidad de descomposición de los peróxidos superó la de formación, se presentó un mayor incremento en número de TBA, como el observado entre los 225 y 240 días pasando de 7.713 a 10.102 mg MDA/kg muestra. De acuerdo con la literatura, es la descomposición de radicales peróxido con un doble enlace β - γ con respecto al carbono que sustenta al grupo peróxido la responsable mayoritaria de la formación del MDA y del aumento en el número de TBA, sin embargo es posible que a través de diversas vías, se de la formación de otros compuestos que pueden interaccionar con el ácido tiobarbitúrico de manera similar al MDA como ocurre con ciertos dialdehidos, contribuyendo de esta manera al incremento observado que coincide con periodo de mayor descomposición de los peróxidos.

Entre los 105 y 175 días, previo al periodo de mayor descomposición de los peróxidos, el índice de TBA muestra un comportamiento errático, debido muy probablemente a que el MDA es sumamente reactivo y puede encontrarse interactuando con otros componentes de la matriz especialmente con proteínas y/o amino ácidos libres, el establecimiento de enlaces covalentes con estos compuestos imposibilita su estimación a través de la prueba de TBA, además durante este periodo de tiempo se mencionó que de los peróxidos podrían encon-

Gráfico 2.

OXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN CARNE DE RES.
Índice de TBA.
Almacenamiento a -18°C



trarse interactuando con otros componentes de la matriz, lo que impediría su descomposición y con ello la formación de MDA contribuyendo de esta manera al comportamiento errático observado.

Resulta imprescindible mencionar que una vez establecidos valores superiores a los 10mg MDA/kg muestra, habiendo transcurrido 240 días de almacenamiento, una vez descongelada la carne, presentó una apariencia seca a la vez que liberó un gran contenido líquido por goteo, esta modificación en la textura y pérdida de la capacidad de retención de agua, bien pueden asociarse a la desnaturalización de proteínas provocada por el aumento en la fuerza iónica debida a la congelación, así como al establecimiento de enlaces intra e intermoleculares en las proteínas, enlaces que son facilitados por la presencia de MDA.

El decremento en la calidad de la muestra continuó, ya que a lo largo del tiempo de monitoreo, el cual abarcó 300 días de almacenamiento en congelación, habiendo alcanzado la muestra un número de TBA de 15.099 mg MDA/kg muestra, fue evidente la presencia de compuestos de bajo peso molecular que daban una nota típicamente rancia, perceptible a la simple manipulación de la carne, observándose también, una evidente modificación en su apariencia al tomarse café oscuro consecuencia del cambio en el estado de oxidación del fierro en los pigmentos cármicos.

Hacia el final del monitoreo, el valor de MDA en la muestra parece estabilizarse, sin embargo de haberse continuado el tiempo de almacenamiento se observaría un repunte en el valor de TBA, además hay que considerar que en la carne la grasa no se encuentra uniformemente distribuida lo que genera zonas en las que el proceso oxidativo se presenta con mayor intensidad y rapidez, debido a

un mayor contenido de ácidos grasos insaturados y/o a una mayor difusión de oxígeno. La medida promedio de la zonas con mayor expresión en los índices de oxidación aunada a la de otras zonas en la que el proceso puede verse retardado podría en un momento dado indicar un menor grado de deterioro, es por ello que el uso de una prueba única en la determinación del grado de oxidación de los lípidos en matrices complejas como la carne no es recomendable.

Por otro lado, el seguimiento de otro tipo de productos secundarios de la oxidación mediante la prueba de Kreis, nos permite determinar que la muestra en su fracción lipídica se encuentra oxidada, y susceptible de ser rechazada a partir de los 60 días de almacenamiento, momento en que por primera vez se obtuvo respuesta positiva a la reacción de Kreis, presentando un valor de 0.62 unidades Kreis por gramo de grasa.

En el Gráfico 3, correspondiente al índice de Kreis, puede observarse un comportamiento similar al presentado por el índice de TBA, al presentar un notable incremento al cumplirse los 240 días de almacenamiento, pasando de un valor de 3.642 unidades Kreis por gramo a los 225 días, a un valor de 6.403. El decremento en el índice de peróxido, debido a la interacción de los productos primarios de la oxidación con las dobles ligaduras de otros componentes de la matriz, puede generar un incremento en la concentración de epóxidos, y en el valor de Kreis de la muestra.

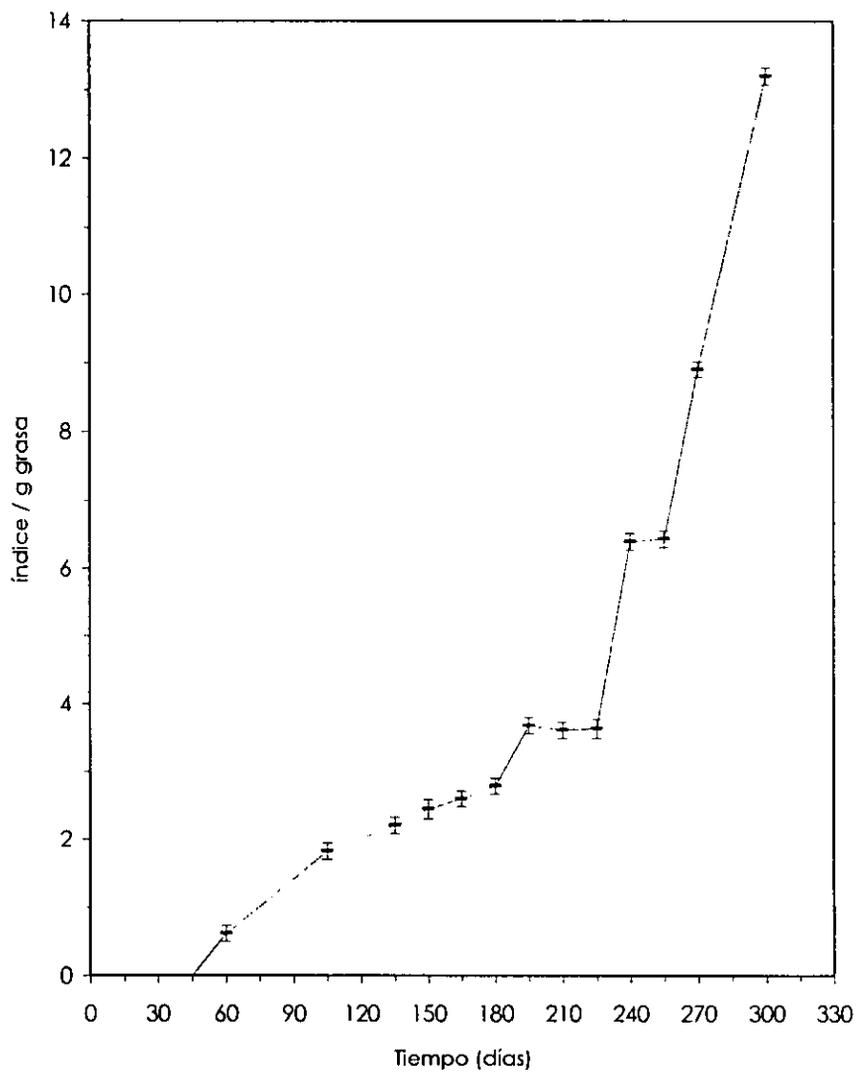
Por otro lado, y de acuerdo con Pool y Prater (Pool & Prater 1947), los valores de transmitancia (Tabla 7) pueden ayudar a determinar la intensidad con la que los lípidos se encuentran oxidados en la muestra; de acuerdo con lo cual, valores inferiores al 70% denotan enranciamiento en la muestra, como se mencionó con an-

Gráfico 3.

OXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN CARNE DE RES.

Índice de Kreis.

Almacenamiento a -18°C.



terioridad la muestra analizada dio por primera ocasión prueba positiva a los 60 días, correspondiéndole un valor de transmitancia de 68.1%. Los valores inferiores al 60% que denotan enranciamiento incipiente, comenzaron a presentarse entre los 225 y los 240 días, momento en que la transmitancia pasó de 63.7 a 43.4%, observándose una modificación en la textura y pérdida de retención de agua, asociada a la desnaturalización de las proteínas, así como al establecimiento de enlaces intra e intermoleculares entre las proteínas.

El enranciamiento intenso que se alcanzaría con valores cercanos o inferiores al 10% de transmitancia, no llegaron a presentarse a lo largo de los 300 días de almacenamiento, cuando se obtuvo un valor de 21.0%, pero seguramente, se habría alcanzado dicho intervalo de valores de haberse continuado con el monitoreo, ya que esta es la tendencia mostrada en el gráfico correspondiente; en este punto era evidente la pérdida de las características físicas de frescura de la carne, al verse modificados color, textura y aroma.

Es importante aclarar que lo anteriormente expuesto, fue analizado según el trabajo de Pool y Prater, antes citado, y debe ser interpretado con precaución ya que a pesar de haberse seguido la misma metodología y sugerencias de los autores, como el uso de una concentración de 0.05 a 0.07 g grasa/ml en el ensayo, pueden presentarse variaciones en los resultados que modifiquen su interpretación, ya que la concentración de grasa afecta directamente los valores de transmitancia obtenidos.

Finalmente resulta interesante comparar el comportamiento presentado por la carne de res analizada en este trabajo, con los resultados encontrados para pollo (entero) y cerdo (chuleta) por Balarezo (Balarezo 1998) quien trabajó bajo

condiciones de almacenamiento similares a las del presente trabajo, es decir, temperatura de $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y empaque comercial. De acuerdo a sus resultados, el índice de peróxidos, en pollo rebasó los 5.0 meq/kg grasa entre los 215 y 236 días de almacenamiento al pasar de 4.92 a 19.67 meq/kg grasa, mientras que en el caso de cerdo esto se presentó entre los 77 y 114 días pasando de 0.48 a 8.36 meq/kg grasa, comportamiento que resulta extraño si se considera que tanto el cerdo como el pollo presentan un mayor contenido de ácidos grasos insaturados que la res (67.7, 58.5 y 53.1% en pollo, cerdo y res respectivamente), lo que las haría especies más susceptibles al deterioro oxidativo.

Algo similar ocurrió con el índice de Kreis, en el que, tanto el pollo como el cerdo presentaron prueba positiva a partir de los 77 días de almacenamiento, mientras que en la carne de res esto ocurrió a partir de los 60 días.

Parece ser que esta presencia de compuestos de oxidación más pronta, y a niveles más elevados a tiempos iguales, puede asociarse al mayor contenido de hierro en el músculo de res, el cual como se analizó con anterioridad, presenta un efecto prooxidante al disminuir el periodo de inducción y favorecer la descomposición de los peróxidos; adicionalmente a ello podría considerarse otro factor, que es el mayor contenido de grasa intramuscular en la carne de res (1.14-2.99 y 2-4% en pollo y res respectivamente), la cual es rica en fosfolípidos y ácidos grasos poliinsaturados que favorecen el proceso oxidativo. Sin embargo también hay que considerar que las muestras de pollo y cerdo manifestaron la presencia de peróxidos una vez transcurridos 46 días de almacenamiento, mientras que la carne de res, desde tiempo cero presentó un valor de 0.107 meq /kg grasa (valor que de acuerdo con Pikul & Kimmemrou se encuentra dentro del intervalo de muestras frescas: 0.0-0.15 meq/kg grasa extraída), lo cual puede indicar que efectivamente el

fierro tiene un efecto prooxidante en la carne de res, y/o que las muestras pudieran haber permanecido previa a su adquisición almacenadas algunos días en la tienda.

Por otro lado, diversos autores han publicado tiempos recomendados de almacenamiento en congelación, para la carne fresca, en los que presumen el mantenimiento de la calidad óptima bajo diversas condiciones de temperatura; sin embargo estos tiempos no coinciden con lo encontrado para el pollo y cerdo a una temperatura de $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por Balarezo, quien sugiere un tiempo menor de almacenamiento de 77 días (aproximadamente 2 meses y medio) a diferencia de los 4 meses sugeridos por Forrest (Forrest 1987), o los 45 días (mes y medio) sugeridos para la res en el presente trabajo con los 6 meses indicados en la literatura.

Es cierto que dependiendo de la especie, raza y tipo de alimentación proporcionada a los animales, se puede modificar la composición de los lípidos presentes en la carne, incorporándose a la dieta algún compuesto con actividad antioxidante (vitamina E y D) que provoque una susceptibilidad diferente de los lípidos frente a la oxidación, no obstante parece ser evidente que es el incremento en la superficie expuesta, tanto a la luz como al oxígeno la principal fuente de variación; al utilizar carne en cortes se provoca un aumento en la velocidad de oxidación debido a que la difusión de oxígeno es facilitada en comparación a lo que ocurre en medias o canales enteras.

Lo anterior no explica lo encontrado para el pollo (evaluado en animales enteros) por lo que pueden considerarse otro factor como el tipo de empaque, ya que los datos referentes al tiempo recomendado de almacenamiento en congelación a diversas temperaturas, mencionados anteriormente, no indican el

material de empaque empleado, sin embargo al hacer referencia a media canales y animales enteros en el caso de las aves, es de suponer el empleo de materiales de empaque comunes en la distribución al mayoreo, la cual logra extender la vida útil de la carne al reducir la tensión superficial de oxígeno al empaquetar al vacío y proporcionar una barrera protectora contra este. Uno de los materiales de empaque empleados con mayor frecuencia en la distribución al mayoreo son las bolsas de EVA-LDPE (polímero formado por etilen-vil-acetato y polietileno de baja densidad) este material por ejemplo presenta una transferencia de oxígeno (GTR de sus siglas en inglés) de 515-645 cc/100 in² en 24 horas,

A diferencia del empaque comercial empleado en la distribución al menudeo el cual individualiza a las piezas de tal forma que pueden ser cómodamente adquiridas y utilizadas por los consumidores, procurando además una apariencia atractiva, para lo cual se requiere conservar el color rojo brillante que caracteriza a la carne fresca; el uso de PVC en este tipo de empaques es casi universal, ya que este polímero presenta una GTR adecuada (1000-1500 cc/100 in² en 24 horas) para mantener a la Mb en forma oxigenada (OMb), sin embargo la presencia de oxígeno en el interior del empaque en contacto con la carne favorece el deterioro oxidativo, limitando el tiempo de vida útil.

V. CONCLUSIONES

- De acuerdo con la norma para aceites puros y mantecas, que permite como valor límite de peróxidos 10meq/kg de grasa, la muestra de res (corte New York) se encuentra fuera de especificación entre los 60 y 105 días de almacenamiento en congelación a una temperatura de -18°C , mientras que si se considera el límite establecido por Pikul y Kimmemrou, 5meq/kg de grasa extraída, se encuentra fuera de especificación a partir de 45 días bajo las mismas condiciones de preservación.
- Bajo condiciones de congelación a una temperatura de -18°C , la carne de res (corte New York), corre el riesgo de presentar olores y/o sabores desagradables, típicamente rancios, perceptibles al momento de ser cocinado transcurridos 45 días de almacenamiento.
- Puede considerarse, que la carne de res presenta un estado de oxidación en su fracción lipídica tal que la hace susceptible al rechazo por aplicación de la prueba cualitativa de Kries, a partir de 60 días de almacenamiento a una temperatura de -18°C .

- La aplicación de la prueba cuantitativa de Kreis resultó útil en la estimación de la intensidad de oxidación de los lípidos en la muestra. Al presentarse el enranciamiento incipiente (transcurridos 240 días) se observó una modificación en la textura así como pérdida en la retención de agua, asociada a la desnaturalización de las proteínas debida a la congelación y al establecimiento de enlaces intra e intermoleculares. Hacia el final del monitoreo, y a pesar de no establecerse el enranciamiento intenso, fue evidente la presencia de una nota típicamente rancia, perceptible a la simple manipulación de la muestra, aunado a un color café opaco y apariencia seca y fibrosa en la carne.
- Se recomienda para el caso de la carne de res (New York y cortes grasos similares) un periodo de almacenamiento menor a los 45 días a una temperatura de -18°C , ya que la congelación parece no afectar de manera significativa la oxidación de los lípidos durante este periodo; si se sobrepasa este tiempo la carne todavía será comestible, pero sus características sensoriales tales como aroma, color y jugosidad habrán decaído, lo mismo que su valor nutritivo.
- La muestra de carne de res (corte New York) presentó un proceso oxidativo más acelerado que el encontrado por Donoso en muestras de cerdo y pollo, bajo las mismas condiciones de almacenamiento, comportamiento

que puede atribuirse a la mayor concentración de hierro en el músculo de res, aunada a la presencia de un mayor contenido de grasa intramuscular.

- El comportamiento errático de malonaldehído presente en la muestra, medido a través del índice de TBA sugiere que no debe ser aplicada como prueba única en la determinación del proceso oxidativo de los lípidos, ya que puede dar pie a interpretaciones erróneas, sugiriéndose por ello la aplicación de por lo menos dos determinaciones que permitan obtener una visión más amplia y clara del estado que guardan los lípidos en la muestra.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Ajuyah, A.O., Fenton, T.W., Hardin, R.T., & Sin J.S. 1993. Measurin Lipid Oxidation Volatiles in Meats. J. Food Sci. 58:2 270-273.
2. Akamittath, J.G., Brekke, C.J. & Sxhanus, E.G. 1990. Lipid Oxidation and Color Stability in Restructured Meat Systems During Frozen Storage. J. Food Sci. 55:6 1513-1517.
3. AOAC. 1995. International Official Methos os Analysis. 16th. editon. AOAC International. USA.
4. Balarezo, Priscila. 1998. Deterioro Químico de Lípidos en Carne de Cerdo y Pollo en Congelación. Facultad. Química. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Tesis para maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
5. Beerthel, G. & Grosh, W. 1974. Peroxide Value Determinacion - Comparison of Some Methods. J. Am. Oil Chemist's Society. 51: 540-544.
6. Bower, J. 1992. Food Theory and Application: Processing Conditions and Practices. Macmillon, Inc. Second Edition.
7. Brewer, M.S., Ikins, G.W. & Harbers, A.C. 1992. TBA Values, Sensory Characteristics, and Volatiles in Ground Pork During Long-Term Frozen Storage: Effects of Packaging. J. Food Sci. 57: 558-563, 580-585.
8. Brewer, M.S. & Wu, S.Y. 1993. Display, Pakaging, and Meat Block Location Effects on Color and Lipid Oxidation of Frozen Lean Ground Beef. J. Food Sci. 58:6 1219-1223.
9. Chan, H. 1987. Autoxidation of Unsaturated Lipids. Academic Press Inc. USA.
10. Decker, A.E. & Hultin, O.H. 1990. Nonenzymic Catalysts of Lipid Oxidation in Mackerel Ordinary Muscle. J. Food Sci. 55:4 951-953.
11. Decker, A.E. & Hultin O.H. 1992. Lipid Oxidation in Muscle Foods Via Redox Iron. In Lipid Oxidation in Food. Publish by American Chemical Society.

12. Donoso, Silvana. 1996. Evaluación de Deterioro Químico en Carne de Res y Pescado Congelados. Facultad. Química. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Tesis para maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
13. Egan, H., Kirk R. & Sawyer R. 1988. Análisis Químico de los Alimentos de Person. Ed. Continental. México.
14. Fennema, Owen y col. 1993. Química de los Alimentos. Ed. Acribia, S.A. España
15. Food Processing: Meat: Meat Microbiology, Safety, and Storage: Preservation and Storage. Britannica on line. <http://www.eb.com/180/cgi-bin/g?DocF=macro/5002/39/99.html>.
16. Forrest, J. y col. 1987. Fundamento de la Ciencia de la Carne. Acribia, S.A. España.
17. Frankel, E.N. 1993. Recent Advances in the Chemistry of Rancidity of Fats. In Recent Advances in the Chemistry of Meat. Publish by ARC Meat Research Institute, Langford Bristol. Edited by Allen Bailey.
18. Gray, J.I. 1978. Measurement of Lipid Oxidation: A Review. J. Am Oil Chem. Sc. 55: 539-546.
19. Hagan, S. et al. 1967. Meat and Meat Products. Extration of Lipids From Raw-Beef Lean by Using Various Solvents Systems. J. AOCS. 50:2 250 - 255.
20. Hart, L. 1991. Análisis Moderno de los Alimentos. Ed. Acribia, S. A. España.
21. Hazell, T.J. 1982. J.Sci. Food Agric. 33 : 1049 - 1056.
22. Hotchkiss, H.J. 1996. Packaging Muscle Foods. In Muscle Food: Meat, Poultry an Sea-food Technology. Chapman and Hall. London.
23. Hubbard, W.D. 1977. Comparison of Various Methods for the Extraction of Total Lipids, Fatty Acids, Cholesteron and Other Sterols from Food Products. JAOCS 54 81-83.
24. Kanner, Joseph. 1992. Mechanism of Nonenzymic Lipid Peroxidation in Muscle Foods. Departmen of Food Science, Agricultural Reserch Organization, Israel.
25. Labuza, T. 1971. Kinetics of Lipid Oxidation in Foods. Food Technol. 32: 355-405.

26. Lawrie, R.A. 1991. Meat Science. 5th. Edition. Pergamon Press. England.
27. Lundberg, O. Walter. 1962. Mechanisms in Lipids and their Oxidation. In Oxidative Rancidity in Food Fats and its Prevention. Ed. The AVI Pub. Co. Engalnd
28. Mitchell, J.H. & Henick, A.S. Rancidity in Food Products. Chapter 13 (547-557)
29. Patton, S., Keeney, M. & Kurtz, G.W. 1951. Compounds Producing the Kreis Color Reaction with Particular Reference to Oxidized Milk Fat. J. AOCS. 28: 391.
30. Pearson, D. 1993. Técnicas de Laboratorio para el Análisis de Alimentos. Ed. Acribia. España.
31. Pikul, J. & Kimmemrou, F.A. 1989. Evaluation of Peroxide Number and TBA Values for Measuring Lipid Oxidation in Meat. J. Am. Oil Chemists Society 35:390.
32. Pool, M.F. & Prater, A.N. 1945. Oil and Soap 22 215.
33. Raharjo, S., Sofos, N.J. & Schmidt, R.G. 1992. Improved Speed, Specificity, and Limit of Determination of an Aqueous Acid Extractive Thiobarbituric Acid-C18 Method For Measuring Lipid Peroxidation in Beef. J. Agric. Food Chem. 40: 2182 - 2185.
34. Rhee, Ki Soon. 1978. Minimization of Further Lipid Peroxidation in the Distillation 2-Thiobarbituric Acid Test of Fish and Meat. J. Food Sci. 43: 177-1778
35. Riëtte, M. van Laak. 1996. Spoilage and Preservation of Muscle Foods. In Muscle Food: Meat, Poultry and Sea-food Technology. Chapman and Hall. London.
36. Salih, A.M., Smith, D.M., Price, J.F. & Dawson, L.E. 1987. Modified Extraction 2-Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Oxidation in Poultry. Poultry Sci. 66:1483-1488.
37. Smith, D.M. 1987. Functional and Biochemical Changes in Deboned Turkey due to Frozen Storage and Lipid Oxidation. J. Food Sci. 52 : 22.
38. Stine, C.N., Harlanda, H.A., Coulter, S.T. & Jenness, R. 1954. Determination of Rancidity in Lipids. J. Dairy Sci. 37: 202.

-
39. Vercellotti, J.R., Allen, J. St. Angelo & Spanier, M.A. 1992. Lipid Oxidation in Foods: An overview. In Lipid Oxidation in Food. Publish by American Chemical Society.
 40. Walters & Bramlage, W. 1992. Modified Kreis Assay for Measurin Lipid Oxidation in Sugar-rich Plant Tissie Extracts. J. Agric. Food Chem. 40:9 1566 - 1570.
 41. Witte, V.C., Krause, G.F. & Bailey, M.E. 1970. A New Extraction Method for Determining 2-Tiobarbituric Acid Values of Pork and Beef Durin Storage. J. Food Sci. 35: 582-585.
 42. Zbignieco, Gruda. 1987. Tecnología de la Congelación de los Alimentos. Ed. Acribia, S.A. España.

VII. APENDICE A

1. Extracción y Cuantificación del Material Lipídico

1.1 Método Bligh & Dyer (Egan 1988).

Pesar de 2 a 20 g de la muestra previamente homogeneizada, es necesario primero determinar el contenido de humedad de la misma, ya que se debe adicionar agua destilada para llevar el contenido de agua total hasta 16 ml. Posteriormente se adicionan 40 ml de metanol y 20 ml de diclorometano. Se macera la muestra por espacio de 2 min; al término de la maceración se adicionan otros 20 ml de diclorometano y se procede a homogeneizar la muestra a alta velocidad por 10 s haciendo uso de un homogenizador (Waring Commercial); finalmente se agregan 20 ml de agua destilada y se vuelve a macerar por 30 s.

Para separar los disolventes, se centrifuga por espacio de 5 min a 5000 rpm, la fase de diclorometano se recupera para filtrarla a través de papel filtro grueso (Watman # 4).

Las modificaciones que se hicieron al método original consistieron en modificar el cloroformo por diclorometano, así como llevar la homogeneización de la muestra en presencia del par de disolventes (Donoso 1996, Hagan 1967).

Para llevar acabo la cuantificación del material lipídico, se coloca el filtrado en un vaso de precipitados a peso constante, evaporándose el disolvente haciendo uso de una parrilla eléctrica a baja temperatura hasta sequedad, se completa el secado en estufa al vacío.

2. Evaluación del Deterioro Oxidativo

2.1. Índice del Peróxido. Método colorimétrico (Egan1988, Stine 1954).

Pesar entre 1 mg y 300 mg de muestra de grasa (m) en un tubo de ensayo, disolver en 9.9 ml de diclorometano:metanol (70:30), adicionar 0.05 ml de tiocianato de amonio (30% m/v), mezclar y medir absorbancia a 500 nm esta primera lectura será E₀ (se utiliza como blanco la mezcla de disolventes diclorometano:metanol (70:30). Posteriormente se adicionan 0.05 ml de la solución de cloruro ferroso 0.35% (m/v), que contiene un 2% de HCl 10 N, después de 5 min se mide la absorbancia siendo esta lectura E₁, utilizándose en este caso un blanco de reactivos.

Para determinar el índice de peróxido se hace uso de la siguiente fórmula:

$$I \text{ Peroxidos} = \frac{mg \text{ Fe}}{55.84 \times m} = meq/kg \text{ grasa}$$

Para obtener los mg de Fe es necesario realizar la sustracción de absorbancias $Abs = E_1 - E_0$ la absorbancia resultante se interpola haciendo uso de los datos obtenidos en la curva de calibración (Barthel & Grosh 1974).

Para preparar la curva de calibración, se prepara una solución patrón de cloruro férrico de 20 ppm de Fe³⁺, para lo cual se pesan 0.454 g de FeCl₃·6H₂O, los cuales se llevan a 100 ml con la mezcla de diclorometano:metanol (70:30), de esta solución se toman 2 ml y se llevan nuevamente a 100 ml con diclorometano:metanol (70:30), de esta solución patrón se toman de 0.25 ml-2.5 ml y se le adicionan entre 9.65 ml y 7.4 ml de diclorometano:metanol (70:30), 0.05 ml de tiocianato de amonio (30% m/v) y 0.05 de HCl

0.2 N, una vez mezclados se mide la absorbancia a 500 nm frente a un blanco de reactivos.

Al método original se le realizaron las siguientes modificaciones: se redujo el tamaño de muestra de 300 mg a un intervalo de 1 mg-300 mg, sustituyéndose además el cloroformo por diclorometano (Donoso 1996, Hagan 1967).

2.2. Índice del Ácido Tiobarbitúrico (TBA) (Brewer 1992, Witte 1970).

Para la determinación se pesan 10 g de muestra, los cuales se homogeneizan a alta velocidad por 10 s haciendo uso de un homogenizador (Waring Commercial) con 15 ml de ácido perclórico frío (9% v/v) y 10 ml de agua destilada también fría. La mezcla se lleva a 50 ml con agua destilada y se filtra a través de papel Watman #2. Se toman 5 ml del filtrado y se le adicionan 5 ml de la solución de TBA 0.02 M, mezclar e incubar por 30 min en un baño de agua hirviente. Finalmente se mide la absorbancia a 530 nm contra un blanco de reactivos.

Para obtener el índice de TBA se hace uso de la siguiente fórmula:

$$I TBA = \frac{\text{mol Tep} \times 2 \times 1000 \times 1000 \times 72 \times \text{dilucion}}{\text{g muestra}} = \text{mg MDA/g muestra}$$

Donde Tep es 1,1,3,3-tietoxipropano

Para obtener las moles de 1,1,3,3-tietoxipropano (moles Tep), se prepara una curva de calibración haciendo uso de una solución patrón de Tep $1 \times 10^{-3} \text{M}$, de la cual se toman 0.01 ml -0.08 ml, a los cuales se les agrega 4.99-4.92 ml de agua destilada y 5 ml de TBA 0.02 M, una vez que se han mezclado se dejan incubar por 30 min en un baño de agua hirviente. Finalmente se mide la absorbancia a 530 nm contra un blanco de reactivos.

2.3. Índice de Kreis (Hart 1991, Pool & Prater 1945).

Para la determinación se disuelven en 5 ml de diclorometano de 0.05 g a 5 g de grasa, se adicionan 10 ml ácido tricloroacético al 30% en ácido acético gracial y se mezcla, posteriormente se agrega 1 ml de floroglucinol (1% m/v). Se agita e incuba por 15 min en baño de vapor a 45°C, transcurrido el tiempo se deja enfriar y se adicionan 4 ml de etanol. Medir abasorbancia a 540 nm contra un blanco de reactivos.

Para obtener el índice de Kreis se hace uso de la siguiente fórmula (Walters & Bramlage 1992). Expresado en unidades Kreis por gramo de grasa extraída.

$$I_{Kreis} = \frac{A_m - A_b}{l \times c} = \text{índice/g grasa}$$

Donde:

A_m es la absorbancia de la muestra

A_b es la absorbancia del blanco de reactivos

l es la longitud de la celda (1 cm)

c es la concentración de aceite o grasa en la solución final en g/ml.

Para obtener los valores de transmitancia, puede hacerse uso de la lectura del equipo o bien la siguiente fórmula: $Abs = -\log T$