

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÌMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Uso de antioxidantes para la estabilidad oxidativa de la
pulpa de anchoveta (*Engraulis ringens*) almacenada en
congelación**

TESIS

para optar el grado académico de Magíster en Ciencia de los Alimentos

AUTOR

Alberto Clemente Salas Maldonado

ASESORA

Eloisa Hernández Fernández

Lima – Perú

2008

INDICE

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN

II. GENERALIDADES

2.1. OXIDACIÓN

2.2. MECANISMOS DE OXIDACIÓN

2.3. ACTIVACIÓN DEL OXÍGENO

2.4. OXÍGENO SINGLETE

2.5. RADICAL HIDROXILO

2.6. ANIÓN SUPERÓXIDO

2.7. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

2.8. RADICAL PERHIDROXILO

2.9. COMPLEJO METAL OXÍGENO

2.10. OXIDACIÓN NO ENZIMÁTICA

2.11. ANTIOXIDANTES

2.12. TIPOS DE ANTIOXIDANTES

2.13. ANTIOXIDANTES SINTETICOS

2.13.1. BUTIL HIDROXITOLUENO Y BUTIL HIDROXIANISOL

2.13.2. TERBUTILHIDROXIQUINONA

2.13.3. GALATO DE PROPILO

2.14. ANTIOXIDANTES NATURALES

2.15. ASPECTOS LEGALES DEL USO DE ANTIOXIDANTES

III.- PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAL Y METODOS

3.1.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.2. LUGAR DE EJECUCIÓN

3.3. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

3.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

3.5. AGREGADO DE ANTIOXIDANTES

3.6. ACONDICIONAMIENTO Y CONGELACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.7. DETERMINACIÓN DE ANÁLISIS QUÍMICOS

3.7.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA

3.7.2. DETERMINACIÓN DE GRASA CRUDA

3.7.3. DETERMINACIÓN DE CENIZAS

3.7.4. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

3.7.5. DETERMINACION DEL VALOR PEROXIDO

3.7.6. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES

3.7.7. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

3.7.8. EVALUACIÓN SENSORIAL

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

IV. RESULTADOS

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

VII. ANEXOS

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el estudio de los antioxidantes en la estabilidad de la pulpa de anchoveta *Engraulis ringens* durante el almacenamiento en congelación. Los antioxidantes evaluados fueron: Erisorbato de sodio 0.1% +TPP 0,5% + EDTA 0.025%; TBHQ 0.02% + EDTA 0.01% y α tocoferol 0.01% + Lecitina de soya 0,5% + ácido ascórbico 0.05%, las muestras fueron empacadas al vacío, congeladas y almacenadas a -25°C , determinándose los cambios químicos y sensoriales durante siete meses; el testigo fue calificado como apto para el panel sensorial hasta los tres meses. Los tratamientos evaluados sensorialmente no presentaron diferencias significativas durante los 5 meses de almacenamiento. A los siete meses de almacenamiento se observaron diferencias entre los tratamientos evaluados. Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial indican que la mezcla TBHQ +EDTA, fue la mejor, concluyéndose que los antioxidantes empleados mostraron un efecto protector sobre la pulpa de anchoveta almacenada en congelación, así como un efecto combinado sobre el valor peróxido ($r^2= 0.964$); TBA ($r^2= 0.964$) y ácidos grasos libres ($r^2= 0.996$). Un incremento en los ácidos grasos libres hasta aproximadamente 6% fue observado, lo que indica que la actividad enzimática no fue afectada por la congelación ni por los tratamientos con antioxidantes.

Palabras clave: Anchoveta, *Engraulis ringens*, antioxidantes, valor peróxido, ácidos grasos libres

SUMMARY

In this research antioxidants effectiveness in the stability of minced anchovy *Engraulis ringens* during frozen storage were evaluated. The antioxidants used were : 0,1% sodium erisorbate + 0,025% EDTA + 0.5% TPP ; 0.02% TBHQ + 0.01% EDTA; and 0.01% α -tocopherol + 0.05% ascorbic acid + 0,01% soy lecithin . Samples were vacuum-packed, frozen and stored at -25 C . Chemical and sensory changes were followed for 7 months; the blank test was found acceptable by the panel until the third month, the treatments evaluated by sensorial panel showed no significant differences until 5 months of storage, however at 7 months, significant differences among treatments were observed. The best result, by sensorial evaluation was obtained with the mixture of TBHQ + EDTA, the results obtained in this research suggest that antioxidants used protect the minced during frozen storage. Antioxidants and storage time interaction had influence on peroxide value ($r^2 = 0,964$), TBA ($r^2 = 0,964$) and free fatty acids ($r^2 = 0,996$). An increase in free fatty acids to around 6% was observed, indicating that the enzyme activity was not affected by freezing or by treatment with antioxidants.

Key word : Anchovy, *Engraulis ringens* , antioxidants, peroxide value, free fatty acids

AGRADECIMIENTOS

- Al INSTITUTO TECNOLÓGICO PESQUERO DEL PERÚ, por las facilidades proporcionadas durante el desarrollo del presente trabajo, a todos mis compañeros del laboratorio de química, Maritza, Miguel, Carlos, Lucho; al Ing. Maza, por su apoyo y colaboración.
- A la Ing. María Estela Ayala, por su valiosa y desinteresada ayuda en el desarrollo del presente trabajo.
- A la Dra. Eloisa Hernández Fernández, por su asesoría en la ejecución de la presente tesis.
- A mi esposa Victoria, a mis hijos, Carlos y Valery, por su amor y comprensión, que son el soporte de mis actividades
- A todas las personas que de una u otra manera ayudaron a la culminación de este trabajo

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la industria pesquera peruana está basado en su recurso anchoveta. La biomasa de esta especie, calculada entre 8 y 15 millones de toneladas al año, permite que la exportación de harina y aceite de pescado, productos pesqueros tradicionales, constituya, el aporte más importante a la generación de ingresos, dentro del sector pesquero, representando, un aproximado de 2% del PBI ¹.

La anchoveta es un pequeño pelágico con tamaños comerciales que fluctúan entre los 12 y 16 cm, es muy frágil, de elevado contenido graso, difícil de manipular, y de morfología poco adaptable a las operaciones de procesamiento aplicadas para otras especies pesqueras. Estas características, sumadas a sus gigantescos volúmenes de captura y su bajo costo, la condicionan para ser usada en la producción de harina y aceite de pescado.

Diversos intentos para la transformación de esta especie en alimentos de consumo humano directo, tales como concentrados proteicos, sazonado- deshidratado² productos tipo “delicatessen”, no han resultado exitosos debido a inconvenientes tecnológicos, falta de hábito alimentario y en gran parte porque sus costos de manufactura los situaban fuera del alcance popular ³.

En la actualidad, como parte de la política de apoyo alimentario para la población de escasos recursos, se resalta el desarrollo de anchoveta en conservas bajo diversas presentaciones: en salsa de tomate, agua y sal, ahumado en aceite, etc. Con fines de exportación a mercados europeos, algunas compañías ubicadas en la zona sur del país, Pisco y Tambo de Mora principalmente⁴, utilizan la anchoveta para la preparación de anchoas.

Recientemente se ha dado importancia al desarrollo de productos elaborados a base de pulpa de anchoveta desmenuzada como otro enfoque de diversificación en el uso de esta especie para consumo humano directo. Esta tecnología encuentra como uno de sus principales retos el prevenir o reducir, la aparición de olores y sabores indeseables ocasionados por la oxidación del contenido graso básicamente por exposición al oxígeno al desmenuzar el músculo integral ^(5,6) (músculo oscuro y ordinario). La complejidad de los procesos de oxidación no permite que estos inconvenientes sean evitados mediante temperaturas de congelación. Adicionalmente al efecto de exposición al oxígeno, la oxidación de los lípidos en el pescado está influenciada por factores inherentes al espécimen tales como: el nivel de compuestos hemínicos, la presencia de iones metálicos y la cantidad de grasa ^(6,7,8,9). Estos factores son de difícil control en los procesos tecnológicos, de allí la necesidad de buscar métodos alternativos para reducir la velocidad de la oxidación en carne de pescado graso; al respecto una amplia gama de compuestos antioxidantes ha sido evaluada, de lo cual se conoce que la efectividad de los antioxidantes depende del tipo de producto pesquero y de su forma de distribución en el producto⁵.

Sweet¹⁰, refiere que los antioxidantes fenólicos aplicados a los filetes de pescado congelado no demostraron efectividad en evitar la rancidez oxidativa, probablemente debido a su inadecuada distribución en la muestra o por no ser apropiados para este tipo de producto. Diversos antioxidantes como el butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA), propil galato (PG), terbutil hidroxiquinona (TBHQ) y eritorbato de sodio han sido evaluados en pulpa de pescado congelada; resultando el TBHQ el más efectivo como inhibidor de la rancidez y el eritorbato de sodio, como inhibidor en el desarrollo de sabores indeseables¹¹.

Tomando en cuenta la importancia de diversificar el uso de la anchoveta en el consumo humano directo se desarrolla el presente trabajo. Se intenta contribuir con información sobre el tema evaluando, mediante análisis químico y sensorial, el efecto de la aplicación de algunos antioxidantes solos o combinados con EDTA y/o tripolifosfato de sodio en la estabilidad de la pulpa de anchoveta durante el almacenamiento en congelación.

II.- GENERALIDADES

2.1. OXIDACIÓN

Debido a que los lípidos de origen marino son altamente insaturados, estos sufren una oxidación o deterioro espontáneo derivado de la reacción de sus ácidos grasos insaturados con el oxígeno ^(5,9,12,13,14). El resultado de una prolongada oxidación de las grasas es la evolución de rancidez acompañada de una pérdida de palatabilidad debida al desarrollo de sabores y olores indeseables, inclusive de textura, así como de la pérdida de valor nutricional. ⁽¹⁴⁾

Otras causas involucradas en el deterioro de las grasas se refieren a la acción enzimática o microbiana. Entre los catalizadores usuales se presentan la luz, el calor y ciertas impurezas, tales como el agua y los metales ^(12,13,14,15).

El proceso de oxidación es complejo, en un inicio los cambios sensoriales no son detectables, en tanto que ocurre un gradual aumento en la concentración de peróxidos. La duración de este período de iniciación está relacionada con el tipo de grasa y su susceptibilidad a ser oxidada. Un segundo periodo, denominado de reacción o propagación, determina la presencia evidente de olores y sabores desagradables debido al aumento acelerado del contenido de peróxidos ⁽¹⁵⁾. El segundo período representa un estado muy complejo en el que tiene lugar rápidamente la oxidación, se desarrollan la rancidez y los olores y sabores asociados con ella y el contenido de peróxidos aumenta en proporción acelerada ⁽¹⁵⁾. El desarrollo de esta etapa no significa la finalización de las reacciones de iniciación, ya que el desarrollo de estas últimas ha sido observado durante etapas de almacenamiento o vida útil del alimento ⁽¹⁶⁾

La correlación supuesta entre la estimación del contenido de productos de oxidación (peróxidos, aldehídos o cetonas) y la evolución de la oxidación revela la importancia de los métodos de análisis químicos y sensoriales.^(15,16)

Ha sido claramente establecido que la susceptibilidad a la oxidación de los lípidos es causada por factores intrínsecos, tales como la composición de los lípidos, especialmente el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, el contenido de humedad, la integridad, niveles de antioxidantes. Los factores extrínsecos que influyen en la oxidación son la concentración del oxígeno, la luz y la temperatura.^(8,12,16,17)

En alimentos procesados por métodos tradicionales, la susceptibilidad a la oxidación es muy baja en alimentos enlatados, intermedia en los alimentos congelados y muy alta en los productos secos.^(8,16). Las estrategias para prevenir la oxidación en los alimentos involucran métodos físicos y químicos. Dentro de los métodos físicos se incluyen el mantenimiento de la estructura del alimento, inactivación de enzimas (blanqueado), control de humedad y temperatura, uso de empaques que impidan el paso de la luz y la reducción de la concentración de oxígeno.^(5,12,16)

La rancidez es un problema observado en las especies grasas principalmente cuando éstas son almacenadas en congelación o deshidratadas. La vida útil de las especies grasas durante el almacenamiento congelado generalmente está determinada por el inicio de la rancidez⁽⁸⁾.

En el animal vivo, la ingestión y regeneración de los antioxidantes evita el deterioro oxidativo de los compuestos biológicos importantes. Luego de la muerte, los sistemas de protección se agotan y no son capaces de regenerarse. Por lo tanto, el músculo del pescado está expuesto a reaccionar con el oxígeno del aire⁽⁸⁾.

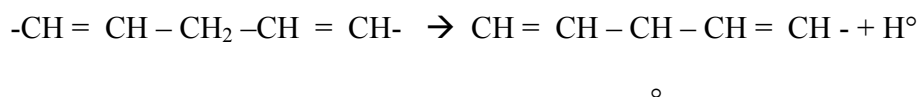
En el músculo de pescado, existen 2 tipos de lípidos, los cuales están involucrados en las reacciones de oxidación. Los triglicéridos o lípidos de reserva y los fosfolípidos ⁽¹³⁾. La contribución de ambas clases de lípidos en el desarrollo de la rancidez es aún materia de discusión. A diferencia de los triglicéridos que se encuentran formando depósitos grasos, los fosfolípidos forman parte de la membrana, estos aunque en pequeñas cantidades, exponen una gran área superficial facilitando las reacciones de oxidación. Potencialmente, los fosfolípidos son más importantes en el inicio de la oxidación al contener una mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que los triglicéridos. ^(8,18)

Es interesante notar que las especies de carne blanca como el bacalao, no son propensas a la rancidez durante el almacenamiento aún cuando ellas contienen fosfolípidos altamente insaturados. Esas especies virtualmente no contienen triglicéridos o mioglobina en el músculo. Esto implica que uno o ambos componentes tienen implicancias importantes en la estabilidad durante el almacenamiento. ^(8,19)

2.2. MECANISMOS DE OXIDACIÓN

La reacción espontánea de los lípidos con el oxígeno atmosférico es conocido como autooxidación y es el proceso que normalmente conduce al deterioro oxidativo de los alimentos ^(12,20). La reacción del oxígeno con los lípidos insaturados (LH) involucra los procesos de iniciación, propagación y terminación ^(12, 20, 21). En el pescado, la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados presentes, la hacen altamente susceptibles a la oxidación mediante este mecanismo ^(8,20). El primer paso en la oxidación es la pérdida de un átomo de hidrógeno del átomo de carbono central de la estructura pentahídrica presente en la mayoría de los ácidos grasos con más de un doble enlace. ^(13,22)

La sustracción del hidrógeno tiene lugar preferentemente en átomos de carbono en los cuales la energía de disociación del enlace es baja. La energía de disociación del enlace C-H se reduce en la vecindad de los grupos funcionales alquenos, la sustracción de los átomos de hidrógeno tiene lugar más rápidamente en los grupos metileno situado entre 2 grupos alquenos de un ácido graso poliinsaturado. El radical formado, se deslocaliza a lo largo de cinco átomos de carbono de la región 1,4 pentadienilo y la reacción con el oxígeno tiene lugar preferentemente por adición a uno de los carbonos terminales de esta estructura.^(12,18)

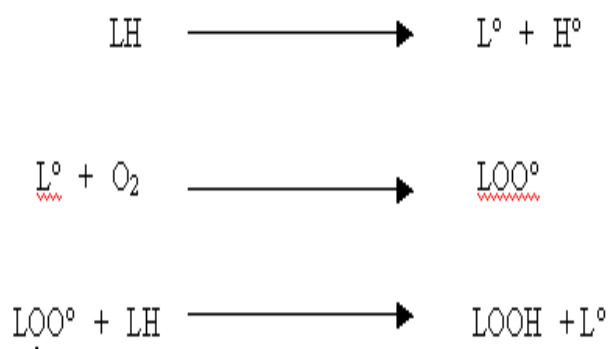


Contrario a la molécula nativa, el radical lipídico (L°)^(12,22) reacciona muy rápidamente con el oxígeno atmosférico formando un radical peróxido (LOO°), el cual puede nuevamente escindir un hidrógeno de otra acilcadena produciendo un hidroperóxido (LOOH) y un nuevo radical L° . Esta propagación continúa hasta que uno de los radicales es removido mediante reacción con otro radical o con un antioxidante del cual resulta un radical A° mucho menos reactivo. Los hidroperóxidos producidos en cantidades relativamente grandes durante la propagación son insípidos y por lo tanto, quizá sea una sorpresa que el ampliamente usado Valor peróxido generalmente guarda escasa correlación las propiedades sensoriales.⁽¹³⁾

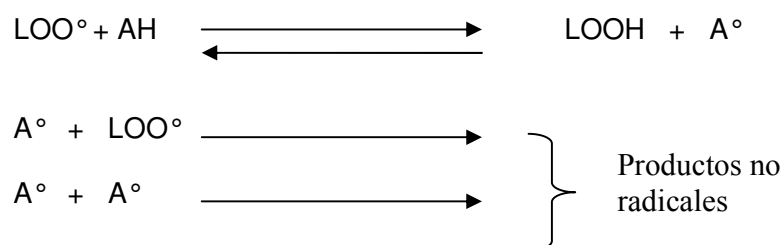
La iniciación tiene lugar por la pérdida de un hidrógeno, por una especie reactiva, tal como un radical hidroxilo, lo que provoca la iniciación de la oxidación en presencia de trazas metálicas, luz o calor, sin embargo, en los aceites hay a menudo trazas de hidroperóxidos que pueden haberse formado por la acción de enzimas durante el proceso de extracción⁽²⁰⁾.

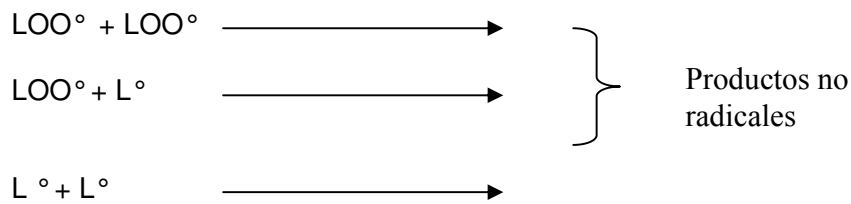
La iniciación secundaria por rotura homolítica de hidroperóxidos es una reacción de relativamente baja energía y representa normalmente la principal reacción de iniciación de la oxidación en aceites comestibles ^(12, 21).

El radical resultante (L°), por la iniciación secundaria, o por la sustracción del hidrógeno del LH por una especie reactiva, reacciona con el oxígeno para formar el radical peroxilo (LOO°). En el proceso de propagación, el LOO° reacciona con LH para formar los hidroperóxidos, los cuales son los productos primarios de la autooxidación. ^(8,21)



Los antioxidantes (AH) pueden romper esta reacción en cadena reaccionando con el radical LOO° formando radicales estables (A°), los cuales no reaccionan con los LOOH o forman productos no radicales





En las reacciones de terminación los radicales libres se combinan para formar moléculas con electrones apareados, estas son reacciones de baja energía, pero están limitados por la baja concentración de radicales y por la necesidad de que los radicales posean la orientación adecuada para que se produzca la reacción. ^(12,21)

Los radicales alcoxilo formados por descomposición de hidroperóxidos pueden descomponerse a su vez liberando hidrocarburos, alcoholes o aldehídos volátiles que dejan de estar unidas al esqueleto del glicerol, También pueden formarse alcoholes y cetonas no volátiles.

Los aldehídos volátiles contribuyen de tal forma al aroma de los aceites oxidados que el hexanal se toma como valor de referencia para el control de productos de oxidación secundaria formados durante la oxidación lipídica. ⁽¹²⁾

Los hidroperóxidos lipídicos y algunos de sus productos de degradación pueden interactuar con las membranas y enzimas. Estas reacciones con los componentes biológicos son de mucho interés para los bioquímicos, debido a que pueden afectar las funciones vitales de la célula ^(14,20,21)

Además de la descomposición para formar productos secundarios, los hidroperóxidos formados a partir de ácidos grasos poliinsaturados pueden sufrir reacciones de oxidación posteriores para formar dihidroxiperóxidos y moléculas con anillos que contienen oxígeno. ⁽¹²⁾

En el músculo del pescado, existen un gran número de mecanismos y catalizadores potenciales que pueden estar involucrados en las reacciones de activación para generar especies de oxígeno activos. Estos incluyen mecanismos no enzimáticos que involucran a proteínas hemínicas tales como mioglobina, hemoglobina y el citocromo, así como el hierro libre y los iniciadores enzimáticos tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa.⁽¹³⁾

En realidad algunos de estos mecanismos tienen poca importancia. Por ejemplo, aunque algunas enzimas como la lipooxigenasa han sido reportadas en pescados en etapas post-mortem, sin embargo, el impacto en el desarrollo de la rancidez es aún cuestionable. Lo mismo puede afirmarse sobre el rol del oxígeno singlete en la oxidación de los lípidos.

2.3. ACTIVACION DEL OXIGENO

La interacción del oxígeno con los ácidos grasos insaturados es una reacción importante que ocurre en una gama amplia de condiciones; sin embargo la interacción directa es extremadamente lenta debido a que la iniciación de la oxidación de los ácidos grasos insaturados requiere de una forma activa de oxígeno^(20,12,22)

El estado basal de los ácidos grasos insaturados corresponde al estado singlete, el cual es dimagnético (dos electrones apareados en la última capa). En contraste, el estado basal del oxígeno se encuentra en el estado triplete (paramagnético), con dos electrones desapareados que tienen el mismo spin pero están en diferentes orbitales, de allí que la reactividad del oxígeno triplete con los ácidos grasos insaturados es una reacción prohibida debido a la restricción presentada por el spin^(17,20,12,22).

Esta restricción molecular del oxígeno, ocasionada por el spin puede ser superada por cualquiera de los siguientes mecanismos de iniciación:

- El oxígeno singlete
- Especies activadas o parcialmente reducidas de oxígeno (peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo)
- Complejos activos de oxígeno y hierro
- Ruptura homolítica de los hidroperóxidos ocasionada por el hierro, que generan radicales libres

2.4. OXÍGENO SINGLETE

El oxígeno singlete puede existir en dos formas caracterizadas por diferentes estados de energía:

A) una forma a 37 Kcal. por encima de su estado basal, los electrones desapareados se encuentran en diferentes orbitales con spin en direcciones opuestas.

B) A 22 Kcal. por encima de su estado basal, los electrones ocupan la última capa en el mismo orbital y tiene spin opuestos.^(17,23)

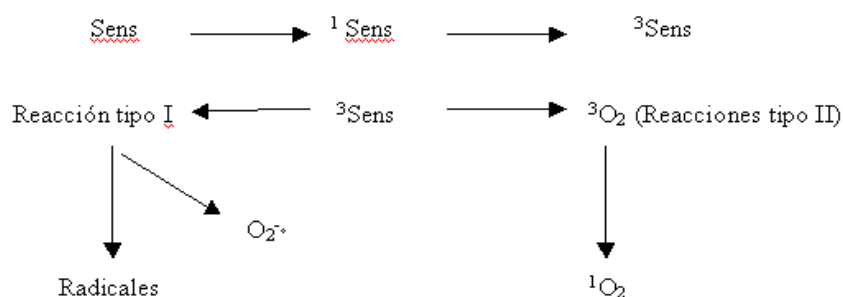
Debido a que las reacciones del oxígeno con las moléculas orgánicas tienen que proceder vía la transferencia del par de electrones (los cuales deben tener spin opuesto), el oxígeno singlete es biológicamente más reactivo que el oxígeno en su estado triplete^(17,22,23).

En sistemas biológicos, especies activas de oxígeno, tales como el singlete, ($^1\text{O}_2$), radical hidroxilo (OH°), anión superóxido (O_2^-), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), pueden ser generados por mecanismo enzimáticos y no enzimáticos^(12,20,22) .

Pigmentos naturales tales como las hematóporfirinas y flavinas pueden servir como sustancias fotosensibilizadoras para producir $^1\text{O}_2$, en presencia del O_2 y la luz visible. Enzimas como microsomal oxidasa, lipooxigenasa y prostaglandina sintetasa pueden directa o indirectamente generar $^1\text{O}_2$.

La inclusión de bloqueadores (scavengers) del oxígeno singlete , tal como β - caroteno y α – tocoferol, pueden inhibir los mecanismos $^1\text{O}_2$ y reducir la oxidación .^(20,22)

El oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), bajo ciertas circunstancias puede iniciar la oxidación lipídica esto puede ocurrir a través de una reacción fotocatalítica en la cual una molécula “sensible” es excitada, primero a su estado singlete, luego a su estado triplete. En éste estado puede reaccionar con los sustratos vía reacciones tipo I para producir radicales y O_2^- , mientras que las reacciones tipo II producen el oxígeno singlete

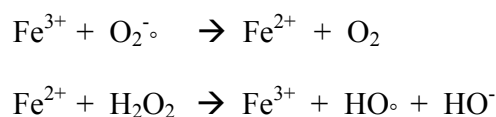


Los compuestos “sensibles” para la generación del oxígeno singlete incluyen a los compuestos porfirina (mioglobina, hemoglobina, citocromo C, vitamina B₁₂). El mecanismo de catalización de la oxidación lipídica del oxígeno singlete difiere del mecanismo típico de la abstracción del hidrógeno, el ¹O₂ reacciona directamente con el doble enlace ^(17,22,23)

2.5. RADICAL HIDROXILO

La adición de un tercer electrón a H₂O₂ forma el radical hidroxilo (HO[•]), la más potente especie de oxígeno reactiva. Este radical es capaz de interactuar con casi cualquier molécula ^(17,13)

In vivo, las fuentes de radical hidroxilo, incluyen la ruptura homolítica del enlace O—O del H₂O₂ el cual es catalizado por el calor, radiación y la reacción Fenton-Haber-Weiss ^(20,13,22).



Estos radicales pueden también ser generados por transferencia de electrones, oxidación enzimática, por lipooxigenasas y ciclooxigenasas. ⁽²⁰⁾

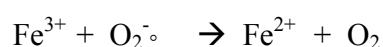
2.6. ANIÓN SUPERÓXIDO

La aceptación de un electrón por el ³O₂ produce un radical anión superóxido (O₂^{•-}) ^(16,20,22).

Los radicales superóxido son formados en casi todas las células vivas (Halliwell, 1978b; Bast y Haenen, 1984) ⁽²⁰⁾. Diversos procesos enzimáticos tales como la xantina oxidasa,

citocromo P450 oxidasa, aldehído oxidasa, y la cadena de transporte de electrones de la mitocondria pueden generar anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

La autoxidación de la catecolamina, hidroquinona, mioglobina, hemoglobina pueden también producir anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El peróxido de hidrógeno puede interactuar con el anión superóxido por la vía de la reacción catalizada por el hierro (Haber-Weiss) para generar el radical hidroxilo.^(17,20)



El anión superóxido puede ser bloqueado por el superóxido dismutasa o por compuestos que puedan reaccionar rápidamente con el anión tal como la vitamina C, tioles, hidroquinonas y catecol

2.7. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La adición de un segundo electrón al radical anión superóxido forma un ión peróxido no radical (O_2^{2-}) a pH fisiológicos, el ión peróxido inmediatamente toma su forma protonada para producir el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno puede formarse espontáneamente a partir del superóxido o puede ser generado enzimáticamente por la superóxido dismutasa, xantina oxidasa, glucosa oxidasa^(20,22).

El peróxido de hidrógeno en si mismo no es nocivo para los compuestos bioquímicos, sin embargo, por la reacción Fenton-Haber-Weiss puede producir radicales hidroxilos.^(17,20,13,22)



2.8. RADICAL PERHIDROXILO

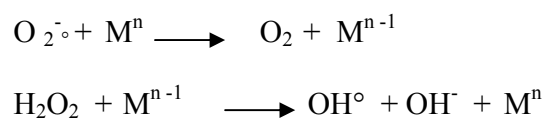
El radical perhidroxilo (HO_2°) es el ácido conjugado de ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y es un oxidante más fuerte que el superóxido. El radical HO_2° puede iniciar directamente la oxidación de los lípidos en la membrana celular donde $\text{O}_2^{\cdot-}$ no puede realizar esta labor, porque no puede penetrar la membrana. Cuando este radical se aproxima a un compuesto rico en protones este se convierte en el compuesto protonado HO_2° , el cual es muy reactivo.^(20,22)

2.9. COMPLEJOS METAL OXIGENO

Los metales de transición son catalizadores extremadamente importantes en la generación de radicales libres⁽¹⁷⁾

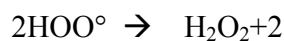
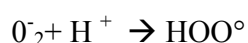
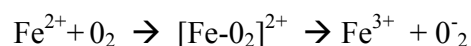
Aunque la reacción de Haber-Weiss es termodinámicamente exotérmica, un metal de transición, Fe o Cu, es necesario para catalizar la reacción.⁽²⁰⁾ de otra manera la reacción es demasiado lenta para explicar la formación de agentes oxidantes⁽²⁰⁾.

El hierro es el compuesto más frecuentemente considerado en este aspecto, debido a su amplia disposición en sistemas biológicos. El esquema general para la producción de radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton es la siguiente:



2.10. OXIDACIÓN LIPIDICA NO-ENZIMATICA

Las proteínas hemínicas y el hierro libre juegan un importante rol en la oxidación de los lípidos. Los iones de hierro pueden tomar parte en las reacciones de transferencia de electrones con el oxígeno molecular.



Se piensa que el superóxido (O_2^-) ni el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) causan directamente la oxidación lipídica. La oxidación requiere de especies de oxígeno más reactivo tal como el radical hidroxilo. El superóxido (O_2^-), mediante reacciones puede convertirse en H_2O_2 , los cuales reaccionan con el Fe^{2+} (reacción Fenton) para formar radicales hidroxilo.



Esta forma de oxidación puede ser evitada por las peroxidasas y quelantes del hierro.

El hierro también tiene otro rol en la oxidación de lípidos, causa descomposición de peróxidos lipídicos.



Las proteínas hemínicas son una fuente abundante de hierro en las especies pelágicas. Estas proteínas que contienen Fe son capaces de propagar la oxidación de los lípidos por medio de reacciones Redox⁽¹³⁾

2.11. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes en alimentos pueden ser definidos como cualquier sustancia capaz de retardar, prevenir o inhibir el desarrollo de la rancidez o la aparición de otros compuestos de deterioro debido a la oxidación. Los antioxidantes retardan el desarrollo de off-flavours, prolongando el período de inducción, la adición de antioxidantes después de finalizado este período, no es efectivo en evitar la rancidez ^(12,24).

El efecto de la concentración de un antioxidante en la velocidad de autooxidación depende de muchos factores:

- Estructura del antioxidante
- Condiciones de la autooxidación
- Naturaleza de la muestra que está siendo oxidada

Frecuentemente los antioxidantes pierden su actividad a altas concentraciones y se comportan como prooxidantes al intervenir como promotores de las reacciones de iniciación.⁽¹²⁾ La actividad de los antioxidantes por donación del átomo de hidrógeno no sólo esta limitada a los fenoles, Endo y col. mencionado por Shahidi ⁽²⁴⁾, han sugerido que el efecto antioxidante de la clorofila en la oscuridad ocurre por un mecanismo similar.

Los antioxidantes son más efectivos en extender el periodo de inducción cuando son adicionados a un aceite que no ha sufrido mucho deterioro, siendo poco efectivos en retardar la descomposición de lípidos ya deteriorados, por lo que se recomienda que los antioxidantes deben ser adicionados a los alimentos tan pronto como sea posible para alcanzar su máxima protección contra la oxidación. ^(12,16,24,25)

2.12. TIPOS DE ANTIOXIDANTES

De acuerdo a su modo de acción los antioxidantes pueden ser clasificados como : ^(12,16,25)

Tipo I .- Bloqueadores de radicales libres

Tipo II.- Quelantes de los iones metálicos

Tipo III.- Eliminadores de oxígeno (oxygen scavengers) los cuales reaccionan con este en sistemas cerrados (ácido ascórbico, sulfitos, glucosa oxidasa).

Los antioxidantes del Tipo I reaccionan con los radicales de alta energía, convirtiéndolos en productos termodinámicamente más estables. Los antioxidantes fenólicos son efectivos en retardar la aparición de la rancidez en carnes, independientemente que esta sea catalizado por hierro hémico y no hémico⁽²⁶⁾, actúan donando un hidrógeno al radical^(16,12,25)

Los antioxidantes del Tipo II previenen la formación de radicales libres en los alimentos, entre los más comunes tenemos al EDTA, ácido cítrico, las diferentes formas del ácido ascórbico, tienen propiedades quelantes o secuestrantes sobre los iones metálicos, estos aditivos, excepto el EDTA, no presentan problemas toxicológicos, debido a que se encuentran en forma natural en los alimentos y en los procesos metabólicos del organismo⁽¹²⁾. Los antioxidantes Tipo III, no están asociados con la adición de aditivos específicos sino con el control de los factores ambientales tales como la reducción del nivel de oxígeno, temperatura, contenido de humedad⁽¹²⁾.

Numerosas moléculas naturales o de síntesis tienen propiedades antioxidantes. Para su utilización en alimentación, la elección se basa sobre los productos que presentan, al máximo posible, las siguientes características ⁽²⁷⁾:

- Ser seguro
- No impartir color, olor ni sabor

- Ser efectivo a bajas concentraciones
- Facilidad para ser incorporado en el alimento
- Mantener la actividad antioxidante después del proceso
- Ser estable en el producto terminado
- Estar disponible a bajo costo

2.13. ANTIOXIDANTES SINTETICOS

2.13.1. BUTIL HIDROXITOLUENO Y BUTIL HIDROXIANISOL

El BHA y el BHT, ambos son extremadamente solubles en grasa, pero insolubles en agua, ambos tiene un buen efecto en relación a la estabilidad en los productos terminados, aunque el BHA es ligeramente mejor que el BHT.

El BHT es mucho más efectivo como antioxidante en grasa animales que en grasa vegetales. Entre las múltiples aplicaciones del BHA, esta la de proteger el sabor y color de los aceites esenciales y es considerado el mejor antioxidante probado hasta ahora para esta aplicación.

El BHA es efectivo en controlar la oxidación de los ácidos grasos de cadena corta (como los encontrados en el coco y la semilla de palma). El BHA es uno de los más antiguos antioxidantes utilizados para evitar la rancidez, existen evidencias de su utilización desde 1940, en 1950 fue colocado en la lista como aditivo GRAS. En 1980 se reportó que el uso de BHA a niveles altos producía tumores en el estómago de los roedores. En 1990 se solicitó al FDA retirar el BHA de la lista GRAS y solicitar su inclusión como sustancia prohibida en alimentos. ^(16,24)

Debido a esta solicitud, el FDA convocó a un panel de expertos para revisar la información y los datos obtenidos al utilizar BHA, la federación de sociedades americanas de Biología experimental (FASEB) invitó a la presentación de todo tipo de información relevante relacionada al uso de BHA. El reporte final (1994) afirmó que el BHA no es carcinógeno clase I, y que no existe riesgo al ser consumido en los niveles de exposición normales. ⁽¹²⁾

Debido a su naturaleza volátil, el BHA y el BHT son importantes aditivos usados como material de empaque, debido a su capacidad para migrar dentro del alimento.

Con este propósito, estos antioxidantes son adicionados directamente en el material de empaque que van a estar en contacto directo con el alimento (formando la capa interna) o como una emulsión en la capa interna del empaque. ⁽²⁴⁾ Un efecto sinergista ha sido demostrado entre el BHA y el BHT.

2.13.2. TERBUTIL HIDROXIQUINONA (TBHQ)

Es considerado como el mejor antioxidante para proteger aceites utilizados en frituras.

El TBHQ puede ser usado sólo o en combinación con el BHT y el BHA, en concentraciones máximas de 0.02% o 200 ppm. concentraciones referidas con el contenido de grasa. El TBHQ es soluble en grasa y no forma complejos con el Fe y el cobre (efecto que si es observado con el propil galato). Los agentes quelantes, tales como el ácido cítrico realzan las propiedades del TBHQ. ⁽²⁴⁾

2.13.3. GALATO DE PROPILO

Buena actividad antioxidante para estabilizar grasas vegetales y animales; el PG pierde su actividad durante el procesamiento a los cuales se aplica calor por lo que no es adecuado en aplicaciones de frito donde la temperatura excede los 190°C

El PG forma quelatos con el Cu y el Fe, dando coloraciones azul negruscas, por lo que es recomendable el uso de PG con ácido cítrico (quelante).

Buena actividad sinérgica con el BHA y el BHT, sin embargo no está permitido su uso con el TBHQ.⁽²⁴⁾

2.14. ANTIOXIDANTES NATURALES

Los antioxidantes en los alimentos pueden originarse de compuestos que están presentes en el alimento en forma natural o de las sustancias formadas durante el procesamiento.

Los antioxidantes naturales son compuestos polifenólicos que están presentes en todas las partes de las plantas, estos compuestos son multifuncionales y pueden actuar como:

- Agentes reductores (eliminadores de radicales libres)
- Como quelantes de metales
- Como “quenchers” del singlete de oxígeno

Como ejemplos de antioxidantes fenólicos comúnmente encontrados en las plantas tenemos: Flavonoides, derivados del ácido cinámico, tocoferoles y ácidos orgánicos polifuncionales. Los flavonoides y el ácido cinámico son conocidos antioxidantes primarios (actúan eliminando radicales libres). Los chalcones (precursores de los flavones y flavanones) también presentan actividad antioxidante.^(12,24)

2.15 ASPECTOS LEGALES DEL USO DE ANTIOXIDANTES

La Directiva Europea 95/2 ⁽⁴⁷⁾ sobre aditivos alimentarios define a los antioxidantes, como las sustancias que prolongan la vida útil de los productos alimenticios protegiéndolos frente al deterioro causado por la oxidación de las grasas y los cambios de color.

El Codex ⁽⁴⁸⁾, justifica el uso de aditivos alimentarios únicamente si ello ofrece alguna ventaja y no presenta riesgos apreciables para la salud de los consumidores, a continuación se presentan las dosis recomendadas por ambas organizaciones

Antioxidantes	Directiva 95/2	Codex Alimentarius
EDTA	(E 385) 75 mg/kg Pescado en conserva	75 mg/kg Pescado, filetes y productos pesqueros congelados, incluidos los moluscos, crustáceos y equinodermos
TBHQ	(E 319) 200 mg/kg Tocino, aceite de pescado, grasas de vacuno.	200 mg/kg Manteca de cerdo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal
Alfa tocoferol	(E 307) 0,1 g/kg cereales, galletas, bizcochos	500 mg/kg manteca, grasa de leche anhidra
Lecitina	(E 322) 10 g/kg cereales, galletas, bizcochos	Buenas practicas de manufactura
Ácido ascórbico	(E 300) <i>quantum satis</i> zumos y néctares de fruta, aceites y grasas de origen animal	Buenas practicas de manufactura en jugos de fruta
Fosfatos de sodio	(E 339) hasta 1 g/kg en cereales	1000 mg/kg zumos de fruta, néctares, suero en polvo
Eritorbato de sodio	(E 316) 1500 mg/kg. Conservas y semiconservas de pescado, pescado carne roja congelado .	Ácido eritorbico, , buenas practicas de manufactura

III . PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAL Y METODOS

3.1.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

A. MATERIALES

- Papel de filtro Whatman N° 41
- Papel de filtro Whatman N° 2
- Pipetas volumétricas y serologías
- Buretas
- Pizetas
- Cajas de cartón parafinado
- Contenedores de plástico
- Bolsas de polietileno
- Peras de decantación
- Vasos de precipitación
- Tubos de prueba

B. EQUIPOS

- Congelador de placas de contacto, NISSIN, Modelo BF 400D,
Capacidad 480 Kg. Refrigerante Freón 22.
- Máquina empacadora a vacío, MULTIVAC, modelo AG-800,
Germany.
- Separador de carne, BIBUN, serie 80NF2DX12, Japan
- Balanza , UWE , capacidad $61 \pm 0.001\text{Kg}$, modelo FW-61
- Cortador mezclador de carne, BIBUN, serie SCP-2B-1, capacidad 15
Kg., Japan
- Evaporador rotatorio, TOKIO RIKAKIKAI Co. LTD, tipo . N-1, Serie
10901040. Japan.
- Balanza analítica , METTLER PM 100 , Rango/sensibilidad 110/
0.001 gr.
- Balanza analítica, METTLER H35AR , Rango/sensibilidad 160
/0.0001 gr.
- Espectrofotómetro de doble haz. Rango UV a VIS, SHIMADZU,
modelo UV-200 . Japan.
- Homogeneizador, NISSEI, Modelo IS-3BH
- Bomba de vacío, IKEDA SCIENTIFIC, Modelo PSW
- Centrífuga, KOKUSAN, Tipo H-100B4.
- Baño María, MEMMERT, Tipo WB10.
- PT shaker, R.K.I, IKEMOTO RIKAKO GYO Co. LTD.

C. REACTIVOS

- Cloroformo J.T. Baker, 99.9% pureza, grado ACS
- Metanol , Omnisol ® , 99.98% pureza, grado HPLC
- Sulfato de sodio anhidro, Mallinckrodt, puro, grado ACS
- Almidón soluble, p.a , Merck
- Ácido etilendiaminotetraacético EDTA, pureza, 99%, grado reactivo, Erba
- Ácido 2-tiobarbitúrico, 98% de pureza, Merck
- Yoduro de potasio, pureza 97%, grado p.a, Riedel-de Haën
- Tert-butylhydroquinone, pureza 97%, para síntesis, Merck
- Ácido ascórbico, pureza 99.7%, grado reactivo, Merck.
- DL- α Tocoferol acetato, grado alimentario, Merck.
- Eritorbato de sodio, grado reactivo, Paesel.
- Ácido acético glacial, pureza 99.9%, ACS, Fisher Scientific.
- Ácido oleico, grado USP, Mallinckrodt
- Benceno, pureza 99.8%, para Espectroscopía, Merck
- Acetato cuprico, pureza 99%, grado reactivo, Merck
- Piridina, pureza 99.5%, p.a, Merck
- Tripolifosfato de sodio, grado alimentario, Marca Hellmuth Carroux
- Ácido tricloroacético, pureza 99.5%, grado USP, Riedel-de Haën

3.2. LUGAR DE EJECUCION

El presente estudio se llevó a cabo en los laboratorios de físico química, y en la Planta Piloto de alimentos congelados del Instituto Tecnológico Pesquero del Perú

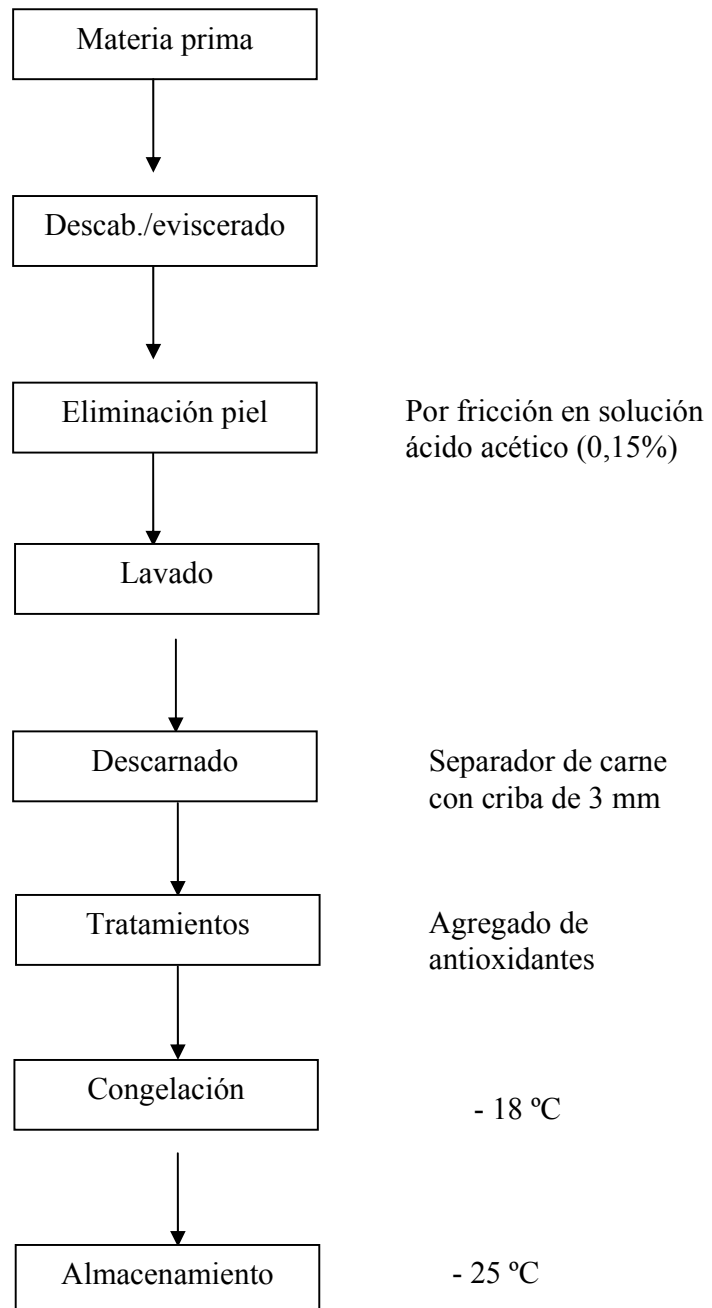
3.3. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La anchoveta capturada fue inmediatamente enfriada en un sistema pescado: agua: hielo (2:1:1), a una temperatura $0^{\circ}\text{C} \pm 1$, y transportada hasta las instalaciones del Instituto Tecnológico Pesquero, (ITP). El tiempo desde la captura hasta el inicio del proceso fue de menos de 20 horas. En el diagrama de flujo se presentan las etapas seguidas para la obtención de la pulpa de anchoveta.

3.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

En planta, la anchoveta fue lavada, descabezada /eviscerada manualmente, sometida a un proceso de pelado químico por fricción utilizando una malla anchovetera y una solución de ácido acético (0.15%) por 20 minutos, la proporción pescado solución de pelado fue 1:1. Posteriormente la materia prima sin piel fue lavada y pasada a través de una separadora de carne, con una criba de 3 mm de diámetro, la pulpa obtenida fue distribuida en 4 porciones de 7,5 Kg. (T; T1, T2, y T3) cada uno, inmediatamente sometida a los tratamientos con antioxidantes.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN
DE LA PULPA DE ANCHOVETA



3.5. AGREGADO DE ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes fueron agregados a la pulpa, utilizando un cortador-mezclador de carne en las siguientes concentraciones:

T = Testigo.

T1 = Eritorbato de sodio (SE) 0.1% + Tripolifosfato de sodio (TPP) 0.5%+ EDTA 0.025%

T2 = TBHQ 0.02%+ EDTA 0.01%

T3 = α - tocoferol 0.01% +Lecitina de soya 0.5% + ácido ascórbico 0.05%.

Los antioxidantes liposolubles agregados (TBHQ, y α -tocoferol) fueron calculados en relación a la cantidad de grasa en la pulpa y disueltos en 3 mL de aceite vegetal / kg de pulpa. El ácido ascórbico, SE, TPP y EDTA fueron calculados en relación al peso de la pulpa y antes de ser adicionados fueron disueltos en agua (50mL/kg de pulpa).

3.6. ACONDICIONAMIENTO Y CONGELACION DE LAS MUESTRAS

Después de acondicionadas con sus respectivos tratamientos, las muestras fueron colocadas en cajas de cartón parafinado de 48 x 25 x 6 cm, las cuales fueron convenientemente rotuladas y congeladas en un congelador de placas por 4 horas. Los bloques congelados fueron cortados utilizando equipo con una cierra cinta de acero inoxidable, en porciones de aproximadamente 300 gramos y colocadas en bolsas nylon / polietileno, selladas al vacío y almacenadas en una cámara de almacenamiento a $-25^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 210 días. A los 30,

60, 90, 120, 150 y 210 días se extrajeron las muestras por duplicado para el análisis químico y sensorial.

3.7. DETERMINACION DE ANALISIS QUIMICOS

3.7.1. DETERMINACION DE PROTEINA CRUDA ⁽²⁸⁾

La muestra es digerida utilizando ácido sulfúrico y sulfato de sodio como catalizador, el amonio resultante es liberado por la acción del álcali y el destilado es recibido en una solución ácida.

$$\% \text{ Proteína} = \frac{(\text{Blanco} - S) * N * 0,014 * 20 * 100 * 6,25}{\text{gramos de muestra}}$$

S = mL. de NaOH utilizado para en la muestra

0,014 = m eq gramo de nitrógeno

N = Normalidad del NaOH multiplicado por el factor de corrección

3.7.2. DETERMINACION DE GRASA CRUDA ⁽²⁸⁾

La muestra molida y seca fue sometida a una extracción continua en un extractor Soxhlet con éter dietílico anhidro, luego del proceso el solvente fue removido por destilación y el residuo obtenido pesado es reportado como grasa.

$$\% \text{ Grasa Cruda} = \frac{(W2 - W1) * 100}{S}$$

W1 = Peso del balón vacío

W2 = Peso del balón con grasa

S = Peso de la muestra

3.7.3. DETERMINACION DE CENIZAS ⁽²⁸⁾

Se obtiene por calcinación de la muestra a una temperatura entre 500 – 600°C

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{(B - C) * 100}{S}$$

S

B = Peso en gramos del crisol más las cenizas

C = Peso en gramos del crisol vacío

S = Peso de la muestra

3.7.4. DETERMINACION DE HUMEDAD ⁽²⁸⁾

La muestra es secada en una estufa a 101°C por 16 – 18 horas, la pérdida de peso es reportada como Humedad.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(B - C) * 100}{S}$$

S

A = Peso de la muestra en gramos

B = Peso del pesa filtra mas la muestra antes del secado

C = Peso del pesa filtro después del secado

3.7.5. VALOR PERÓXIDO ⁽²⁹⁾

Previamente, los lípidos fueron extraídos utilizando una mezcla de cloroformo: metanol: agua (2:2:1,8) de acuerdo a lo recomendado por Bligh y Dyer(30). Luego se determino el Valor peróxido, La estimación de peróxidos se basa en la capacidad de estos de liberar Yodo de una solución de Yoduro de potasio en ácido acético glacial.

El índice de peróxido de una grasa es una medida de su contenido de oxígeno reactivo, expresado en términos de miliequivalentes de oxígeno por 1000 g grasa o como milimoles de peróxido por kilogramo de gras (1 milimol = 2 miliequivalente)⁽¹⁵⁾.

3.7.6. ACIDOS GRASOS LIBRES ⁽³¹⁾

Se tomaron aproximadamente 100 mg. de lípido extraído, se evaporo el solvente, se agregaron 5 mL de benceno, y 1 mL. de acetato cupríco + piridina, se agito por 2 minutos y se centrífugo por 5 minutos,. La fase superior fue leída en un espectrofotómetro a 715 nm. Se preparó una curva de calibración empleando como estándar ácido oleico.

3.7.7. VALOR DEL TBA ⁽³²⁾

Se tomaron 5 gramos de pulpa, se adicionó 25 mL. de TCA al 7,5% mezclándose por 1 minuto, se filtro y se tomaron 5 mL. del filtrado en un tubo de prueba, se le agrego 5 mL. del reactivo de TBA se incubo por 40 minutos a 90°C, se enfriaron los tubos y luego se determino la densidad óptica de la solución a 532 nm. Las absorbancias fueron convertidas a mg de MA utilizando una curva de calibración preparada con 1,1,3,3 tetraetoxipropano

3.7.8 . EVALUACION SENSORIAL ^(33,34)

Las muestras fueron descongeladas a temperatura de refrigeración, cortadas en forma rectangular utilizando un cuchillo de acero inoxidable, envasadas en bolsas de nylon polietileno con un peso de 20 g aproximadamente, selladas y colocadas en agua hirviendo por 5 minutos. La evaluación fue realizada por un panel de expertos entrenados en el

análisis de pescados, conformado por 10 personas. A cada persona se le presentaba 2 unidades del testigo (T) y de cada uno de los tratamientos (T1, T2, y T3) para la evaluación del olor, textura y sabor. Se utilizó una escala descriptiva de 1 a 5, donde 3 determina el límite de aceptación, tal como se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 1. Tabla de evaluación sensorial. (*)

Puntaje	Calificación	Descripción
5	Muy Bueno	Sabor y olor agradable, característico de la especie, a pescado muy fresco Textura muy elástica y muy jugosa.
4	Bueno	Buen sabor y olor, a pescado fresco. Textura elástica y jugosa.
3	Regular	Sabor y olor fuerte a pescado, libre de sabor y olor rancio o añejo. Textura poco jugosa, poco elástica, no es pastosa
2	Malo	Olor y sabor ligero a rancio y/o añejo. Textura arenosa, pastosa o seca.
1	Muy malo	Olor y sabor muy desagradable, rancio y/o añejo. Textura muy pastosa o muy seca

(*)Tabla desarrollada en el Instituto Tecnológico Pesquero del Perú

3.8. ANALISIS ESTADISTICOS

Los resultados químicos (Valor peróxido, TBA, ácidos grasos libres) y sensoriales (olor, sabor y textura), fueron sometidos a un análisis de normalidad y homogeneidad de varianza para discernir la aplicación de pruebas paramétricas o no paramétricas. Aplicándose luego el ANOVA y comparaciones múltiples de Duncan para las pruebas paramétricas y Friedman para las no paramétricas. El análisis univariante fue aplicado para determinar el efecto del antioxidante y del tiempo de almacenamiento durante el período de estudio.

Todas las evaluaciones se trabajaron a un nivel de confianza del 0,05%. Se utilizó el paquete estadístico SPSS 10.

IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente estudio se presentan en las siguientes tablas:

COMPOSICION QUIMICA

En la Tabla 2 se presentan los datos referidos a la composición química del filete y de la pulpa de anchoveta

Tabla 2. Composición química de la materia prima

	Filete con piel (%)	Pulpa obtenida luego retiro piel (%)
Humedad	72.4	78.9
Grasa cruda	8.3	3.9
Proteína cruda	17.7	15.9
Cenizas	1.4	1.1

Se puede apreciar una disminución del contenido de lípidos por efecto del retiro de la piel

VALOR PERÓXIDO

El testigo mantiene el valor inicial hasta los 30 días, luego se observa fluctuaciones durante todo el período de almacenamiento, alcanzando el máximo valor a los 210 días (10,5 meq/Kg). En general, el testigo presentó durante todo el almacenamiento valores más altos que los obtenidos para las muestras con antioxidantes, éstas presentan una disminución en el valor peróxido en el primer mes de almacenamiento, para luego presentar valores fluctuantes, T1 alcanzo su valor más alto a los 90 días (7,6 meq/Kg), T2 a los 210 días (7,1 meq/Kg) y T3 a los 150 días (8,8 meq/Kg)

Se puede observar en la Tabla 3 que los valores peróxido fueron consistentemente bajos en las muestras tratadas con antioxidantes comparados con el testigo,

Tabla 3. Variación del VP en la pulpa de anchoveta empacada al vacío y almacenada en congelación a -25°C

Días	Testigo	T1	T2	T3
0	6,2 ± 0,1	6,2 ± 0,1	6,2 ± 0,1	6,2 ± 0,1
30	6,1 ^c ± 0,07	2,8 ^a ± 0,07	4,4 ^b ± 0,17	2,8 ^a ± 0,07
60	5,5 ^c ± 0,14	4,4 ^b ± 0,12	4,2 ^b ± 0,56	3,0 ^a ± 0,07
90	8,9 ^c ± 0,11	7,6 ^b ± 0,35	2,9 ^a ± 0,35	2,3 ^a ± 0,14
120	4,8 ^b ± 0,11	3,5 ^a ± 0,07	3,6 ^a ± 0,14	8,1 ^c ± 0,42
150	9,7 ^c ± 0,49	5,1 ^a ± 0,23	5,5 ^a ± 0,23	8,8 ^b ± 0,10
210	10,5 ^b ± 1,13	3,8 ^c ± 0,2	7,1 ^a ± 0,84	5,9 ^a ± 1,30

Letras iguales en la fila indican que no existen diferencias significativas.

Letras diferentes en la fila indican que existen diferencias significativas.

ÁCIDOS GRASOS LIBRES

En la Tabla 4 se puede observar el incremento constante de los ácidos grasos libres durante el almacenamiento congelado de la anchoveta. Los ácidos grasos libres se incrementaron en todos los tratamientos.

Tabla 4. Variación de los ácidos grasos libres (%ácido oleico) en pulpa de anchoveta empacada al vacío y almacenada a -25°C

Días	Testigo	T1	T2	T3
0	1,1 ± 0,17	1,1 ± 0,17	1,1 ± 0,17	1,1 ± 0,17
30	1,7 ^a ± 0,17	1,8 ^a ± 0,11	1,2 ^a ± 0,25	1,5 ^a ± 0,05
60	1,5 ^a ± 0,08	2,8 ^c ± 0,04	2,4 ^b ± 0,08	2,6 ^b ± 0,14
90	4,2 ^a ± 0,03	4,5 ^{ab} ± 0,06	4,4 ^{ab} ± 0,06	4,7 ^b ± 0,13
120	3,8 ^a ± 0,13	4,8 ^b ± 0,07	4,7 ^b ± 0,03	4,9 ^b ± 0,07
150	4,7 ^a ± 0,12	5,0 ^a ± 0,20	6,1 ^c ± 0,1	5,5 ^b ± 0,3
210	6,1 ^{ab} ± 0,27	5,6 ^a ± 0,27	5,9 ^a ± 0,1	6,6 ^b ± 0,1

Letras iguales en la fila indican que no existen diferencias significativas.

Letras diferentes en la fila indican que existen diferencias significativas.

ACIDO TIOBARBITURICO

De los resultados obtenidos se puede apreciar que los valores más altos fueron obtenidos en el testigo durante todo el período de almacenamiento, lo que indicaría un efecto protector de los tratamientos aplicados.

Tabla 5. Variación del TBA (mg. de MDA/kg. muestra) en pulpa de anchoveta empacada al vacío y almacenada en congelación a -25°C

Días	Testigo	T1	T2	T3
0	0,4 ± 0,05	0,4 ± 0,05	0,4 ± 0,05	0,4 ± 0,05
30	3,2 ^b ± 0,49	0,9 ^a ± 0,20	3,2 ^b ± 0,30	3,6 ^b ± 0,31
60	3,7 ^b ± 0,40	0,9 ^a ± 0,03	2,7 ^b ± 0,03	1,2 ^a ± 0,05
90	3,4 ^a ± 0,06	0,7 ^b ± 0,01	1,8 ^c ± 0,06	2,4 ^d ± 0,16
120	4,3 ^a ± 0,13	1,4 ^c ± 0,30	2,8 ^b ± 0,06	1,7 ^c ± 0,14
150	6,4 ^c ± 1,08	1,7 ^a ± 0,53	4,2 ^b ± 0,05	2,6 ^a ± 0,25
210	6,6 ^c ± 0,26	3,2 ^b ± 0,35	4,2 ^b ± 0,19	2,1 ^a ± 0,14

Letras iguales en la fila indican que no existen diferencias significativas.

Letras diferentes en la fila indican que existen diferencias significativas.

Evaluación sensorial

Tabla 6. Evaluación del olor de la pulpa de anchoveta almacenada a -25 °C

Días	Testigo	T1	T2	T3
0	4,5 ^a ± 0,5	4,6 ± 0,4	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,5
30	3,8 ± 0,6	4,1 ± 0,7	4,1 ± 0,7	3,6 ± 0,7
60	3,5 ^a ± 0,5	4,0 ^{ab} ± 0,4	4,3 ^b ± 0,4	3,7 ^{ab} ± 0,6
90	3,3 ^a ± 0,4	3,9 ^b ± 0,5	3,7 ^{ab} ± 0,3	3,7 ^{ab} ± 0,5
120	3,2 ^a ± 0,5	3,4 ^a ± 0,5	3,5 ^a ± 0,5	3,4 ^a ± 0,6
150	2,7 ^a ± 0,8	3,5 ^{ab} ± 0,1	3,6 ^b ± 0,2	3,6 ^b ± 0,3
210	2,9 ^a ± 0,4	3,3 ^{ab} ± 0,3	3,6 ^b ± 0,3	3,0 ^{ab} ± 0,3

Tabla 7. Evaluación del sabor de la pulpa de anchoveta almacenada a -25 °C

Días	Testigo	T1	T2	T3
0	4,5 ± 0,7	4,8 ± 0,5	4,5 ± 0,5	4,7 ± 0,5
30	3,7 ± 0,3	4,1 ± 0,4	3,9 ± 0,3	3,9 ± 0,5
60	4,1 ± 0,4	4,0 ± 0,2	4,3 ± 0,3	4,2 ± 0,4
90	3,4 ± 0,4	3,9 ± 0,5	3,8 ± 0,3	3,7 ± 0,5
120	3,0 ^a ± 0,6	3,7 ^b ± 0,4	3,8 ^b ± 0,3	3,6 ^b ± 0,6
150	2,5 ^a ± 0,8	3,6 ^b ± 0,6	3,6 ^b ± 0,6	3,4 ^b ± 0,4
210	2,9 ^b ± 0,4	3,5 ^a ± 0,6	3,6 ^a ± 0,7	3,4 ^a ± 0,6

Tabla 8. Evaluación de la textura de la pulpa de anchoveta almacenada a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Días	Testigo	T1	T2	T3
0	$4,7 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,5$
30	$3,6 \pm 0,5$	$4,0 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,6$
60	$3,6^a \pm 0,4$	$4,3^b \pm 0,3$	$4,2^b \pm 0,3$	$4,4^b \pm 0,3$
90	$3,0^a \pm 0,5$	$4,0^b \pm 0,2$	$4,1^b \pm 0,3$	$4,1^b \pm 0,2$
120	$3,1^a \pm 0,5$	$3,8^b \pm 0,3$	$3,9^b \pm 0,4$	$3,8^b \pm 0,5$
150	$2,6^a \pm 0,4$	$3,7^b \pm 0,5$	$4,1^b \pm 0,2$	$4,0^b \pm 0,3$
210	$2,9^a \pm 0,2$	$4,0^b \pm 0,1$	$3,8^b \pm 0,5$	$3,8^b \pm 0,6$

Letras iguales en la fila indican que no existen diferencias significativas.

Letras diferentes en la fila indican que existen diferencias significativas.

En la Tablas 6, 7 y 8 se puede apreciar que hasta los 210 días de almacenamiento los valores para olor, sabor y textura estuvieron dentro de los límites de aceptabilidad para los tratamientos evaluados, excepto para el testigo el cual solo fue aceptable hasta los 120 días.

A los 120 días, se observa que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el testigo y los tratamientos en relación al atributo olor; sin embargo los atributos textura y sabor si presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

A los 150 días, no se considero al testigo en la evaluación estadística, se concluye que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) en relación al sabor, textura y olor entre los tratamientos evaluados.

A los 210 días, la textura y el sabor fueron similares entre los tratamientos con antioxidantes ($p > 0,05$), sin embargo existió diferencias en olor ($p < 0,05$), siendo T2 el mejor tratamiento.

V. DISCUSION

La composición química proximal del filete con piel y de la pulpa obtenida luego del tratamiento con ácido acético al 0,15% es mostrada en la Tabla 2. Como se puede apreciar, el tratamiento previo con el ácido acético al 0,15% permite retirar el 52% del contenido de grasa cruda de la pulpa de anchoveta, esta disminución del contenido lipídico se debe principalmente a la eliminación de la grasa subcutánea, formada básicamente por triglicéridos, este proceso, además de disminuir el contenido de grasa y de contribuir indirectamente con la estabilidad de la pulpa, mejora el color

Los antioxidantes y el tiempo de almacenamiento mostraron un efecto combinado sobre el valor peróxido ($r^2 = 0.964$). De manera general, se puede observar que se mantuvieron por debajo de 10 meq. Peróxido/kg. , excepto para el testigo a los 210 días. Al respecto, Ludorff y Meyer, mencionado por Karacam ⁽³⁵⁾ señalan que para pescado muy fresco, el valor debería ser menor a 2 meq /Kg, para pescado calificado como regular no mayor que 5 meq. /Kg; mientras que en el limite, donde se perciben los cambios en el sabor, en el rango de 8 – 10 meq. /Kg. Estos valores han sido sugeridos para pescados enteros. Por otra parte, Huss ⁽¹³⁾ afirma que los hidroperóxidos producidos en cantidades relativamente grandes durante la propagación son insípidos y por lo tanto, valor peróxido generalmente guarda escasa correlación las propiedades sensoriales.

En el presente estudio, el valor inicial relativamente alto de VP (6.2 meq./kg) puede ser debido al efecto de molido de la pulpa durante el proceso, ya que en esta etapa, al desintegrarse el músculo, se presenta una mayor exposición al oxígeno, permitiendo de esta forma la interacción de los lípidos y el oxígeno. El valor inicial fue tomado luego del

proceso de congelación, de modo que ese valor refleja el efecto del proceso de congelación sobre la pulpa

En general el comportamiento del valor peróxido es irregular, muchas veces después de alcanzar un valor máximo se observan comportamientos erráticos, esto también ha sido observado por Shibata ⁽²⁶⁾ quien afirma que las fluctuaciones observadas podrían estar relacionadas con los productos inestables formados durante la oxidación o por problemas relacionados con el método de preparación de la muestra o el pesaje de la misma.

El testigo mantiene el valor inicial hasta los 30 días, luego se observa fluctuaciones durante todo el período de almacenamiento, alcanzando el máximo valor a los 210 días (10,5 meq/Kg).

Se puede observar en la Tabla 3 que los valores peróxido fueron consistentemente bajos en las muestras tratadas con antioxidantes comparados con el testigo, Se conoce que la presencia de cobre y hierro en aceites acelera la rancidez, por esta razón la utilización del EDTA, en el tratamiento del pescado podría retardar la aparición de la rancidez. ⁽³⁶⁾, por otra parte, las proteínas hemínicas son una fuente abundante de hierro en las especies pelágicas, estas proteínas que contienen Fe son capaces de propagar la oxidación de los lípidos por medio de reacciones Redox, el hierro reacciona con el peróxido de hidrogeno a través de la reacción de Fenton generando el radical hidroxilo. ⁽¹³⁾

En el caso de las muestras con EDTA, se ha observado valores bajos de VP, esto podría ser debido al complejo formado entre éste compuesto y el hierro, Se conoce que este complejo EDTA- FE es un eficiente destructor de hidroperóxidos lipídicos (Svingen y col , 1979 mencionado por Kelleher ⁽³⁷⁾

A los 120 y 150 días, se observan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$), presentando el testigo y T3 los valores más altos. Por otra parte el testigo, fue calificado por

el panel con un puntaje cercano al límite de aceptación a los 120 días y rechazado a los 150 días, mientras que puntajes similares fueron asignados por el panel para las muestras tratadas con antioxidantes. Similares resultados han sido reportados por Ghadi and Leura (1977), mencionados por Karacam ⁽³⁵⁾, para pulpa congelado de anchoveta, los cuales fueron calificados como aceptables hasta los 4 meses de almacenamiento a -18°C.

A los 210 se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$), siendo T2 el que presentó mayor valor peróxido. Sensorialmente, T3 se encuentra en el límite de aceptación en relación al atributo olor, mientras que T2 y T1 presentan valores aceptables en relación a los atributos evaluados. (Tabla 6)

La baja formación de peróxidos en los tratamientos y aún en el testigo esta relacionada con la escasa presencia del oxígeno en las muestras empacadas al vacío, al eliminar parte de este compuesto, se frena la oxidación. Al respecto Ackman ⁽³⁸⁾ comparo muestras de aceite de pescado en cápsulas de gelatina almacenadas a 40 °C en un ambiente de nitrógeno y en oxígeno y observó que el valor peróxido disminuía en las muestras almacenadas con nitrógeno, y aumentaba gradualmente en las almacenadas en un ambiente de oxígeno. Trabajos posteriores llevados a cabo por NMFS presentaron evidencias de la disminución del valor peróxido en aceite de pescado en cápsulas de gelatina almacenadas en nitrógeno de 2,4 a 1,7 meq/Kg luego de 2 años de almacenamiento a 5°C ⁽³⁸⁾

Se ha demostrado que los compuestos de color rosado formados por la reacción del ácido tiobarbitúrico con los lípidos oxidados representan una medida del nivel de oxidación de los alimentos grasos ^(39,40,41)

Durante la autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, el malonaldehído es producido y estos productos de oxidación secundaria son altamente reactivos y permanecen

unidos a otras sustancias alimenticias. Un tratamiento ácido/calor del alimento, presumiblemente libera el malonaldehído ^(39,41)

Los antioxidantes y el tiempo de almacenamiento mostraron un efecto combinado sobre el ácido tiobarbitúrico ($r^2 = 0.964$).

Una relación inversa entre los valores de TBA y los puntajes sensoriales del sabor y olor fue observada para el testigo durante el período de almacenamiento, sin embargo esta relación no fue observada en las muestras tratadas con antioxidantes. Similares resultados han sido reportados por Moledina ⁽⁴²⁾ en pulpa obtenida del Flounder (*Pleuronectes americanus*) almacenada en congelación a -25°C

Si tomamos como referencia el valor de 4 mg. de MDA/Kg, propuesto por Kurade ⁽⁹⁾, para pescado congelado, las muestras testigo sólo serían aceptables hasta los 120 días, T2 sólo hasta los 150 días; mientras que T1 y T3 aún a 210 días presentaron valores por debajo del valor considerado como límite. Asimismo, Dawson y col. (1978), mencionados por Karacam ⁽³⁵⁾ proponen como límite de calidad superior un valor de 4 ug. malonaldehído /g carne.

Si aplicamos los criterios anteriormente mencionados, los resultados para el testigo guardan una estrecha relación con lo reportado en el análisis sensorial, donde el panel acepta al testigo sólo hasta los 120 días (4,3 mg MDA/Kg), mientras que a los 150 días es rechazado (6,4 mg MDA/Kg).

Siu ⁽⁴³⁾ evaluaron los contenidos de malonaldehído en productos frescos y procesados de carne y pescados expendidos en los supermercados y encontraron que el 60 % de las carnes frescas presentaron valores entre 1 – 6 mg.MDA/Kg.; el porcentaje restante presentó valores por debajo de 1 mg.MDA/Kg. Por otra parte, Shamberger ⁽⁴⁴⁾ reportan valores de malonaldehído encontrados en diferentes muestras alimenticias comerciales, para el pollo

fresco señalan valores entre 4 a 7,7 mg MDA /Kg, mientras que para carne de res fresca los valores fluctúan entre 1,2 y 7,2 mg MDA/Kg. En relación a la amplia fluctuación en observada para la carne de res, los autores señalan que podría estar relacionada con los diferentes tiempos de añejamiento que se aplica en la comercialización de la carne de res. Los valores encontrados en los 2 tipos de carne señalados, se encuentran dentro de los valores encontrados en el presente trabajo, resultados de TBA similares también fueron reportados por Crawford ⁽⁴⁵⁾, en muestras de filetes de merluza empacados al vacío con antioxidantes (mezcla de BHA, BHT, propileno glicol y Tween) congelados y almacenados por 12 meses a -26 °C, y encontraron fluctuaciones de 0.4 – 3 mg MDA/Kg para el testigo, el valor más alto fue observado a los 6 meses; mientras que las muestras tratadas con antioxidantes fluctuaron de 0,9 .- 1,4 mg MDA/Kg. Las pequeñas diferencias observadas en la prueba TBA no fueron percibidas por el panel sensorial.

Al comparar los resultados de VP y TBA, se observa, en el caso del testigo, que a valores altos de VP le corresponden valores altos de TBA, sin embargo esto no es observado en los tratamientos, se puede inferir que los antioxidantes aplicados bloquean de manera eficiente los radicales provenientes de la descomposición de los peróxidos, lo cual se refleja en valores de TBA bajos. Similares resultados fueron reportados por Salas ⁽⁴⁶⁾ en pulpa de jurel empacada en bolsas de polietileno de alta densidad, almacenada a -20 °C observaron valores máximos de POV le corresponden valores altos de TBA a los 30 días de almacenamiento.

Los antioxidantes y el tiempo de almacenamiento mostraron un efecto combinado sobre los ácidos grasos libres ($r^2 = 0.996$). Ashton ⁽⁸⁾, afirma que el incremento en los ácidos grasos libres es una característica post-mortem, como resultado de la hidrólisis enzimática de los lípidos esterificados. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que en

todos los tratamientos los ácidos grasos libres se incrementaron durante el almacenamiento congelado, lo cual indica que las enzimas lipasas y fosfolipasas estuvieron activas a la temperatura de -25°C . Las muestras con antioxidantes mostraron valores más altos de FFA comparada con el testigo, similares resultados han sido reportados por Mai ⁽⁶⁾. Al respecto, Ushkalava y col. (1974), mencionado por Mai ⁽⁶⁾, en un estudio de oxidación de la grasa del pescado reportaron que en presencia de compuestos fenólicos, los FFA se acumulan más rápidamente debido a la acción de los fenoles en la hidrólisis de las grasas. En el presente estudio, solo se ha empleado antioxidante fenólico, TBHQ, en T2, sin embargo el efecto de mayor formación de FFA fue observado también en T1 y T3

La tasa de incremento de los FFA es lenta hasta los 30 días de almacenamiento, incrementándose luego hasta los 90 días, posteriormente se observa un lento incremento hasta los 210 días. La relación entre lipólisis y oxidación de los lípidos es aún un tema de debate, generalmente, se acepta que los ácidos grasos libres se oxidan más fácilmente que los esterificados, especialmente cuando enzimas como la lipooxigenasa está involucrada, especialmente en pulpa cruda. Sin embargo, existe evidencia que indica lo contrario ⁽⁸⁾. Los resultados encontrados en este estudio, sugieren que éstos proporcionarían un efecto protector.

VI. CONCLUSIONES

- Los antioxidantes mostraron un efecto protector sobre la pulpa de anchoveta almacenada en congelación hasta los 210 días, el testigo solo fue aceptable sensorialmente hasta los 120 días.
- Los tratamientos y el tiempo de almacenamiento mostraron un efecto combinado sobre el valor peróxido ($r^2 = 0.964$), sin embargo no se observó una relación entre éste y el análisis sensorial.
- Los tratamientos con antioxidantes y el tiempo de almacenamiento mostraron también un efecto combinado sobre los valores TBA ($r^2 = 0.964$) y FFA ($r^2 = 0.996$), asimismo se observó una relación entre el % de ácidos grasos libres, el TBA y el análisis sensorial.
- El TBA es el mejor indicador químico de los cambios que ocurren durante el almacenamiento de la pulpa de anchoveta, los menores valores fueron obtenidos para T1 y T3; sin embargo a los 210 días, el análisis sensorial calificó con puntajes más altos al tratamiento T2.
- Los antioxidantes no inhiben la formación de los ácidos grasos libres.

VII. ANEXOS

ANEXO 1

CURVA DE ACIDOS GRASOS LIBRES (FFA)

Preparación del Estándar:

Se pesa en una fiola de 10 mL aproximadamente 0.01 g de ácido oleico en la balanza analítica.

$$\text{Peso}_{\text{fiola}} = 9.1880 \text{ g} \quad \text{Peso}_{\text{fiola} + \text{Ac. Oleico}} = 9.1982 \quad \text{Peso}_{\text{Ac Oleico}} = 0.0102 \text{ g.}$$

Del peso molecular del ácido oleico se sabe que $1 \text{ mol} = 282.5 \text{ g}$

Se enrasa la fiola con benceno; obteniendo una solución madre cuya concentración es 1,02 mg/mL ó 3.61 $\mu\text{mol/mL}$

Procedimiento

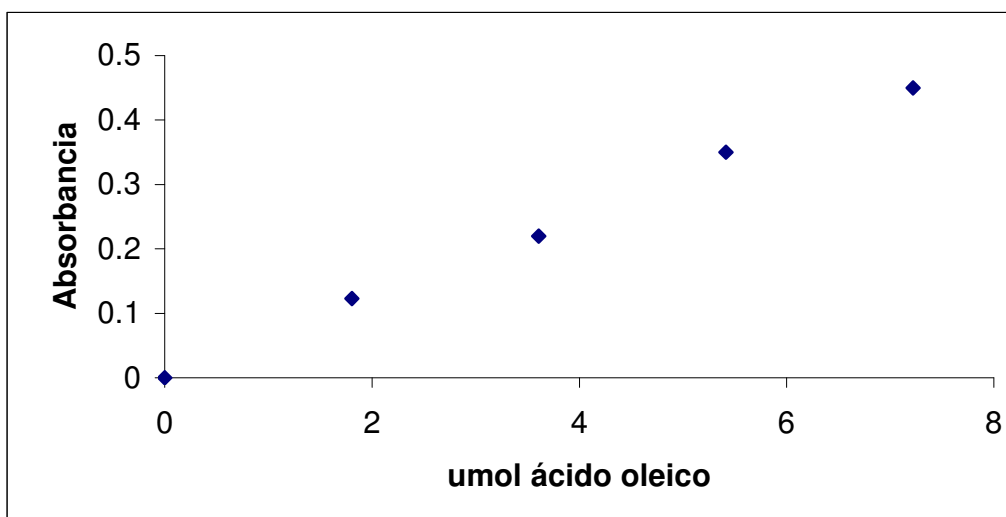
- En tubos de ensayo con tapa rosca, se toman las siguientes alícuotas para la curva las cuales se llevarán a un volumen final de 5 mL benceno.

Tabla 1. Absorbancias de μmol ácido oleico a 715nm

Volumen (mL)	μmol ácido oleico	Vol. C_6H_6 (mL)	Absorbancia (715 nm)
0	0	5.0	0
0.5	1.805	4.5	0.123
1.0	3.610	4.0	0.220
1.5	5.415	3.5	0.350
2.0	7.220	3.0	0.450

- Añadir 1 mL de reactivo acetato de cobre/piridina (una solución acuosa al 5% de acetato de cobre es preparada y filtrada, luego el pH es ajustado a 6.0 – 6.2 usando piridina).
- Agitar los tubos en un vortex.
- Centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos.
- Leer en el espectrofotómetro a 715 nm.

Figura 1. Relación entre umol de ácido oleico y absorbancia



$$r = 0.9991, a = 0.0032, b = 0.0624$$

ANEXO 2

CURVA DEL 1,1,3,3 – TETRA ETOXIPROPANO (TEP)

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR

Densidad del TEP : 0.92 g/mL Pureza : 97%

Se toman 100 uL del TEP y se disuelven en 1000 uL de etanol, (0.42umol/uL), se toman 50 uL y se enraza en fiola de 250 mL con agua destilada (0.084nmol/uL)

Procedimiento

Preparación de la curva:

- En tubos de ensayo con tapa rosca, se toman las siguientes alícuotas para la curva las cuales se llevarán a un volumen final de 5000 µL con solución de TCA al 7% (ácido Tricloroacético), se hicieron triplicados para cada punto..

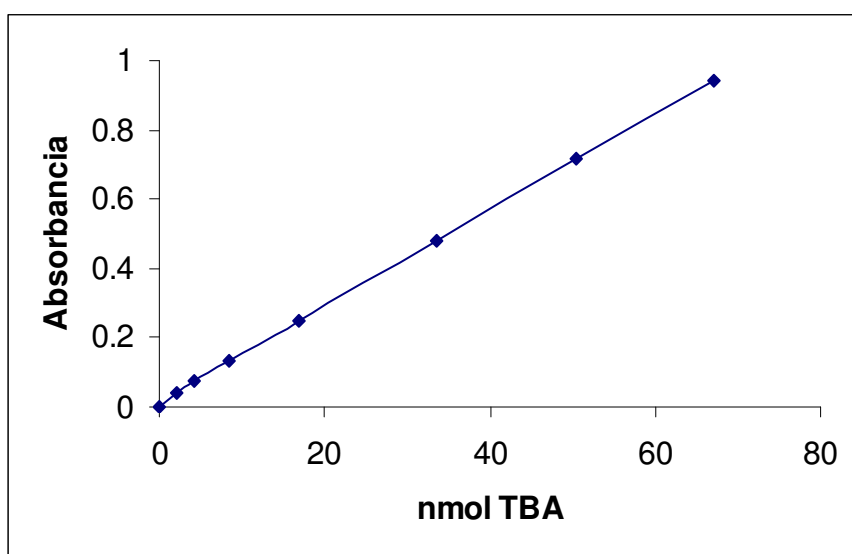
Tabla 1 Absorbancia de nanomoles de TEP a 538 nm

Volumen (µL)	TEP ηmol	Vol. TCA (µL)	Absorbancia (538 nm)
0	0	5000	0
25	2.1	4975	0.0385
50	4.2	4950	0.0735
100	8.4	4900	0.1310
200	16.8	4800	0.2500
400	33.6	4600	0.4790
600	50.4	4400	0.7150
800	67.2	4200	0.9415

- Agitar los tubos usando un vortex.
- Añadir 5 mL de reactivo TBA 0.02 M (mezclar 1 g de propilengalato + 1 g de EDTA + 2.88 g de TBA, solubilizar completando 1 L con agua destilada).
- Asegurar los tubos con cinta teflón y posteriormente taparlos.
- Agitar ligeramente los tubos usando un vortex.

- Luego se llevan los tubos a baño María a 90°C por 40 minutos.
- Dejar enfriar y leer en el espectrofotómetro a 538 nm.

Figura 2. Relación entre nanomoles de TBA y absorbancia



$$r = 0.9998, a = 0.01072597, b = 0.013917308$$

ANEXO 3



Figura 3. Anchoveta luego del proceso de pelado



Figura 4. Obtención de la pulpa de anchoveta



Figura 5. Pulpa antes de la congelación



Figura 6. Pulpa de anchoveta congelada



Figura 7. Trozado de la pulpa de anchoveta



Figura 8. Pulpa de anchoveta congelada y sellada al vacío

ANEXO 4
Análisis univariante

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: **valor peróxido**

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	261,607 ^a	27	9,689	56,169	,000
Intercept	1783,143	1	1783,143	1,034E4	,000
días	87,067	6	14,511	84,123	,000
tratam	54,739	3	18,246	105,775	,000
días * tratam	119,801	18	6,656	38,583	,000
Error	4,830	28	,173		
Total	2049,580	56			
Corrected Total	266,437	55			

a. R Squared = .982 (Adjusted R Squared = .964)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: **Acido**

tiobarbiturico

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	162,234 ^a	27	6,009	55,653	,000
Intercept	281,120	1	281,120	2,604E3	,000
días	91,786	6	15,298	141,690	,000
tratam	29,791	3	9,930	91,976	,000
días * tratam	40,656	18	2,259	20,920	,000
Error	3,023	28	,108		
Total	446,377	56			
Corrected Total	165,257	55			

a. R Squared = .982 (Adjusted R Squared = .964)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: **Ácidos grasos libres**

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	184,726 ^a	27	6,842	474,941	,000
Intercept	741,468	1	741,468	5,147E4	,000
dias	176,855	6	29,476	2,046E3	,000
tratam	2,548	3	,849	58,968	,000
dias * tratam	5,322	18	,296	20,526	,000
Error	,403	28	,014		
Total	926,597	56			
Corrected Total	185,129	55			

a. R Squared = .998 (**Adjusted R Squared = .996**)

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Instituto Nacional de Informática y Estadística (INEI). Lima, 2002
2. Arrue H, Arakaki J. Contribución al estudio de la anchoveta peruana (*Engraulis ringens J.*) para el consumo humano directo: anchoveta sazonada-deshidratada. Anales científicos Universidad Nacional Agraria – La Molina. 1972; X(3-4): 219 – 52
3. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú . Anchoveta peruana: Seguridad Alimentaria para el Futuro. Callao – Perú. 1998; 30 p.
4. Ministerio de la Producción Dirección de Estadística 2004
5. Beckel R, Kingnert H, Lundgren B, Hall G, Walter G. Effect of maillard reaction products on the stability of minced herring in frozen storage. J. Food. Sci. 1985; 50: 501 – 502.
6. Mai J, Kinsella J. Changes in lipid composition of cooked minced carp (*Cyprinus carpio*) during frozen storage. J. Food. Sci. 1979; 44: 1619 – 24.
7. Ke P, Ackman R. Meta - catalyzed oxidation in Mackerel skin and meat lipids. J. Am. Oil. Chem. Society. 1976; 53:636-40.
8. Ashton I.P. Understanding lipid oxidation in fish. In: Bremner A. Safety and quality issues in fish processing. England : Woodhead publishing limited; 2002. p. 1-32.
9. Kurade S, Baranowski A. Prediction of shelf life of frozen minced in terms of oxidative rancidity as measured by TBARS numbers. J.Food.Sci. 1987; 57 (2): 300-2.
10. Sweet C. Research note: Activity of antioxidants in fresh fish. J. Food. Sci. 1973; 38: 1260 – 61.

11. King F. Past, present and future uses of minced fish. *Marine fisheries review* 1977;39 (4):1-4
12. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, editors. *Antioxidantes de los alimentos aplicaciones prácticas*. España : Acribia; 2001
13. Huss HH. *El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad*. Roma: FAO documento técnico de pesca 348; 1998.
14. Aubourg SP Review : Loss of quality during the manufacture of fish products. *Food Sci.Tech. Int.* 2001; 7(3): 199-215.
15. Mehlenbacher V C. *Análisis de grasas y aceites . Tomo 6*. España: Urmo S.A; 1960.
16. International Life Sciences Institute. *Antioxidants: scientific basis, regulatory aspects and industry perspectives*. Summary of workshop held 8-9 february 1996.
17. Hultin HO. Potential lipid oxidation problems in fatty fish processing. In: Davis N. *Fatty fish utilization: Upgrading from feed to food*. UNC Sea grant college program, Raleigh, NC 1988; p. 185 – 221
18. Pazos M, Vicetti R, Wakao A. Estudio de la composición de los lípidos y ácidos grasos de la sardina *Bol. Inv. Inst. Tec. Pes.* 1984; 2(1): 1-24.
19. Mai J, Kinsella J. Changes in lipid components in minced carp. (*cyprinus carpio*) following cooking. *J. Sci. Food .Agric.* 1981; 32: 293 – 99.
20. Hsieh RJ, Kinsella JE. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanism, products, and inhibition with emphasis on fish. *Adv. Food. Nutr. Res.* 1989; 33: 233-341.
21. Frankel E N. Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *JAOCS* 1984; 61 (12): 1908 –17
22. Enser M What is lipid oxidation? *Food. Sci. Tech. Today.* 1987; 1 (3) 151-153

23. Bradley D; Min D. Singlet oxygen oxidation of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1992; 31 (3): 211-36.
24. Shahidi F, Janitha P, Wanasundara P. Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science and nutrition*. 1992; 32(1):67-103.
25. Grinsted M. Types of antioxidants and their historical background. *Boletín técnico* N° 13. 1994; Dinamarca
26. Shibata N. The rancidity of oil in sardine during cold storage. *Bull. Tokai. Reg.Fish. Lab*. 1978; 102(10):51-9
27. Multon J. *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias*. Segunda edición. España: editorial Acibia; 1999.
28. Food and Agriculture Organization. *Food Analysis: General techniques, additives, contaminants and composition*. Food nutrition T14/7. 1986
29. A.O.A.C. 1990. *Peroxide value of Oils and Fats*. 15 th edition
30. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*. 1959;37 : 911-17.
31. Lowry R, Tinsley I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1976; 53: 401 - 72
32. Vyncke W. Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus L.*) *Fette Seifen Anstrich*. 1975;77: 239 – 40
33. ISO 8586-1, 1993. *Sensory analysis- General guidance for selection, training and monitoring of assessors. Part 1: Selected assessors*. International Organization for Standardization. Geneve, Switzerland.

34. ISO 8586-2, 1993. Sensory analysis- General guidance for selection, training and monitoring of assessors. Part 1: Experts. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
35. Karacam H, Boran M. Quality changes in frozen whole and gutted anchovies during storage at -18°C . Int. J. Food .Sci. Tech. 1996; 31: 527-31
36. Farragut R. Effects of some antioxidants and EDTA on the development of rancidity in spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*) during frozen storage. NOAA Technical report NMFS SSRF-650. 1972
37. Kelleher SD, Silva LA, Hultin HO, Wilhelm KA. Inhibition of lipid oxidation during processing of washed, minced atlantic mackerel. J. Food. Sci. 1992; 57(5): 1103-08.
38. Ackman R. Oxidation susceptibility of encapsulated fish oil products: a comparison of triglycerides versus free fatty acids. Omega 3 News Unsaturated fatty acids and health. 1991; 6 (2) :1-5
39. Ulu, H. Evaluation of three 2-thiobarbituric acid methods for the measurement of lipid oxidation in various meats and meat products. Meat Science, 2004; 67, 683-68
40. Sinnhuber R, Yu T. 2-thiobarbituric acid method for the determination for the measurement of rancidity in fishery products. Quantitative determination of malonaldehyde. Food Technol. 1958; 12(1): 9-12
41. Hoyland D, Taylor J. A Review of the Methodology of the 2-Thiobarbituric Acid Test. Food Chemistry 1991; 40: 271-91
42. Molendina K, Regenstein J, Baker R, Steinkraus K. Effects of antioxidants and chelators on the stability of frozen stored mechanically deboned flounder meat from racks after filleting. J. Food. Sci. 1977; 42:759 - 64

43. Siu G, Draper H. A survey retail of the malonaldehyde content of retail meats and fish. J. Food Sci. 1978; 43:1147 – 49.
44. Shamberger R, Shamberger B, Willis C. Malonaldehyde content of food. J. Nutr.1977; 107 : 1404 – 09
45. Crawford D, Law D. A research note. Shelf life stability and acceptance of frozen pacific hake (*Merluccius productus*) fillet portions. J.Food.Sci. 1972; 37:801 –2
46. Salas A, Barriga M, Albrecht M, Castro R. Estabilización oxidativa de la pulpa de jurel (*Trachurus murphyi*) mediante el uso de antioxidantes. Bol. Investig. Ins. Technol. Pesq. 2004; 6 : 9-19.
47. Directiva 95/2 del parlamento Europeo y del Consejo. 20 de febrero de 1995, Relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes (DO L 61 de 18.3.1995, p. 1)
48. CODEX STAN 192-1995 Norma general del Codex para los aditivos alimentarios, Adoptado en 1995. Revisión 1997, 1999, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008.