



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Extracción de compuestos fenólicos a partir de semillas de borraja mediante fluidos supercríticos y evaluación de su efecto en la conservación de la carne de cordero

Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from borage seed and evaluation of their effect on lamb preservation

Autor/es

Alejandro Cacho Gros

Director/es

José Antonio Beltrán Gracia

Facultad de Veterinaria

2017

---

# ÍNDICE

<b>Abstract</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	3
<b>2. Objetivo</b> .....	9
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	10
3.1. Obtención de la harina .....	10
3.2. Obtención de harina liofilizada .....	10
3.3. Extracción de compuestos fenólicos mediante fluido supercrítico (CO <sub>2</sub> ) .....	11
3.4. Preparación del film activo .....	11
3.5. Diseño experimental .....	12
3.6. Material y muestreo .....	12
3.7. Análisis físico-químicos .....	14
<b>3.7.1. Color</b> .....	14
<b>3.7.2. Oxidación lipídica</b> .....	14
<b>3.7.3. Determinación de la capacidad antioxidante</b> .....	15
3.7.3.1. Extracción de los compuestos fenólicos de la carne .....	15
3.7.3.2. Eliminación de radicales libres .....	15
3.8. Análisis estadístico .....	16
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	17
4.1. Rendimiento del extracto de borraja obtenido mediante SFE (extracción por fluidos supercríticos) .....	17
4.2. Análisis físico-químicos .....	18
<b>4.2.1. Color</b> .....	18
<b>4.2.2. Oxidación lipídica</b> .....	20
<b>4.2.3. Eliminación de radicales libres (DPPH)</b> .....	22
<b>5. Conclusiones</b> .....	23
<b>6. Bibliografía</b> .....	24

# **AGRADECIMIENTOS**

Quería dar las gracias.

A José Antonio Beltrán por haberme permitido trabajar en este proyecto, y gracias a ello haber podido adquirir conocimientos sobre una materia muy desconocida para mí.

Me gustaría agradecer también, muy especialmente, a Marc Bellés toda su ayuda y dedicación durante mi estancia en el laboratorio y en la redacción de este trabajo, y por enseñarme tantísimo compartiendo todos sus conocimientos conmigo.

Y por último, pero no menos importante, quiero agradecer a Juan los momentos tan divertidos que me ha hecho pasar en el laboratorio.

Ha sido un gran placer trabajar con vosotros.

# ABSTRACT

Oxidative reactions are the main cause of discoloration and increased rancidity in meat, which means the end of its shelf life.

Because the application of chemical antioxidants in meat has numerous legal restrictions and is also rejected by consumers, the application of natural antioxidant compounds has been under investigation for several years.

In previous studies of the research group we have worked with an extract of borage seed, obtaining good results. However, new technologies, such as fractionation with supercritical fluids, could implement the efficiency of conventional extraction methods. That is why the objective of this work is to obtain an extract of greater efficacy than that achieved with conventional techniques by using supercritical fluids, and to evaluate the effect of said extract at different concentrations on the physical-chemical characteristics of ground meat from Ternasco of Aragon packed in a modified atmosphere (70% O<sub>2</sub> / 30% CO<sub>2</sub>), and stored at refrigeration (4°C ± 1°C) for 6 days.

The samples were divided into three groups assigning different treatments: packed with film without extract, packed with 1% film of extract and packed with 2% film of extract. All the samples were packed in trays with modified atmosphere and stored 24 hours of light a day for 6 days at 4°C ± 1. Physico-chemical analysis were carried out (colour, lipid oxidation and antioxidant capacity). Regarding the colour, the samples treated with borage extract at 1% obtained the highest values in the red index ( $a^*$ ) and the second lowest value in the luminosity values ( $L^*$ ), being the most effective treatment in the preservation of the colour of fresh meat. Regarding lipid oxidation, no significant differences were found between treatments, since all samples showed a marked increase throughout storage. Finally, for the elimination of free radicals a constant inhibition percentage is observed for the treatments with extract throughout the storage, but for the control a marked decrease is observed. According to the results, it could be concluded that the treatment with borage extract at 1% maintained the red colour of the meat with greater effectiveness, but none of the treatments were effective to extend meat shelf life.

## RESUMEN

Las reacciones oxidativas son la principal causa de la decoloración y el aumento de rancidez en la carne, lo que supone el fin de su vida útil.

Debido a que la aplicación de antioxidantes químicos en la carne tiene numerosas restricciones legales y además son rechazados por los consumidores, desde hace varios años se está investigando la aplicación de compuestos antioxidantes naturales.

En estudios previos del grupo de investigación se ha trabajado con un extracto de semilla de borraja, obteniéndose unos buenos resultados. Sin embargo, las nuevas tecnologías, como es el fraccionamiento con fluidos supercríticos, podrían implementar la eficiencia que tienen los métodos convencionales de extracción. Es por ello que el objetivo de este trabajo es obtener un extracto de mayor eficacia que el logrado con técnicas convencionales mediante la utilización de fluidos supercríticos, y evaluar el efecto de dicho extracto a diferentes concentraciones sobre las características físico-químicas de carne picada de Ternasco de Aragón envasadas en atmósfera modificada (70% O<sub>2</sub>/30% CO<sub>2</sub>), y conservadas en refrigeración (4°C±1°C) durante 6 días.

Las muestras se dividieron en tres grupos asignándoles distintos tratamientos: envasadas con film sin extracto, envasadas con film con 1% de extracto de semilla de borraja y envasadas con film con 2% de extracto. Todas las muestras fueron envasadas en bandejas con atmósfera modificada y almacenadas con 24 horas de luz al día durante 6 días a 4°C±1. Se realizaron análisis físico-químicos (color, oxidación lipídica y capacidad antioxidante). Respecto al color, las muestras tratadas con extracto de borraja al 1% obtuvieron los valores más elevados en el índice de rojo ( $a^*$ ) y el segundo valor más bajo en los valores de luminosidad ( $L^*$ ), resultando el tratamiento más efectivo en la conservación del color de la carne fresca. Respecto a la oxidación lipídica, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, ya que todos mostraban un aumento acusado de ésta a lo largo del almacenamiento. Finalmente, para la eliminación de radicales libres se observa un porcentaje de inhibición constante para los tratamientos con extracto a lo largo del almacenamiento, pero para el control se manifiesta un acusado descenso. De acuerdo con los resultados, se puede concluir que el tratamiento con extracto de borraja al 1% mantuvo con mayor efectividad el color rojo de la carne, pero ninguno de los tratamientos fue efectivo para alargar la vida útil de la carne.

# 1. INTRODUCCIÓN

El sector ovino ha sufrido importantes modificaciones a lo largo de las últimas décadas.

A nivel Europeo, los últimos datos de 2013 sitúan a la cabaña ovina española en segundo lugar, con un 20% del total, superado únicamente por Reino Unido con el 27%. España se sitúa también en segundo lugar, por detrás del Reino Unido en cuanto a producción de carne de ovino, representando el 37,5% de la producción final conjunta. Sin embargo hay destacar que desde 2002 la producción de carne de cordero se ha reducido aproximadamente un 50%, lo cual es debido a una gran reducción del consumo. (MAGRAMA, 2013)

Para repuntar este descenso, se han llevado a cabo diferentes estrategias para obtener una mayor calidad en el producto y que el consumidor perciba el valor añadido de este, y así aumentar la predisposición a adquirir la carne. (Wheatley y Chiu, 1977) Estas estrategias se dirigen sobretodo a la seguridad alimentaria y a la calidad organoléptica.

La seguridad alimentaria está muy ligada al desarrollo de microflora bacteriana en el producto. La carne de cordero supone un rico sustrato para el crecimiento de bacterias responsables del deterioro, como *Pseudomonas spp.*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta*, *Aeromonas* (Bell, 2001), patógenos como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli O157:H7*, levaduras como *Candida*, *Torulopsis*, y mohos como *Rhizopus*, *Sporotrichum*, *Fusarium*, *Monilia* and *Aspergillus* (Jay *et al.*, 2005). Estos microorganismos son responsables de olores y sabores desagradables en la carne, suponiendo una limitación de la calidad organoléptica del producto, la cual también es afectada por la oxidación lipídica. Así pues, el desarrollo de microorganismos y la oxidación lipídica son los principales determinantes de la vida útil de la carne fresca. Ésta se entiende como el periodo de tiempo que transcurre desde el envasado del producto hasta su uso, en el que la apariencia, textura, flavor, color y valor nutritivo se mantienen aceptables para el consumidor (Singh y Singh, 2005).

El color es una de las características que más influencia tiene sobre la percepción de la calidad, valor y frescura de la carne por parte del comprador. Éste depende de la mioglobina, la cual es responsable del transporte y almacenamiento del oxígeno en el tejido muscular. Por ello el cambio de color de la carne puede ser atribuido a la oxidación u oxigenación del pigmento mioglobina. En la carne de cordero fresca, su color rojo característico alcanza su valor más bajo a los 3 días de almacenamiento en refrigeración sin envasado, habiendo comenzado la

oxidación de la mioglobina que produce un cambio de color de la superficie de la carne de rojo a marrón (Jacob *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que la oxidación de la mioglobina está relacionada con la oxidación lipídica (Faustman *et al.*, 2010). El grado de oxidación lipídica es directamente proporcional a la concentración de oxígeno presente. Sin embargo la estabilidad de la mioglobina se ve favorecida en ambientes ricos en oxígeno. Por lo tanto, en un envasado rico en oxígeno, la mioglobina se mantendría estable y el color rojo de la carne se mantendría más tiempo, pero por otro lado la oxidación lipídica aumentaría y se perdería calidad en el producto. Una manera de retardar la oxidación podría ser la adición de antioxidantes a la carne.

Durante mucho tiempo se han utilizado antioxidantes sintéticos, pero su uso ha disminuido debido a su posible carcinogenicidad (Chen *et al.*, 1992) y al rechazo general que existe por parte del consumidor. Estos hechos han propiciado diversos estudios de las propiedades antioxidantes de compuestos naturales, mayoritariamente plantas y especias, las cuales han sido utilizadas a lo largo de la historia como conservantes de alimentos (Shahidi *et al.*, 1992).

La borraja (*Borago officinalis* L.) es una planta herbácea anual nativa de Europa y el norte de África, que se cultiva para usos medicinales y culinarios, y comercialmente para producir aceite de semilla de borraja.

Tiene propiedades nutritivas de gran interés. De hecho, ha ganado importancia gracias a su composición en ácidos grasos, particularmente el  $\gamma$ -linoleico del aceite de sus semillas, el cual supone entre un 30% y un 40% de dicho aceite.

Sin embargo, el conocimiento acerca de las propiedades antioxidantes de la borraja es muy escaso. Así que recientemente se ha llevado a cabo una extensa investigación centrada en las propiedades antioxidantes de los extractos de borraja. Estos muestran una excelente actividad antioxidante, la cual es atribuida a sus constituyentes fenólicos. Se ha determinado que el ácido rosmarínico es el compuesto fenólico principal disponible en el extracto de semilla de borraja. Bandoniense y Murkovic (2002) mostraron la presencia de este ácido en las hojas de borraja. Wettasinghe *et al.* (2001) también identificaron ácido rosmarínico en semillas de borraja.

Estos antioxidantes pueden concentrarse, y ser utilizados para alargar la vida útil de algunos alimentos.

La oxidación de la grasa es una de las principales razones de la disminución en la calidad de los alimentos grasos. Este proceso afecta al color, flavor, y valor nutricional de dichos alimentos (Redden *et al.*, 1995). Los radicales libres como superóxido, hidroxilo, hidroperoxilo y óxido nítrico pueden causar la oxidación de las grasas (Halliwell y Gutteridge, 1999). El uso de antioxidantes sintéticos en los alimentos podría retrasar la oxidación, pero su uso en los productos alimenticios está sujeto a limitaciones mediante ciertas reglas, ya que estos compuestos tienen potencial no saludable. Esto nos hace preferir los antioxidantes naturales en lugar de los sintéticos.

Muchos antioxidantes naturales ya se han extraído de diferentes tipos de materiales vegetales como semillas oleaginosas, hortalizas, hojas, raíces, especias, cereales y hojas de plantas (Hettiarachchy *et al.*, 1996). Entre los antioxidantes naturales, los antioxidantes fenólicos están ampliamente disponibles en las plantas (Asadi-Samani *et al.*, 2013; Rafieian-Kopaei *et al.*, 2013). El aceite de borraja, como se ha comentado anteriormente, es rico en ácido  $\gamma$ -linoleico, el cual posee una alta resistencia a la oxidación. Esta resistencia se debe a la existencia de tocoferoles y varios compuestos fenólicos en los tejidos que contienen aceite. Cuando se extrae aceite, antioxidantes como los tocoferoles se extraen con este, y son los principales factores en la protección del mismo (Wettasinghe *et al.*, 2001). La harina de borraja contiene grandes cantidades de compuestos fenólicos después de extraer el aceite. Estos antioxidantes se pueden concentrar como extractos en bruto o ser utilizados como compuestos fenólicos en aceites insaturados como los aceites de semillas. La harina de borraja y sus extractos tienen propiedades antioxidantes, dependiendo la concentración. Los productos que contienen una alta cantidad de antioxidante se pueden obtener de la harina de borraja en condiciones óptimas. La capacidad de este extracto para retrasar la oxidación de la grasa se atribuye a los compuestos fenólicos para eliminar especies reactivas de oxígeno. El extracto de borraja se puede agregar a los aceites y productos cárnicos en lugar de antioxidantes para retrasar la oxidación de grasas (Ciriano *et al.*, 2009).

La capacidad del extracto de borraja para eliminar las especies de oxígeno reactivo y el radical DPPH, podría utilizarse como fármaco relativo para tratar enfermedades relacionadas con los radicales libres que podrían dañar los tejidos (Wettasinghe *et al.*, 2002).

Un método por el cual se podría extraer, de una manera eficiente, dichos antioxidantes, es mediante la técnica de extracción por fluidos supercríticos (SFE), la cual se caracteriza por el



uso del solvente bajo presión y temperatura por encima de sus valores críticos. Gracias a ello se puede disponer de varias combinaciones de las propiedades extractivas (Casas *et al.* 2008).

SFE es una alternativa a los procesos convencionales como hidrodestilación, la destilación de vapor y la extracción con disolvente (Uquiche *et al.*, 2012). La aplicación a escala industrial de esta técnica comprende, entre otros procesos, la extracción de aceites esenciales, oleorresinas y compuestos aromatizantes de hierbas y especias; extracción de compuestos bioactivos de alto valor de diferentes matrices naturales; y extracción y fraccionamiento de aceites comestibles (Brunner, 2005).

Sin embargo una planta de SFE tiene un alto costo de inversión, en comparación con las técnicas tradicionales de extracción a presión atmosférica. Este sería un asunto de interés para un ingeniero de procesos, ya que una comprensión profunda de la física del proceso junto con el desarrollo de modelos matemáticos superiores para la simulación del rendimiento de extracción de componentes naturales a partir de materiales vegetales como función de parámetros operativos, puede ayudar a disminuir el costo de producción del funcionamiento efectivo del proceso (Sovova 1994, 2005). La extracción de soluto a partir de productos naturales, tales como hojas, raíces, semillas y otros materiales, tiene lugar mediante una serie de pasos de transferencia de masa que forman todos juntos un mecanismo. En primer lugar, las moléculas de solvente supercrítico se transportan desde el disolvente a la superficie de las partículas a través de la capa límite adyacente a la superficie de las partículas. Posteriormente, las moléculas de disolvente penetran a través de los poros de la partícula, y las moléculas de soluto, que están unidas a la matriz sólida por fuerzas de Van der Waals y / o fuerzas químicas, se transfieren a la fase disolvente por disolución o desorción. Entonces las moléculas de disolvente se difunden a la superficie sólida y se mueven a través de la película inactiva alrededor de la partícula en la fase fluida (Amit *et al.*, 2017).

Varios compuestos han sido examinados como disolventes de SFE. Por ejemplo, hidrocarburos tales como hexano, pentano y butano, óxido nitroso, hexafluoruro de azufre e hidrocarburos fluorados (Reverchon y De Marco, 2006). Sin embargo el solvente de extracción más utilizado es el CO<sub>2</sub> porque es seguro, fácilmente disponible y tiene un bajo costo. Con él se pueden obtener compuestos naturales sin daños oxidativos y lumínicos, debido a que el proceso de extracción se puede llevar a cabo con protección contra la luz y las condiciones anóxicas en un sistema cerrado. Mientras que algunos disolventes orgánicos pueden suponer una fuente de contaminación nociva, la extracción mediante CO<sub>2</sub> supercrítico tiene la ventaja de ser

inofensiva y no tóxica para el cuerpo humano. Ello es debido a que el CO<sub>2</sub> puede convertirse en vapor después de la despresurización y no queda en los extractos. Otro mérito de la extracción con fluidos supercríticos, es controlar la potencia del disolvente mediante la regulación de la temperatura, presión y densidad de dicho fluido. Aunque los disolventes orgánicos son vaporizados por evaporación después del proceso de extracción, la extracción de CO<sub>2</sub> necesita un único proceso de despresurización para obtener extractos, lo cual es otra ventaja para este tipo de extracción (Oba *et al.*, 2017)

La separación fraccionada de los extractos es un concepto que puede ser útil para mejorar la selectividad del proceso SFE. En muchos casos, no es posible evitar la coextracción de algunas familias de compuestos (con diferentes solubilidades, pero también con diferentes resistencias de transferencia de masa en la materia prima). En estos casos, es posible realizar una extracción en pasos sucesivos a presiones crecientes para obtener la extracción fraccionada de los compuestos solubles contenidos en la matriz orgánica, seleccionada por disminución de solubilidades en el solvente supercrítico. La separación fraccionada permite el fraccionamiento de los extractos de fluidos supercríticos. El fin de esta operación es inducir la precipitación selectiva de diferentes familias de compuestos en función de sus diferentes condiciones de saturación en el fluido supercrítico. Por ejemplo, este procedimiento se ha aplicado en el SFE de aceites esenciales.

En varios casos, el material de partida es una mezcla líquida. El proceso se aplica es la extracción líquida continua realizada en una torre empacada. Cabe destacar que mientras la extracción de sólidos es una operación discontinua, la torre empacada es capaz de realizar la operación continua en estado estacionario que permite el procesamiento de grandes cantidades de mezclas líquidas en un aparato relativamente pequeño y en poco tiempo.

En otros casos, el material a tratar es una mezcla líquida que contiene compuestos sólidos disueltos. La extracción de estos compuestos de la solución líquida no puede realizarse en una torre empacada, ya que la materia sólida precipitará sobre los envases y no será posible extraer el lecho fijo. En este caso, se debe adoptar un procedimiento de extracción supercrítica de antisolvente (SAE). Las condiciones previas para la aplicación de la extracción antisolvente son similares a las características de la micronización antisolvente supercrítica (SAS): el disolvente líquido tiene que ser muy soluble en CO<sub>2</sub> supercrítico, mientras que los sólidos tienen que ser completamente insolubles en el fluido supercrítico. El fin del proceso no es la micronización, sino la extracción selectiva de los compuestos sólidos. Estas condiciones

pueden obtenerse con frecuencia ya que muchos disolventes orgánicos son fácilmente solubles en CO<sub>2</sub> supercrítico.

Debido a la complejidad estructural y variabilidad de los materiales a tratar y de la gran variedad de compuestos que pueden extraerse, estos procesos están lejos de considerarse estudiados profundamente, aunque ya se han desarrollado algunas aplicaciones industriales. Además, se ha observado un creciente interés en la extracción de sustancias de alto valor añadido, tales como antioxidantes, productos farmacéuticos y colorantes (Reverchon y De Marco, 2006).

Debido a que no está permitida la adición de antioxidantes sobre alimentos no elaborados (RDL 142/2002), una posible alternativa para aplicar dichos antioxidantes sobre la carne, es realizarlo a través del envasado activo.

El envasado cumple un papel importante en el proceso porque es el paso final en la producción de alimentos. El envasado activo, la nueva generación de envases de alimentos, está ganando interés entre los investigadores y en la industria. Investigaciones actuales en el envasado activo se han centrado en el uso de antioxidantes naturales y/o agentes antimicrobianos en los materiales de envasado (Siripatrawan y Noipha, 2012). La película podría servir como una barrera para reducir las modificaciones en el color y la textura.

El quitosano es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. Es un polisacárido catiónico obtenido por desacetilación de la quitina, que se encuentra principalmente en los exoesqueletos de los crustáceos (Agulló *et al.*, 2003). El quitosano tiene gran interés como componente para la producción de film de envasado biodegradable, debido a sus propiedades antimicrobianas y filmógenas (Dutta *et al.*, 2009). Los films de quitosano se pueden preparar mediante métodos de colada en solución. Los films exhiben excelentes propiedades de barrera para aplicaciones de envasado de alimentos. Estudios previos han indicado que los films compuestos de quitosano, incorporados con compuestos activos naturales, ofrecen un sistema muy prometedor para la mejora de la calidad y conservación de los alimentos durante el almacenamiento. Vargas *et al.* desarrollaron nuevos films comestibles basados en quitosano, incorporados con aceite de girasol para la conservación de hamburguesas de carne de cerdo (Vargas *et al.*, 2011).

## **2. OBJETIVO**

En este trabajo se pretenden lograr dos objetivos:

- Obtener un extracto de borraja de mayor eficacia que el logrado con técnicas convencionales, mediante la utilización de fluidos supercríticos
- Evaluar el efecto que tiene sobre los análisis físico-químicos (color, oxidación lipídica y capacidad antioxidante), la aplicación de un antioxidante natural (extracto de borraja) a través del envasado activo a diferentes concentraciones (1% y 2%), sobre carne picada de Ternasco de Aragón, con el fin de reducir la oxidación lipídica y mejorar la conservación del color rojo característico de la carne fresca y poder alargar así la vida útil del producto.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Obtención de la harina

La harina se obtuvo a partir de semillas de borraja adquiridas en Semillas Fitó. Estas se machacaron en un mortero para conseguir separar la cáscara y el endospermo, donde se encuentran los compuestos fenólicos y por lo tanto, es el material que se utilizará para obtener la harina. A continuación se vierten las semillas machacadas en un vaso de precipitado de 1000mL, y se le añade hexano, para separar las diferentes fases, en una proporción 1:3 (p/v). Se homogeniza con un Ultra-Turrax T-25, se deja precipitar durante 2 minutos y el sobrenadante se lleva a centrifugar a 4000rpm, durante 15 minutos y a 10°C. Se extrae el precipitado y se macera con hexano para desgrasarlo, en una proporción 1:10 (p/v), durante 48h (renovando el hexano a las 24h).

### 3.2. Obtención de harina liofilizada

Se disuelve la harina desgrasada con agua, en una proporción 1:5 (60gr de harina/300mL de agua), y se deja en agitación durante 24h. Tras esto, se filtra la disolución dos veces. Finalmente el filtrado se distribuye en bandejas de aluminio (entre 65mL y 75mL por bandeja), y se introducen en un equipo de liofilización Heto Loteen FAB E1-Shelves, produciéndose un secado primario a -20°C y un secado secundario a 5°C, completando el ciclo en 24 horas. Finalmente se obtuvieron 2,1gr de harina liofilizada.



*Liofilizador Heto Loteen FAB E1-Shelves*

### 3.3. Extracción de compuestos fenólicos mediante fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>)

Los 2,1gr de harina liofilizada se disuelven en etanol.

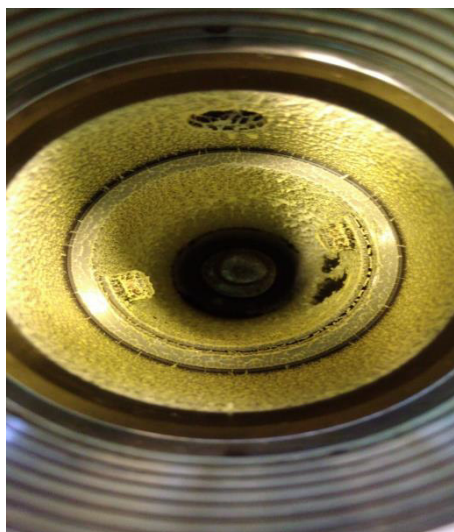
Se deposita la disolución en el reservorio del equipo de extracción, el cual contiene un filtro, y se inicia el proceso en las siguientes condiciones de trabajo:

- **Caudal de trabajo de CO<sub>2</sub>:** 20gr/min
- **Presión de trabajo:** 150bar
- **Caudal de cosolvente:** 0,45ml/min (etanol)
- **Temperatura de trabajo:** 40°C

Recoger cada 15 min el expurgo en la salida del colector.

Se termina el proceso de la SFE (extracción mediante fluido supercrítico), cuando la muestra se esté agotando en el reservorio.

Se añaden 15mL de cosolvente (etanol en este caso). Se toman 3 o 4 recogidas más del expurgo para asegurar que se recoge todo lo que pudiera quedar en el tramo entre el reactor de precipitación y el reservorio. Una vez finalizado, se recoge todo el extracto que haya tanto en la cámara como en el expurgo.



*Extracto en cámara*



*Extracto total recuperado*

### 3.4. Preparación del film activo

Tal y como se ha indicado en el Resumen, estudios previos realizados en este mismo grupo de investigación determinaron la actividad antioxidante del extracto de borraja. El poder antioxidante se expresó como mg de ácido gálico/g de extracto, obteniendo así una media de 90

mg de ácido gálico/g de extracto. En base a este dato, se utilizaron concentraciones de 1% y 2% de extracto de borraja. Las diluciones de los extractos se realizaron en condiciones de esterilidad, utilizando agua destilada estéril y extracto esterilizado por filtración con filtros para jeringa (Membrana de acetato de celulosa 0,2 µm, VWR International).

Se adquirió quitosano en polvo de cáscaras de cangrejo en Sigma-Aldrich. La harina de borraja se obtuvo de la manera indicada en el apartado 3.1. Se preparó una solución de quitosano al 2% (p/v) disolviendo quitosano en una solución acuosa de ácido acético al 1% (v/v). Seguidamente se añadió 0,5% (p/v) de glicerol a la solución de quitosano para mejorar su flexibilidad y extensibilidad. Las soluciones formadoras de film se prepararon mezclando la solución de quitosano y la solución de extracto de borraja en una relación en peso de 1:1. Una vez realizada la mezcla, esta se extendió en bandejas de teflón y se pusieron a secar en una estufa a 35°C.

### 3.5. Diseño Experimental

Se consideraron como factores fijos del experimento: el envasado en atmósfera modificada 70/30 (70% O<sub>2</sub> y 30% CO<sub>2</sub>), la conservación en vitrinas refrigeradas a 4°C con iluminación artificial durante 24 horas al día y el corte de la carne (pierna). Los factores a estudio fueron la aplicación de un film con extracto de borraja (a diferentes concentraciones) en el envasado de la carne, y el tiempo de almacenamiento, siguiendo el diseño:

Corte carne	Tratamiento	Temperatura	Tiempo de almacenamiento	Tamaño de muestra	Envasado	Análisis realizados
Picada	Control	4°C	0, 1, 2, 3 y 6 días	n=1	70/30	Físico-químico
Picada	Borraja 1%	4°C	0, 1, 2, 3 y 6 días	n=1	70/30	Físico-químico
Picada	Borraja 2%	4°C	0, 1, 2, 3 y 6 días	n=1	70/30	Físico-químico

### 3.6. Material y muestreo

El animal utilizado en el estudio pertenecía a la raza Rasa Aragonesa, una raza rústica de tamaño medio y aptitud cárnica autóctona de la región. El animal, criado bajo condiciones intensivas, se alimentó con leche materna hasta los 40 días de edad y, posteriormente, con

concentrado y paja de cereal *ad libitum* hasta que alcanzó un peso comprendido entre 20 y 25 kg. El cordero se sacrificó con aproximadamente tres meses de edad en el matadero de Mercazaragoza, siguiendo los protocolos estándar de la UE. Tras aproximadamente 15 minutos de faenado, la canal, con un peso comprendido entre 8 y 12 kg, se transportó a las instalaciones de Casa de Ganaderos y Franco y Navarro S. A., donde se refrigeró durante 24 h ( $4 \pm 0.5$  °C, 90 % HR, 1-2 m/s). Tras la refrigeración de la canal se procedió al despiece de la misma, utilizando únicamente las piernas para el estudio. El picado de las mismas se realizó en la Planta Piloto de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.



*Picado de la carne de cordero*

Una vez distribuida la carne picada en bloques de 70gr, se procedió a envasarla mediante una Ulma Smart-500. Se utilizaron bandejas de poliestireno expandido y atmósfera (70% O<sub>2</sub> / 30% CO<sub>2</sub>), el sellado de las mismas se realizó con un film laminado de polietileno y poliamida. Tras envasarlas se procedió a su almacenamiento en refrigeración (4°C) en las vitrinas refrigeradas de la Planta Piloto de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, con iluminación artificial durante 24 horas al día. A los 0, 1, 2, 3 y 6 días de almacenamiento se realizaron los análisis físico-químicos de las muestras de cada tratamiento.



*Carne picada envasada con film activo*



### **3.7. Análisis físico-químicos**

#### **3.7.1. Color**

El color fue medido en la superficie de cada muestra de carne picada, mediante un espectrofotómetro de reflectancia (Minolta CM-2002; Osaka, Japón). Los parámetros medidos fueron:  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (índice de rojo),  $b^*$  (índice de amarillo); según la CIE (Comission International d'Eclairage) (CIE, 1976). Se realizaron 5 mediciones en cada muestra. El equipo se calibró antes de cada sesión, limpiando la lente con etanol entre muestras

#### **3.7.2. Oxidación lipídica**

La medida de la oxidación lipídica se llevó a cabo por la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acuerdo con el método descrito por Pfalzgraf *et al.* (1995). Se homogeneizaron 10g de carne picada con 20ml de ácido tricloracético (TCA 10%) en tubos de centrifuga de plástico en un Ultra-Turrax T-25 basic, unos 30 segundos a 20.000rpm aproximadamente. Los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 4000rpm a 10°C en una centrifuga refrigerada Jouan CR 411. Después de la filtración, se tomaron 2ml del filtrado y se añadieron a un tubo que contenía 2ml de una solución 20mM de ácido tiobarbitúrico (TBA) recién preparada. Los tubos se homogenizaron con rotatubos durante 30 segundos y luego se incubaron a una temperatura de 97°C durante 20 minutos en un baño de agua termostático Grant W14. A continuación los tubos se enfriaron en agua hasta alcanzar la temperatura ambiente para proceder a su lectura. La lectura de las absorbancias se realizó a 532nm mediante un espectrofotómetro ONDA UV-20, previamente calibrado mediante un blanco (2ml de TBA + 2ml de agua destilada).

Los resultados fueron calculados mediante una curva patrón usando 1,1,3,3-trametoxipropano (TMP). Se usó esta sustancia ya que el malonaldehído puede obtenerse por hidrólisis ácida del TMP en una reacción equimolecular. Las medidas fueron expresadas como sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) en mg de malonaldehído/kg de muestra.

### **3.7.3. Determinación de la capacidad antioxidante**

#### ***3.7.3.1. Extracción de los compuestos fenólicos de la carne***

Es el paso previo para evaluar la capacidad antioxidante de la carne enriquecida con compuestos antioxidantes. La extracción se realizó con metanol siguiendo la metodología descrita por Vital et al. (2016). De acuerdo con esta, 5g de carne se homogeneizaron con 10ml de metanol (Merck, Darmstadt, Alemania) mediante un Ultra-Turrax T-25, durante 2 minutos. Tras centrifugar durante 15 minutos a 4000rpm se procedió al filtrado de las muestras, recuperando el sobrenadante. Este sobrenadante fue el que se utilizó para las pruebas descritas a continuación.

#### ***3.7.3.2. Eliminación de radicales libres***

La capacidad de eliminación de radicales libres se evaluó mediante la técnica DPPH siguiendo la metodología descrita por Vital et al. (2016). 100 µl de la muestra se homogeneizaron con 1,9 ml de solución DPPH 0,06mM de Sigma-Aldrich (en metanol) y se incubó la mezcla 30 minutos en oscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia con un espectrofotómetro ONDA UV-20 a 515nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ inhibición} = \left( \frac{(A \text{ muestra} - A \text{ control})}{A \text{ control}} \right) \times 100$$



*Espectrofotómetro ONDA UV-20*

### **3.8. Análisis estadístico**

En este trabajo de investigación todos los datos fueron analizados estadísticamente mediante el programa estadístico SPSS. El modelo utilizado incluyó los factores tiempo de conservación y tratamiento como efectos principales y la interacción entre ellos. Las diferencias se consideraron significativas si  $P \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

En este apartado se estudia el efecto de los films con extracto de borraja, en carne de cordero picada, sobre los parámetros de calidad de dicha carne a lo largo del periodo de almacenamiento. Debido a que existe una interacción significativa entre los efectos en todos los parámetros estudiados, los resultados se presentan por días de almacenamiento y por tratamiento, de manera que se puedan apreciar los cambios que se producen en la calidad de la carne durante el tiempo de almacenamiento en cada tratamiento.

En primer lugar se presentan los resultados obtenidos para la extracción mediante fluido supercrítico, y a continuación se describen los resultados referentes a los análisis físico-químicos.

### 4.1. Rendimiento del extracto de borraja obtenido mediante SFE (fluido supercrítico)

Como se puede observar en la Tabla 1, se calculó el rendimiento obtenido de la SFE. Estos resultados reflejan un rendimiento más bajo de lo esperado, ya que un rendimiento del 55,49% no es suficiente para la cantidad de trabajo y tiempo que supone obtener 2,1gr de harina liofilizada. Así pues se consideró que la SFE no era un método viable para obtener los antioxidantes del extracto de borraja, y se optó por utilizar la harina de semilla de borraja desgrasada directamente aplicada a envasado activo.

Sabiendo que en el equipo se han introducido 1,91gr de harina liofilizada, de los 2,1gr iniciales, debido a que en el filtro han quedado retenidos 0,19gr, se obtuvo lo siguiente:

**Tabla 1**

	Vial con extracto de cámara	Vial con extracto del colector
Masa del vial (gr)	14,37286	14,42542
Masa del vial con extracto (gr)	15,31543	14,54543
Masa del extracto (gr)	0,94257	0,12001

Finalmente se calcularon los rendimientos:

- Rendimiento del extracto en cámara:  $(0,94/1,91)*100= 49,21\%$

- Rendimiento del extracto en el colector:  $(0,12/1,91)*100= 6,28\%$
- **Rendimiento total:  $49,32\% + 6,28\%= 55,49\%$**

## 4.2. Análisis físico-químicos

### 4.2.1. Color

Los valores de luminosidad ( $L^*$  CIELab) obtenidos durante el experimento se muestran en la Tabla 2, donde se puede observar la evolución de este parámetro a lo largo del tiempo de almacenamiento. En general, se aprecian unos valores más o menos constantes a lo largo del almacenamiento.

Se aprecia que el incremento de luminosidad más acusado se observa en el control, aunque a pesar de ello no es un incremento significativo ( $P=0,349$ ). Este incremento de la luminosidad podría deberse a un aumento en la oxidación de la mioglobina, ya que su oxidación produce un cambio de color de la superficie de la carne de rojo a marrón (Jacob *et al.*, 2013) que se ve reflejado en un aumento de los valores de  $L^*$  y una disminución en los valores de índice de rojo ( $a^*$  CIELab). Como se verá más adelante este tratamiento presenta también elevados valores para la oxidación lipídica. Estos dos resultados podrían relacionarse entre sí, puesto que las reacciones bioquímicas responsables de la oxidación lipídica están relacionadas con la oxidación de la mioglobina y viceversa (Greene, 1969).

Los tratamientos con extracto de borraja al 1% y 2% presentan unos valores muy similares a lo largo de los 6 días, y a su vez inferiores al control.

**Tabla 2**

Evolución de la luminosidad ( $L^*$ ) de la carne, para las diferentes concentraciones de extracto, a lo largo de 6 días de almacenamiento.

Días/ Tratamiento	0	1	2	3	6	P
<b>Control</b>	45,10±3,97	42,13±3,99	36,49±0,10	40,11±4,40	45,39±6,75	0,349
<b>1% Borraja</b>	-	38,42±2,63	35,43±0,70	39,97±5,93	37,15±4,45	0,715
<b>2% Borraja</b>	-	36,65±3,89	36,21±1,03	41,17±1,51	36,54±6,51	0,585
<b>P</b>	-	0,407	0,325	0,956	0,379	-

En cuanto al índice de rojo ( $a^*$  CIELab), en la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para dicho índice. Seguramente es el parámetro del color más importante en cuanto a la carne de cordero, ya que se suele asociar el color rojo con la frescura (Morrissey *et al.*, 1994). En el otro extremo del espectro del rojo se sitúa el color verde, el cual suele asociarse con carne en mal estado. El cambio de color rojo de la carne fresca a verde, puede tener relación con la producción bacteriana de ácido sulfhídrico que transforma la mioglobina en sulfomioglobina (Borch *et al.*, 1996).

En la Tabla 3 podemos observar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos a lo largo de los 6 días. Observando la evolución en el tiempo de los tratamientos, se aprecia un marcado descenso progresivo de los valores de  $a^*$  durante el almacenamiento. Un comportamiento similar fue descrito por Nieto *et al.* (2010), en un estudio en el que se introdujo romero en la dieta de ovejas en gestación y se analizó el efecto que esto tenía sobre la calidad de la carne del cordero. Sus resultados muestran una disminución progresiva en el tiempo de los valores del índice de rojo de la carne de cordero envasada en atmósfera protectora (70% O<sub>2</sub> / 30% CO<sub>2</sub>) y almacenada en refrigeración a 4°C hasta 21 días.

La pérdida más notable del color rojo ( $P=0,008$ ) corresponde al control, ya que pierde casi 12 puntos en el valor de  $a^*$  desde el día 0 hasta el día 6 de almacenamiento. Tal y como se ha mencionado en el análisis de la luminosidad, el control es el que mostraba unos valores mayores, lo que se podría relacionar con una mayor oxidación de la mioglobina. Por otro lado, el tratamiento con 1% de extracto de borraja es el que resultó más efectivo en la conservación del índice de rojo a lo largo del tiempo de almacenamiento, con una disminución ( $P=0,083$ ) de 6,5 puntos desde el día 1 hasta el día 6.

El tratamiento con 2% de extracto de borraja es menos efectivo que el tratamiento al 1%, ya que este disminuye ( $P=0,024$ ) en más de 7 puntos el valor inicial en el día 1 hasta llegar al día 6. A pesar de ello, sigue presentando valores bastante superiores al control.

Si se comparan los tratamientos con extracto de borraja con el control, se observa que los tratamientos obtienen mayores valores de  $a^*$ . Esto sugiere que el extracto de borraja tiene cierta efectividad para conservar el color rojo de la carne fresca.

Sánchez- Escalante *et al.* (2003) estudiaron la influencia del tratamiento de hamburguesas de ternera con extracto de borraja en el color de la carne. En dicho estudio se encontraron valores de  $a^*$  más elevados en las muestras tratadas con extracto de borraja que en las muestras control.

**Tabla 3**

Evolución del índice de rojo ( $a^*$ ) de la carne, para las diferentes concentraciones de extracto, a lo largo de 6 días de almacenamiento.

Días/ Tratamiento	0	1	2	3	6	P
<b>Control</b>	18,27±1,00	18,19±3,36	16,96±2,18	12,69±1,10	6,57±0,55	0,008
<b>1% Borraja</b>	-	18,06±2,41	16,49±0,07	16,83±2,60	11,50±1,24	0,083
<b>2% Borraja</b>	-	17,59±1,75	16,39±2,06	15,15±0,73	10,27±0,43	0,024
<b>P</b>	-	0,971	0,943	0,188	0,019	-

#### **4.2.2 Oxidación lipídica**

Como se puede observar en la Tabla 4, la evolución de la oxidación lipídica es muy parecida entre los distintos tratamientos a lo largo del tiempo de almacenamiento. A simple vista se aprecia que los dos tratamientos y el control tienen unos valores significativamente superiores (Control:  $P=0,000$ ; 1%Borraja:  $P=0,006$ ; 2%Borraja:  $P=0,000$ ) al final del experimento, respecto del inicio.

A diferencia de lo observado por Martínez *et al.* (2006) en un estudio realizado con salchichas frescas de cerdo tratadas con diferentes extractos de antioxidantes naturales entre los que se encontraba el extracto de borraja, en el cual las muestras tratadas con dicho extracto obtuvieron niveles mínimos de oxidación lipídica y se observó un mayor poder antioxidante cuando mayor era la concentración del extracto en ambos casos, en este caso no se obtuvieron niveles mínimos de oxidación lipídica y además el menor poder antioxidante se observó en el tratamiento de mayor concentración.

En el día 3 se observa una clara diferenciación entre tratamientos, ya que el tratamiento con 2% de extracto está por encima del resto (2,47mgMDA/kg). Según Greene y Cumuze (1981), es necesario un rango entre 0,6 y 2 mg malonaldehído/kg (mgMDA/kg) para que los consumidores sean capaces de detectar la rancidez. Aunque por otro lado Tarladgis *et al.* (1960) determinaron un rango de entre 0,5 y 1 mgMDA/kg como valores detectables por catadores expertos. Durante el tiempo de almacenamiento, las diferencias entre tratamientos se hacen más notables. Para el día 6, las diferencias entre tratamientos siguen existiendo, aunque todos tienen unos valores muy por encima de 2 mgMDA/kg. Estos datos son similares a los obtenidos por Camo *et al.* (2008) que cuantificaron más de 4 mgMDA/kg en carne de cordero conservada en una atmósfera con un 70% de oxígeno a los 9 días de almacenamiento en refrigeración.

Dichas similitudes entre resultados obtenidos en ambos estudios podrían ser atribuidas al papel clave del oxígeno a la hora de favorecer los procesos oxidativos (O`Grady *et al.*, 2000), lo que justificaría que la carne almacenada con mayor concentración de oxígeno presente mayor oxidación, añadiendo a esto que la carne picada presenta mayor superficie de contacto a la oxidación.

Así pues, entre el control y los tratamientos con extracto de borraja al 1% y 2% no existen diferencias significativas en cuanto a oxidación lipídica.

#### Tabla 4

Evolución de la oxidación lipídica de la carne, medida en mg de malonaldehído/kg (mgMDA/kg) para las diferentes concentraciones de extracto, a lo largo de 6 días de almacenamiento.

Días/ Tratamiento	0	1	2	3	6	P
<b>Control</b>	0,26±0,09	1,26±0,11	1,86±0,05	1,92±0,08	3,31±0,43	0,000
<b>1% Borraja</b>	-	1,25±0,07	1,89±0,04	2,09±0,30	2,95±0,45	0,006
<b>2% Borraja</b>	-	1,20±0,78	1,91±0,07	2,47±0,02	3,75±0,11	0,000
<b>P</b>	-	0,789	0,671	0,116	0,238	-



### **4.2.3. Eliminación de radicales libres (DPPH)**

Tal y como se muestra en la Tabla 5, la evolución en el porcentaje de inhibición para los tratamientos con extracto de borraja, a lo largo del almacenamiento, es muy parecida. Sin embargo, estos resultados difieren mucho con los obtenidos para el control, el cual muestra un importante descenso en el porcentaje de inhibición de radicales libres (más de 5%).

Así pues, observando los resultados se podría decir que ha existido una pequeña migración de antioxidantes desde el film activo a la carne, ya que en los tratamientos con extracto el porcentaje de inhibición se mantiene prácticamente constante a lo largo del tiempo.

Esta migración tan baja puede ser debida a que los antioxidantes quedan muy retenidos en la red molecular del film de quitosano.

**Tabla 5**

Eliminación de radicales libres de la carne, medida en % de inhibición, para las diferentes concentraciones de extracto, a lo largo de 6 días de almacenamiento.

<b>Días/ Tratamiento</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>P</b>
<b>Control</b>	9,8±0,71	11,50±4,38	9,35±0,49	9,05±0,08	6,85±1,20	0,382
<b>1% Borraja</b>	-	9,90±3,25	10,70±1,13	9,30±0,30	9,20±0,99	0,828
<b>2% Borraja</b>	-	9,35±1,91	10,00±0,42	9,55±0,02	9,50±0,99	0,908
<b>P</b>	-	0,812	0,336	0,230	0,118	-

## 5. CONCLUSIONES

Tras analizar los resultados, y en las condiciones que se ha desarrollado esta investigación, se puede concluir que:

- Los tratamientos con extracto de borraja mantienen el color rojo característico de la carne de cordero durante el almacenamiento.
- Los tratamientos con extracto de borraja no ralentizan la oxidación lipídica de la carne, ya que los valores obtenidos tanto para el control como para los tratamientos son muy elevados.
- Los tratamientos con extracto de borraja aumentan ligeramente el porcentaje de inhibición de eliminación de radicales libres, respecto al control.
- Se produce poca migración de antioxidantes desde el film activo a la carne.
- El mantenimiento del color rojo y el aumento de la oxidación a lo largo del almacenamiento puede ser debido a que los compuestos fenólicos, al ser hidrosolubles, pasan al citosol de las células de la carne y las protegen, y no se disuelven en la grasa y por lo tanto no la protegen.
- La razón más probable para el mantenimiento del color rojo, ya que sabemos que existe poca migración de antioxidantes, es que el film activo al ser más oscuro, filtra la luz UV que llega a la carne y esta no degrada tanto el color rojo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Agulló E., Rodríguez M.S., Ramos V., Albertengo L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience* 10: 521-530.

Amit R., Ravindra B., Bikash M. (2017). Simulation of supercritical fluid extraction of essential oil from natural products. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 5: 1-9.

Asadi-Samani M, Rafieian-Kopaei M, Azimi N. (2013). Gundelia: a systematic review of medicinal and molecular perspective. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 16: 1238-1247.

Bandoniene D., y Murkovic, M. (2002). The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC-DPPH method. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 53: 45–49.

Bell R. G. (2001). “Meat packaging: Protection, preservation and presentation” Edición de Y. H. Hui, W.-K. Nip, R. W. Rogers y O. A. Young, *Meat Science and Applications*, 463-490. N. York, Marcel Dekker, Inc.

Borch E., Kant-Muermans M-L. y Blixt Y., (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 33: 103–120

Brunner G. (2005) Supercritical fluids: technology and application to foodprocessing, *Journal of Food Engineering* 67: 21–33.

Casas L., Mantell C., Rodríguez M., Torres A., Macías F.A., Martínez de laOssa E.J. (2008). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from sunflowerleaves with carbon dioxide and water on a pilot plant scale, *Journal of Supercritical Fluid* 45: 37–42.

Chen C. H., Pearson A. M. y Gray (1992). Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry* 43: 177-183.

Ciriano M.G.I.D, García-Herreros C, Larequi E, Valencia I, Ansorena D, Astiasarán I. (2009). Use of natural antioxidants from lyophilized water extracts of *Borago officinalis* in dry fermented sausages enriched in  $\omega$ -3 PUFA. *Meat Science* 83: 271-277.

Dutta P.K., Tripathi S., Mehrotra G.K., Dutta J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry* 4: 1173-1182.

España. Real Decreto-ley 142-2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. *Boletín Oficial del Estado*, 20 de febrero de 2002, núm. 44.

Faustman C., Sun Q., Mancini R. y Suman S. P., (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science* 86: 86-94.

Greene B. (1969). Lipid oxidation and pigment changes in raw beef. *Journal of Food Science* 2: 110-113.

Greene B. E. y Cumuze T. H., (1981). Relationship between TBA-numbers and inexperienced panelists assessments of oxidized flavor in cooked beef. *Journal of Food Science* 47: 52-58.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999) Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press.

Hettiarachchy N, Glenn K.C, Gnanasambandam R, Johnson M.G. (1996). Natural antioxidant extract from fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) for ground beef patties. *Journal of Food Science* 61: 516- 519.

Jacob R.H, D'Antuono M. F., Gilmour A. R. y Warner R. D., (2013). Phenotypic characterization of colour stability of lamb meat. *Meat Science* 96: 1040-1048.

Jay J. M., Loessner M. J., Golden D. A., (2005). *Modern food microbiology*, 7º Edición, Springer Science plus Business Media, New York.

MAGRAMA (2013). "Caracterización del sector ovino y caprino en España" *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente*. Disponible en: [http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercadosganaderos/CARACTERIZACION\\_DEL\\_SECTOR\\_OVINO\\_Y\\_CAPRINO\\_EN\\_ESPAÑA\\_2013\\_tcm7-271704.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercadosganaderos/CARACTERIZACION_DEL_SECTOR_OVINO_Y_CAPRINO_EN_ESPAÑA_2013_tcm7-271704.pdf)

Martínez L., Cilla I., Beltrán J. A. y Roncalés P., (2006). Antioxidant effect of rosemary, borage, green tea, pu-erh tea and ascorbic acid on fresh pork sausages packaged in a modified atmosphere: Influence of the presence of sodium chloride. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 1298-1307.

Morrissey P.A, Buckley D.J, Sheehy P.J.A, Monahan F.J. (1994). Vitamin-E and meat quality. *Proceedings of the Nutrition Society* 53: 289-295.

Nieto G., Díaz P., Bañón S. y Garrido M. D., (2010). Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb meat quality. *Meat Science* 84: 23–29.

Oba C., Ota M., Nomura K., Fujiwara H., Takito J., Sato Y., Ohizumi Y., Inomata H. (2017). Extraction of nobiletin from *Citrus Unshiu* peles by supercritical fluid and its CRE-mediated transcriptional activity. *Phytomedicine* 27: 33-38.

O'Grady M. N., Monahan F. J. y Brunton N. P., (2001). Oxymyoglobin oxidation and lipid oxidation in bovine muscle-mechanistic studies. *Journal of Food Science* 66: 386- 392.

Pfalzgraf A., Frigg M. y Steinhart H. (1995). A-Tocopherol contents and lipid oxidation in pork muscle and adipose tissue during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1339-1342.

Rafieian-Kopaei M, Baradaran A, Rafieian M. (2013). Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. *Journal of Research in Medical Sciences* 18: 629.

Redden P.R, Lin X, Fahey J, Horrobin D.F. (1995) Stereospecific analysis of the major triacylglycerol species containing  $\gamma$ -linolenic acid in evening primrose oil and borage oil. *Journal of Chromatography A* 704: 99-111.

Reverchon E., De Marco I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids* 38: 146-166.

Sánchez-Escalante A., Djenane D., Torresco G., Beltrán J. A. y Roncalés P., (2003). Antioxidant action of borage, Rosemary, oregano and ascorbic acid in beef patties packaged in modified atmosphere. *Journal of Food Science* 68: 339-344.

Shahidi F., Wanasundara P. y Janita P. K., (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32: 67-103.

Singh R. K. y Singh N., (2005). "Quality of packaged foods" Edición de J. H. Han. *Innovations in food packaging* 24-44.

Siripatrawan U., Noipha S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for self-life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids* 27: 102–108.

Sovova, H., (1994). Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>-I: Modelling of extraction curves. *Chemical Engineering Science* 49: 409–414.

Sovova, H., (2005). Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *Journal of Supercritical Fluids* 33: 35–52.

Tarladgis B. G., Watts B. M., Younathan M. T. y Dugan L., (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in foods. *Journal of the American Oil Chemistry Society* 37: 44–48.

Uquiche E., Huerta E., Sandoval A., del Valle J. M.. (2012). Effect of boldo (*Peumusboldus M.*) pretreatment on kinetics of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering* 109: 230–237.

Vargas M., Albors A., Chiralt A. (2011). Application of chitosan-sunflower oil edible films to pork meat hamburgers. *Procedia Food Science* 1: 39-43.

Wheatley J. y Chiu J., (1977). The effects of price, store image, and product and respondents characteristics on perception of quality. *Journal of Marketing Research* 14: 181-186.

Wettasinghe M, Shahidi F. (2002) Iron (II) chelation activity of extracts of borage and evening primrose meals. *Food Research International* 35: 65-71.

Wettasinghe M., Shahidi F., Amarowic, Z.R. y Abou-Zaid, M.M. (2001). Phenolic acids in defatted seeds of borage (*Borago officinalis* L.). *Food Chemistry* 75: 49–56.