



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EFFECTO DEL USO DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis L.*) COMO
ADITIVO ANTIBACTERIAL EN SALCHICHAS DE POLLO TIPO FRANKFURT**

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos

Profesora Guía

Ing. Elsy Paola Carrillo Hinojosa

Autora

Vanessa Alejandra Castillo Ruilova

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con los estudiantes orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Elsy Paola Carrillo Hinojosa
Magister en Alimentos y Nutrición.
CI.: 1708625403

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

El trabajo de titulación es de mi autoría y se ha desarrollado con base a una investigación, respetando derechos intelectuales de terceros, citando su fuente correspondiente las cuales han sido incorporadas en la bibliografía. En virtud de lo expresado, el contenido, autenticidad y alcance científico de esta tesis de grado es de mi completa responsabilidad.

Vanessa Alejandra Castillo Ruilova
CI.:1721158804

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios quien me dio la fuerza y fe necesaria para poder culminar este proyecto de vida. A mi familia y amigos por ayudarme con el cuidado de mi hijo mientras yo realizaba mi investigación, trabajaba y por apoyarme incondicionalmente.

A la Mgt. Paola Carrillo al aportar sus conocimientos y experiencia al dirigir mi tesis, pero principalmente por su disponibilidad y apoyo constante.

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de titulación a mi padre celestial, que me acompaña y guía siempre, además de ser el creador de mi amado hijo, padres, hermanos y amigos quienes fueron mi principal apoyo y soporte para poder culminar mi tesis

RESUMEN

El romero (*Rosmarinus officinalis L.*) contiene compuestos fenólicos que tienen actividad antibacteriana y antioxidante por lo cual en la industria alimentaria es utilizado como aditivo alimentario "GRAS" (Generally Recognized as Safe). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto preservante del tipo de partícula y la concentración de romero en las características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales en salchichas de pollo tipo Frankfurt a los 15 y 30 días de almacenamiento.

Se realizó un Diseño Experimental en Bloques Completamente al azar con 3 repeticiones donde los factores en estudio fueron 3 tipos de partícula de romero (polvo, hojas, aceite esencial) y 2 concentraciones (290 ppm, 350 ppm) del mismo. El análisis microbiológico determinó el recuento total de bacterias aerobias mesófilas y *Staphylococcus aureus*. El análisis físico-químico involucró la determinación de pH, acidez, humedad y color. Finalmente, para evaluar los atributos sensoriales y la aceptabilidad del embutido con romero, se realizó un análisis sensorial de olor, color, textura, sabor mediante una escala hedónica de 7 puntos. La concentración de 350 ppm y el aceite esencial mostraron propiedades antibacteriales frente a bacterias aerobias mesófilas, mientras la reducción logarítmica de crecimiento de *Staphylococcus aureus* fue independiente de la concentración y tipo de partícula de romero. La salchicha con 350 ppm de romero presentó una reducción de humedad, mantuvo un medio ácido en las salchichas y conservó un color rosado en el producto disminuyendo las probables reacciones que podrían presentar estos factores durante el tiempo de almacenamiento. La evaluación sensorial indicó una aceptación moderada de color, olor, textura, sabor de las salchichas con aceite esencial de 350 ppm. Los resultados obtenidos en esta investigación apuntan a la necesidad de continuar con estudios de conservantes naturales como el romero que sean capaces de inhibir el crecimiento bacteriano al ser la más frecuente causa de deterioro en productos cárnicos como salchichas de pollo tipo Frankfurt.

ABSTRACT

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is a plant from the *Labiatae* family that contains phenolic compounds with antioxidant and antibacterial activity, therefore, in food industry it is used as a food additive "GRAS" (Generally Recognized as Safe). The aim of this study was to determine the preservative effect of rosemary particles in different concentrations in chicken frankfurters during its storage time (15, 30 days).

Data were analyzed by randomized block method using 3 types of Rosemary particles (dust, leaves, essential oil) and 2 concentrations (290 ppm, 350 ppm). We evaluated: pH, acidity, moisture, microbiological counts (mesophilic aerobic microorganisms, *Staphylococcus aureus*), color and sensorial acceptability. The four first variables were analyzed using ANOVA, meanwhile color by Munsell color scale and the sensory analysis using a hedonic scale. The moisture and pH decreased in this investigation which can explain the antimicrobial effect of rosemary essential oil of 350 ppm against mesophilic aerobic bacterias. The logarithmic growth of *Staphylococcus aureus* was independent to the rosemary's concentration and particle. Color was maintained during the storage time and the hedonic scale showed a moderate acceptability of the sensory attributes of chicken frankfurters with rosemary essential oil of 350 ppm in consumers. The results obtained in this research point to the necessity to continue with studies of natural preservatives such as Rosemary that are able to inhibit bacterial growth being the most frequent cause of meat products spoilage.

Key words: phenolic compounds, antioxidant, antibacterial, mesophilic aerobic microorganisms, *Staphylococcus aureus*, shelf life.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
Objetivo General	3
Objetivos Específicos.....	3
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 Procesamiento de carne y sus derivados	4
1.2 Salchichas escaldadas tipo Frankfurt	4
1.3 Microorganismos alterantes en salchichas escaldadas	7
1.3.1 Requisitos microbiológicos y bromatológicos para salchichas escaldas	8
1.3.2 Aerobios mesófilos	8
1.3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	9
1.4 Mecanismos para extender el tiempo de vida útil de embutidos escaldados.....	10
1.5 Conservantes Naturales	16
1.6 Características del Romero.....	17
1.6.1 Aplicación del romero como preservante en carne y productos cárnicos	19
2. DESARROLLO METODOLÓGICO.....	23
2.1 Localización y duración experimental.....	23
2.2 Proceso de elaboración de salchicha de pollo tipo Frankfurt con adición de Romero	23
2.3 Descripción tecnológica del proceso	25
2.4 Diseño Experimental	26
2.4.1 Esquema Análisis de Varianza (ANDEVA)	28
2.4.2 Variables en estudio	29
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33

3.1 Efecto en la humedad	33
3.2 Efecto en la acidez	35
3.3 Efecto en el pH.....	38
3.4 Efecto en el crecimiento de Aerobios mesófilos.....	40
3.5 Efecto en el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	44
3.6 Efecto en la aceptación de la salchicha	45
3.7 Efecto del color	48
4. CONCLUSIONES	52
5. RECOMENDACIONES	53
REFERENCIAS	54
ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Requisitos bromatológicos para salchichas escaldadas.....	5
Tabla 2. Requisitos microbiológicos para salchichas escaldadas según la normativa ecuatoriana.....	8
Tabla 3. Aditivos de uso permitido	13
Tabla 4. Formulación Salchicha Frankfurt.....	23
Tabla 5. Factores en Estudio.....	27
Tabla 6. Tratamientos Experimentales.....	27
Tabla 7. Análisis de Varianza	28
Tabla 8. Análisis de varianza de la evaluación sensorial.	28
Tabla 9. Escala hedónica.	31
Tabla 10. Análisis de varianza de humedad encontrado en las salchichas Frankfurt de pollo durante 30 días.....	33
Tabla 11. Análisis estadístico de la variable humedad durante 30 días.	34
Tabla 12. Análisis de varianza de la acidez de las salchichas durante 30 días.	36
Tabla 13. Diferencia entre las medias de la acidez en las salchichas de pollo Frankfurt durante los 30 días de almacenamiento.	37
Tabla 14. Análisis de varianza del potencial de Hidrógeno encontrado en las salchichas Frankfurt de pollo durante 30 días.	38
Tabla 15. Análisis estadístico de la variable pH.	39
Tabla 16. Análisis de varianza de Aerobios mesófilos encontrado en las salchichas Frankfurt de pollo durante 30 días.....	41
Tabla 17. Análisis estadístico de la variable Aerobios mesófilos a través del tiempo.....	42
Tabla 18. Análisis de varianza del análisis sensorial en las salchichas Frankfurt de pollo en el día 1.....	46
Tabla 19. Análisis estadístico de la Aceptación de las Salchichas.....	47
Tabla 20. Análisis de color durante los 30 días de almacenamiento.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Diagrama de flujo de la fabricación de la salchicha Frankfurt	24
<i>Figura 2.</i> Tabla Munsell.....	32
<i>Figura 3.</i> Color día 1 Testigo.....	49
<i>Figura 4.</i> Color día 1 AE 350 ppm.....	49
<i>Figura 5.</i> Color día 15 AE 350 ppm.....	50
<i>Figura 6.</i> Color día 15 Testigos.....	50
<i>Figura 7.</i> Color día 30 AE 350 ppm.....	50
<i>Figura 8.</i> Color día 30 Testigo.....	51

INTRODUCCIÓN

Las tendencias del mercado muestran un consumo más consciente de alimentos sanos, bajos en grasas y funcionales (Joint World Health Organization/Food and Agriculture Organization Expert Consultation (WHO/FAO, s.f). El consumo de embutidos es cada vez mayor. El impedimento que contemplan las recetas médicas no ha mermado en nada el consumo. De acuerdo al Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) (INEC, s.f), en Ecuador el negocio de embutidos maneja alrededor de 120 millones de dólares al año, el consumo anual es de 3 kilos por persona y cuenta con una demanda creciente del 5%. Un Estudio realizado en la ciudad de Esmeraldas en Ecuador arrojó que de cada 150 personas que consumen embutidos, 53,6 % manifiestan preferencia por la salchicha, el 26,0% mortadela, el 16,6 % chorizo parrillero y el 3,8% consume jamón (Dávila, 2008).

Los nitratos, nitritos sódicos y nitrato potásico, son los aditivos químicos más usados especialmente en productos cárnicos debido a la capacidad conservante (Heinz y Hautzinger, 2007, p.35), pero los dos últimos presentan riesgos: la toxicidad aguda, pues 2 gramos pueden causar la muerte a una persona, al ser capaz de unirse a la hemoglobina de la sangre, de una forma semejante como lo hace a la mioglobina del músculo de la carne, formándose metahemoglobina, un compuesto que ya no es capaz de transportar el oxígeno, esta intoxicación puede ser mortal (Walker, 2006). Sin embargo, poseen un efecto antibacteriano principalmente contra *Clostridium botulinum* (Valle y Florentino, 2000).

Se calcula que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos, por ello la prevención del deterioro bacteriano de carne y sus derivados es importante para mantener la calidad y la seguridad alimentaria del producto según FAO (Food and Agriculture Organization). Los conservantes naturales están marcando tendencia en el sector alimentario (Rodriguez, 2011). Algunas investigaciones han evidenciado

el poder antibacteriano y antioxidante de extractos de plantas de la familia *Labiatae* (orégano, tomillo, salvia) (Chan, Kong, Yee, Chua y Loo, 2012). El Romero (*Rosmarinus officinalis L.*) es una planta perteneciente a la familia *Labiatae* (Chan, Kong, Yee, Chua y Loo, 2012). Los compuestos fenólicos como ácido carnósico, carnosol (Aruoma, Halliwell, Aeschbach y Loliger, 2003); ácido rosmarínico (Del Bano et al., 2003) son responsables de la acción conservante del romero. En particular, el ácido carnósico y el carnosol son los encargados de la acción antioxidante de los extractos liposolubles del romero (Frankel, Huang, Aeschbach y Prior, 2000), destacándose el ácido carnósico al presentar tanto propiedades antibacteriales como antioxidantes (Aruoma, Halliwell, Aeschbach y Loliger, 2003).

Un extracto de romero, en forma de hoja o aceite, se podría utilizar como sustituto de conservantes químicos en embutidos (Hac-Szymanczuk, Lipinska, y Stasiuk, 2011). El aceite esencial de romero y los extractos obtenidos a partir de la hoja de romero se caracterizan por una alta actividad antimicrobiana (Cuvelier, Richard, y Berset, 2002). El amplio espectro antibacteriano del romero de importancia en productos cárnicos incluye bacterias Gram negativas como *Salmonella* (Faixova y Faix, 2008; Mann y Markham, 2002), *Escherichia coli* (Mann y Markham, 2002) y bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* (Shelef, Naglik y Bogen, 2013; Faixova y Faix, 2008), *Clostridium botulinum* (Armitage, Hettiarachch y Moonsor, 2002).

A la vista de los datos anteriores, la presente tiene por objetivo evaluar el efecto preservante del tipo de partícula y la concentración de romero en las características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales en salchichas de pollo tipo Frankfurt a los 15 y 30 días de almacenamiento, como una alternativa para el consumo de embutidos y de alimentación más sana para el ser humano.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el romero como preservante en salchichas de pollo tipo Frankfurt.

Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto del tipo de partícula y concentración de romero en las características físico-químicas y microbiológicas durante treinta días de almacenamiento de la salchicha de pollo tipo Frankfurt.
2. Establecer el efecto del tipo de partícula y la concentración de romero en la aceptación sensorial de la salchicha de pollo tipo Frankfurt.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Procesamiento de carne y sus derivados

La fabricación de productos cárnicos implica una amplia gama de métodos de tratamiento físico y químico, normalmente combinando con operaciones de procesamiento de la carne que incluyen: reducción de tamaño, mezclado, salado/curado, utilización de aditivos, relleno en tripa o en otros envases, fermentación y secado, tratamiento térmico (cocción) y ahumado (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 17).

Los productos cárnicos cocidos se componen de carne, músculo, grasa y los ingredientes no cárnicos, se procesan crudos triturando y mezclando en una primera fase (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 99). La pasta resultante, se somete posteriormente a un tratamiento térmico que debe alcanzar como mínimo 70 °C (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], s.f), con el fin de obtener una textura firme, para lograr la palatabilidad y un cierto grado de estabilidad bacteriana (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 99). En esta categoría encontramos a salchichas frankfurters, mortadela, salchichas lyoner, y otros (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 97).

1.2 Salchichas escaldadas tipo Frankfurt

La Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1338:96 define a una salchicha escaldada como un embutido que puede ser escaldado, frito, horneado o sujeto a otra forma de tratamiento con calor; elaborado a partir de materia cruda triturada a la cual se le agrega aditivos, condimentos, sal, agua potable o hielo y proteínas coaguladas por medio del tratamiento térmico con el objetivo de que el producto tenga consistencia al momento del cortado.

Los productos escaldados analizados de acuerdo a las normas ecuatorianas, deben cumplir con los requisitos de pH y humedad establecidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Requisitos bromatológicos para salchichas escaldadas.

Salchichas Escaldadas			
Requisitos	Unidad	Mínimo	Máximo
Ph	[H+]	6	6,2
Humedad	%	-	65%

Adaptada de Norma NTE INEN 1338, s.f.

En salchichas escaldadas tipo Frankfurt para alcanzar el sabor deseado es necesario un aumento de pH de 5.6 a 6 que favorece la retención de agua (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 4). La retención de agua en estas salchichas debe mantenerse estable durante la cocción ya que una baja capacidad de retención de agua conduce a una estructura proteica débil y a una baja de pH que conducirá a mayor pérdida de agua. Así mismo, en el producto terminado se requiere de un rango de acidez leve y una baja actividad de agua para así no favorecer el crecimiento bacteriano durante el tiempo de almacenamiento y potenciar la acción de los antimicrobianos (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 5). El rango de humedad en Frankfurters debe estar alrededor de un 60% pero este valor puede variar ya que al ser escaldado posee un porcentaje de agua libre en un rango de 0,92 a_w , Este rango de agua libre dificulta el crecimiento de bacterias de importancia como *Salmonella* (0,93 a_w), *Escherichia Coli* (0,93 a_w) e inclusive *Clostridium perfringens* (0,94 a_w), *Staphylococcus aureus* (0,86 a_w) es el patógeno que presenta mayor tolerancia a la a_w (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 324).

La salchicha Frankfurt elscaldada es elaborada a partir de carne de res, tocino, cortezas de cerdo, sal, especias, hielo y otros ingredientes frecuentes son: leche en polvo, proteínas no cárnicas, antioxidantes y conservantes. La carne de cerdo le da un color entre rosa claro y rojo mate a la masa, mientras la carne de res le da firmeza a la masa y un sabor fuerte (Savic, 2000). Para la

fabricación de salchichas Frankfurt se requiere cantidades de tejidos grasos en el rango del 20% (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 12).

La industria ha realizado avances significativos, incluyendo productos como salchichas Frankfurt de pollo y pavo las cuales están hechas de carne que debe estar libre de huesos, tendones y piel (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 187).

El contenido energético de las salchichas tipo Frankfurt varía dependiendo de la variedad, marca comercial y está sujeto principalmente al contenido de grasa la cual se encuentra entre un 20% y 27%. Así, se puede encontrar salchichas cerca de 240 Kcal hasta 300 Kcal por 100 gramos (Savic, 2000).

El contenido de grasa insaturada (monoinsaturada) en salchichas Frankfurt de pollo es superior a la grasa saturada, 12% frente al 10 % respectivamente. A pesar de los beneficios de los ácidos grasos insaturados en la salud, estos ejercen un papel determinante en los procesos oxidativos de la salchicha por este motivo es un producto con corta vida útil (Savic, 2000).

El contenido proteico define la calidad y el valor de los productos cárnicos terminados (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 2). La cantidad de proteína de una salchicha Frankfurt (14 %) es inferior al de carnes frescas (22 %) debido a que la carne empleada en la fabricación de este producto, suele ser rica en colágeno, tejido conjuntivo las cuales no poseen todos los aminoácidos esenciales (Savic, 2000).

El contenido de agua está en un 60 % y está inversamente relacionado con el contenido de grasa, además es superior al de productos cárnicos crudos, fermentados, madurados (45%) debido al proceso de escaldado al que son sometidos (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 3).

Los hidratos de carbono de las salchichas tipo Frankfurt varía entre un 0,4% y un 8,4%. Contiene minerales en un 0,3% como zinc, hierro, fósforo y vitaminas del grupo B, sin embargo, la presencia de vitaminas liposolubles es mínima ya

que no son estables al proceso de cocción y pueden ser lixiviadas en la grasa o caldo. Además, el contenido de sodio es elevado (778 mg cada 100 gramos) (Savic, 2000).

1.3 Microorganismos alterantes en salchichas escaldadas

El deterioro microbiológico es el principal fenómeno condicionante para la vida comercial de productos cárnicos como los embutidos. Las normas de higiene y sanidad implementadas para el procesamiento posibilitan medidas que contribuyan a obtener productos seguros para el consumo, no obstante, no se consigue una esterilidad total (FAO, s.f).

Las bacterias relevantes en carne y su derivados se dividen en tres grupos según el rango de temperaturas: mesófilos (30–45 °C), psicrófilos (12–15 °C) y psicótrofos (25–30 °C) y termófilos (55-75 °C) (FAO, s.f).

Algunas bacterias causan putrefacción en el producto, otras causan intoxicación alimentaria. La mayoría de bacterias causantes de intoxicaciones son mesófilas (FAO, s.f). El desarrollo de bacterias mesófilas en embutidos se debe a varios factores. Los embutidos son los derivados cárnicos que mayor interés en estudios de salud pública han presentado debido a que estos productos son comúnmente sometidos a un abuso de temperatura en las manos del consumidor. Aunque *Salmonella* es capaz de crecer en embutidos escaldados, rara vez se han asociado a enfermedades transmitidas por alimentos de esta fuente (Vanderzant, Russel y Foster, 2001). *Staphylococcus aureus* puede desarrollarse por contaminación de la piel, boca o nariz de manipuladores o y/o a una contaminación posterior; *E. coli* debe su crecimiento a una fabricación inadecuada, contaminación cruzada y por la aplicación de temperaturas de control insuficientes (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 358); en aquellos productos cárnicos ricos en hierro como patés o derivados de hígado y morcillas y bajos en sal la acción preventiva frente a *Clostridium botulinum* es indispensable (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 358). Las bacterias ácido lácticas,

capaces de crecer en condiciones de refrigeración, son las principales responsables del deterioro de productos cárnicos escaldados envasados en atmósferas libres de oxígeno (Devlieghere, Geeraerd, Versyck, Bemaert, Van Impe y Debevere, 2000). El deterioro de los productos cárnicos debido a bacterias, resulta en la formación de limo, olores y sabores indeseables, cambios de color (gris, marrón, verde), rancidez, descomposición lipídica, entre otras características que alteran la calidad final del producto (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 400).

1.3.1 Requisitos microbiológicos para salchichas escaldadas

Según el Instituto Ecuatoriano de Normalización Ecuatoriana, las salchichas escaldadas deben cumplir con las siguientes características microbiológicas, como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Requisitos microbiológicos para salchichas escaldadas según la normativa ecuatoriana.

Salchichas Escaldadas		
Requisitos	Mínimo UFC / g	Máximo UFC / g
Aerobios mesófilos	$1,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
Enterobacteriaceae	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
<i>Escherichia coli</i>	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
Salmonella	Aus/25 g	-

Adaptada de Norma NTE INEN 1338, s.f.

1.3.2 Aerobios mesófilos

Se denominan bacterias mesófilas a aquellos microorganismos capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno libre y a una temperatura entre 20°C y 45°C (INEN, s.f).

El recuento de aerobios mesófilos no determina el tipo de microorganismo pero sí una estimación de la microflora total. Por lo general, la presencia de este

grupo de bacterias refleja condiciones de salubridad en alimentos en lo que respecta a calidad sanitaria, condiciones de manipulación, condiciones higiénicas de la materia prima, ingredientes utilizados para la fabricación de los productos, además representa una variable para determinar el tiempo de vida útil del alimento (INEN, s.f).

Hac-Szymanczuk, Lipinska, y Stasiuk, 2011 demostraron la importancia de analizar bacterias mesófilas en productos cárnicos, ya que de los tres microorganismos analizados coliformes, enterococos y aerobios mesófilos, éstos últimos presentaron menos sensibilidad al conservante natural de romero probado, concluyendo que lograr una completa esterilidad del medio ambiente no es totalmente posible por lo que el desarrollo de estas bacterias es difícil de controlar, por esto la INEN permite un alto número de unidades formadoras de colonias en productos cárnicos.

1.3.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un aerobio y anaerobio facultativo perteneciente a la familia *Micrococcaceae* y al género *Staphylococcus* que se desarrollan a una temperatura óptima de 37 °C (FAO, s.f). Es uno de los agentes causales más comunes de brotes de intoxicación alimentaria bacteriana a nivel mundial debido a su capacidad para producir una amplia gama de enterotoxinas y otros factores de virulencia (Babalan y Rasooly, 2000).

Staphylococcus aureus es un patógeno de importancia en embutidos ya que esta bacteria no produce malos olores o descomposición por lo que no se puede detectar fácilmente. La refrigeración controla su crecimiento. La cocción puede destruir la bacteria, pero no la toxina, ya que es estable al calor (FAO, s.f).

Es particularmente problemático en productos cárnicos curados cocidos, normalmente como resultado de la recontaminación después del proceso de curado en la manipulación posterior (FAO, s.f).

Moraes, Pereira, De Almeida, Barcellos, y Bersot, 2014 evaluaron el efecto de la concentración de nitritos (50, 150 y 200 ppm) en el comportamiento de *Staphylococcus aureus* en salchichas frescas almacenadas a diferentes temperaturas (7-12 °C). Los resultados demostraron la importancia de evaluar esta bacteria debido a que la concentración de nitritos y la temperatura tuvieron un efecto mínimo en la multiplicación de este microorganismo, concluyendo que para inhibir su crecimiento se deben aplicar temperaturas inferiores a 7 °C y que un abuso de temperatura durante el almacenamiento del producto a 12°C puede ocasionar un riesgo para la salud del consumidor. Waters et al., (2011) evaluaron la prevalencia y la susceptibilidad a los antibióticos de *S. aureus* en muestras de carne y aves de corral, encontrado que la contaminación *S. aureus* era común entre las muestras.

Procesos tecnológicos aplicados a los derivados cárnicos como tratamientos térmicos, curado/ salado y adición de aditivos permiten la reducción parcial y dificultan el desarrollo de microorganismos a causa del uso de altas temperaturas, reducción en el contenido de agua en la carne, inhibición de crecimiento bacteriano, etc (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 2).

1.4 Mecanismos para extender el tiempo de vida útil de embutidos escaldados

Los embutidos escaldados tienen un tiempo de vida útil aproximado bajo refrigeración de 45 días (Savic, 2000).

La conservación de las emulsiones se da mediante un conjunto de operaciones físicas y químicas. La carne, principal componente en estas emulsiones, constituye un extraordinario medio de cultivo debido a un conjunto de características como alta humedad, pH poco ácido y abundancia en nutrientes (James y James, 2002), además, dentro de su estructura pueden encontrarse microorganismos, lo que hace que su conservación sea más difícil que otros alimentos; por tanto, es importante contar con un sistema de conservación

adecuado para evitar o retardar alteraciones en el producto que incluye: tratamientos térmicos, salado, aplicación de aditivos (James y James, 2002). La mayoría de productos cárnicos procesados son tratados con calor durante su fabricación y enfriados en un próximo paso, porque tienen períodos más largos de almacenamiento en frío para la distribución y venta (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 88).

Para el tratamiento térmico de carne y productos cárnicos, se puede distinguir entre los productos que se someten a pasterización (<100 °C) y a esterilización (> 100 °C) (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 93), con lo que se logrará una prolongada vida útil a través de la reducción o destrucción completa de las poblaciones de microbios por el proceso de calentamiento para así reducir la carga microbiana inicial mediante la inactivación de microorganismos sensibles al calor, además de sensibilizar a los microorganismos sobrevivientes volviéndolos menos resistentes a reducción de pH, y a la presencia de antimicrobianos. Además, contribuye a destruir las enzimas causantes de deterioro y putrefacción en el alimento (Tiwari et al., 2009).

Los microorganismos son sensibles al calor y mueren a temperatura inferior a 0, en el caso de esporas formando microorganismos, por encima de 100 ° C. Cada especie de microorganismos reacciona de forma diferente a un tratamiento térmico, debido a su resistencia al calor. Los microorganismos mueren rápidamente cuando están expuestos a temperaturas relativamente altas. Los microorganismos también pueden morir a temperaturas relativamente bajas, pero más largos períodos de tratamiento térmico serán necesarios en estos casos (Heinz y Hautzinger, 2012, p. 95).

Los microorganismos vegetativos como *E. Coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Estafilococo aureus*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Lactobacillus spp*, *levaduras*, *hongos* pueden ser destruidos a temperaturas inferiores a 100 ° C, básicamente en el rango de temperatura de 60 °C a 85 °C (Dong y Holley, 2012). Sin embargo, ciertas toxinas como las de

Staphylococcus aureus pueden sobrevivir a temperaturas de 100 °C y por encima de este valor (FAO, s.f).

La resistencia térmica de esporas de microorganismos (*Bacillus*) y sus toxinas (*Staphylococcus aureus*) demuestra claramente la importancia de aplicar tratamiento térmico en productos cárnicos (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 98). Igualmente, es importante la refrigeración estricta para productos cárnicos escaldados debido a los microorganismos resistentes al calor. El incumplimiento de estas normas puede resultar en problemas de salud pública a través de la intoxicación alimentaria (Dong y Holley, 2012).

El cloruro de sodio tiene una baja capacidad para destruir los microorganismos, por lo tanto, casi no tiene ningún efecto bacteriológico. Su conservación se atribuye a la capacidad de enlazar agua y privar a la carne de la humedad. El agua ligada a las moléculas de la proteína así como el agua libre serán atraídas por los iones de sodio y cloruro, provocando una reducción de la actividad de agua (A_w) del producto (Savic, 2000). Esto significa que dispondrá de menos agua y el medio ambiente será menos favorable para el crecimiento de microorganismos (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 348).

Las bacterias no crecen en una actividad de agua por debajo de 0,91 que corresponde a una solución de 15 g NaCl/100 ml de agua o sal sobre 15% en el producto (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 33). Estas cifras explican cómo la sal tiene su efecto conservante, no obstante, es más eficaz en combinación con fosfatos o con otros métodos de preservación como reducción de humedad o tratamiento térmico (Dong y Holley, 2012).

Los aditivos son sustancias que normalmente no se consumen como alimento por sí mismo, sino que se añaden para desarrollar ciertas características tecnológicas y de calidad en el alimento (FAO, s.f). En la elaboración de salchichas Frankfurt los aditivos más comunes utilizados son: productos químicos: sal (para el sabor, impacto en proteínas de la carne, vida útil), nitrito

(fijador de color, sabor, vida útil, conservante antimicrobiano, antioxidante), ácido ascórbico y eritorbato (aceleradores la reacción de curado, antioxidantes), fosfatos (emulsionantes, espesantes, estabilizadores, reguladores de acidez, secuestrantes); ingredientes de origen vegetal: especias (agregar sabor y gusto), aglutinantes (como proteína aislada de soya para aumentar la retención de agua y grasa, aglutinante, texturizante, emulsionante), de relleno (carragenina como emulsificante, gelificante, estabilizador, espesante) (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 59).

Se acepta el empleo de aditivos solos o combinados indicados en la Tabla 3 para la fabricación de productos cárnicos, los valores expresados en la siguiente tabla están aprobados y actualizados de acuerdo con las normas del Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, s.f).

Tabla 3. Aditivos de uso permitido

Sustancia	Dosis máxima/ contenido neto total del producto final
Ácido Ascórbico y sus sales	500 mg/ kg
Ácido Eritórbico y sus sales	500 mg/ kg
Nitrito sódico, Nitrito Potásico	200 mg/kg
Proteína Aislada de soya	*
Fosfatos	3000 mg/kg
Carragenina	75 mg/kg

Adaptada de Codex Alimentarius, s.f.

El agente de curado, nitrito, se agrega en forma seca o como sal nitrante, que contiene 0.5 a 0.6% de nitrito de sodio agregado y 99.4 o 99.5% de cloruro de sodio en derivados cárnicos ya que permite efecto conservante mediante la eliminación de la humedad y la reducción de la actividad de agua (Heinz, Hautzinger, 2007, p. 35).

Para lograr el deseado color rojo o rosáceo de los productos cárnicos se utiliza nitrito ya que tiene la capacidad de reaccionar la mioglobina con el tejido muscular de la carne. El Nitrito de Sodio (NaNO_2) o más óxidos de nitrógeno que se forman a partir del nitrito en un medio ácido, se combinan con la mioglobina para formar nitrosomioglobina, pigmento de la carne curada, un compuesto rojo brillante, que es estable al calor (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 35).

Niveles de 125 mg/kg en la carne, que es 0,015%, son normalmente suficientes para fines de preservación y dar color a los alimentos (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 34).

La química de los nitritos le otorga la capacidad antibacteriana por medio de un conjunto de compuestos nitrosos, el anión de la sal negra de Roussin $[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]^-$, es el compuesto más activo frente a bacterias aerobias y anaerobias, pero principalmente al control de la germinación de las esporas de *C. Botulinum* lo cual garantiza la seguridad ante el botulismo, el tipo más grave de intoxicación alimentaria (Cammack et al., 1999). Además, inhibe microorganismos y bacterias asociadas con infecciones e intoxicaciones alimentarias como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* (FAO, s.f).

En presencia de nitritos las grasas se estabilizan y se retarda el enranciamiento oxidativo en productos cárnicos (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 68) debido a que el nitrito por sí mismo puede actuar como un prooxidante especialmente a concentraciones superiores a 25 mg/kg (partes por millón), también actúa como quelante de metales para atar metales presentes en la carne (Mac Donald, Gray, y Gibbins, 2000).

La Norma Técnica NTE INEN 1338:96 establece el límite permitido de nitrito para salchichas que es 125 mg/kg de peso de producto. La Ingesta Diaria Admisible (IDA) de la OMS para el nitrito (0-0,07 mg/kg) se traduce en un

equivalente a 222 mg de nitrato para un adulto de 60 kg (World Health Organization [WHO], s.f).

La adición de sal nitrante en cantidades de aproximadamente 2% genera un contenido de nitritos en los productos cárnicos de aproximadamente 150ppm (partes por millón o 150 mg/kg) (Codex Alimentarius Commission, s.f). Este contenido de nitritos no es tóxico para los consumidores. En cualquier caso, la cantidad de nitrito residual en el producto acabado no debe exceder 125 ppm (Codex Alimentarius Commission, s.f).

Es importante el papel de los nitritos en la conservación de los alimentos y la capacidad para inhibir el crecimiento microbiano, pero debe medirse el potencial riesgo asociado con la formación de nitrosaminas (Joint FAO/WHO Expert, s.f).

Desde el descubrimiento de la propiedad cancerígena de dimetilnitrosamina, muchas otras nitrosaminas se han encontrado que inducen tumores malignos en varias especies de animales de laboratorio. Existe una creciente preocupación con respecto a ciertas nitrosaminas como agentes etiológicos para el cáncer en el entorno humano (Magee y Barnes, 2001). Por lo general, es aceptado que el uso de nitritos como conservante de alimentos puede ser asociado con la formación de nitrosaminas en los alimentos, así como en el organismo animal (Joint FAO/WHO, s.f).

Las nitrosaminas varían en su potencial carcinógeno. Pueden inducir tumores malignos en niveles muy bajos, tal como 2 ppm (0.0002%) en la dieta de las ratas, equivalente a dosis diarias de 0.1 mg/kg. Una dosis oral única de 30 mg/kg de nitrosamina resultó ser cancerígeno en ratas (Crampton, 2000).

Cincuenta y un muestras de una gran variedad de productos de carne contenían 5 µg/kg o menos dimetilnitrosamina (Fazio, Howard y White, 2001). La dimetilnitrosamina se encontró en niveles de 10-80 µg/kg en cinco de 59 muestras cárnicas (Sen, 2011). Análisis de 40 muestras de salchichas frankfurter de ocho grandes productores en los Estados Unidos de América

revelaron la presencia de dimetilnitrosamina en niveles de 2-84 µg/kg. Sen, Donaldson, Iyengar y Panalaks, 2007 informaron que de varias muestras de tocino frito el contenido de nitrosaminas era de 4-25 µg/kg, mientras que aquellas muestras sin freír su contenido era indetectable.

La legislación alimentaria moderna se basa en principios y normas internacionales y es bastante estricta en lo que respecta al uso de aditivos alimentarios, razón por la cual cada vez más se vayan implementando nuevas estrategias para evitar el deterioro microbiológico (Calleja et al., 2010). La inclinación hacia la aplicación de conservantes naturales es la tendencia actual (Rodríguez, 2011).

1.5 Conservantes Naturales

La mayor parte de los compuestos con poder antioxidante y/o antimicrobiano se encuentran presentes en las plantas. Al añadir de forma directa los conservantes naturales a la carne ayudan a una dosificación correcta, rápida y económica. El principal inconveniente suele ser el limitado espectro de actividad y las limitaciones sensoriales, debido a que en ciertos casos, estos compuestos pueden alterar las propiedades organolépticas del alimento, aportando aspecto, olor y/o sabor indeseables al producto. Por este motivo, es esencial que la mínima dosis del conservante natural sea efectiva y menor a su dosis límite de detección sensorial (Fernández, Zhi, Aleson, Pérez y Kuri, 2005).

Actualmente investigaciones se han centrado en plantas medicinales debido a las exigencias del consumidor en cuanto a alimentos más sanos, naturales y libres de sustancias contaminantes. Hierbas y especias son consideradas como GRAS (Generally recognized as safe) (Food and Drug Administration [FDA], s.f) porque no presentan residuales tóxicos, por lo que su uso las hace más seguras que otros aditivos sintéticos potencialmente peligrosos, como por ejemplo, nitritos, nitratos, butilhidroxitolueno y butilhidroxianisol, su empleo ha generado interés en generar métodos más naturales para extender la vida útil

de los alimentos. Igualmente, las plantas aromáticas medicinales poseen compuestos activos antioxidantes y antimicrobianos que pueden cumplir la misma función que sustancias presentes en aditivos sintéticos lo que al mismo tiempo cumple con las expectativas del consumidor (Cardona y Mejía, 2009).

El empleo de plantas aromático medicinales, exclusivamente el uso de romero, será el propósito de la presente investigación.

1.6 Características del Romero

La familia *Labiatae* con sus especies más estudiadas romero (*Rosmarinus officinalis* L.), salvia (*Salvia officinalis* L.), tomillo (*Thymus vulgaris* L.) debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes se destacan como plantas aromático medicinales (Chan, Kong, Yee, Chua y Loo, 2012).

En la industria alimentaria el romero es utilizado como aditivo alimentario GRAS, siendo la única hierba comercialmente disponible para su uso como antioxidante alimentario en Estados Unidos (FDA, s.f; Moreira, Ponce, Del Valle y Roura, 2005). Los productos derivados de la industrialización del romero son: hojas, aceites esenciales y extractos obtenidos por medio de una destilación de la hoja seca libre de aceite con diferentes solventes (FAO, s.f).

En estudios *in vitro* al romero se le ha atribuido el 90% de la actividad antioxidante de hojas y flores de romero a polifenoles diterpenos: ácido carnósico, carnosol (Aruoma, Halliwell, Aeschbach y Loliger, 2003). También lo componen flavonoides: apigenina, genkwanina y luteolina y compuestos altamente volátiles a temperatura ambiente responsables de su característico aroma como verbenona, α -pineno, canfeno y borneol (Okamura, Haraguchi y Yagi, 1994) y ácidos fenólicos como el ácido rosmarínico (Del Bano et al., 2003). En particular, el ácido carnósico se destaca al presentar actividades antimicrobianas y antioxidantes (Aruoma, Halliwell, Aeschbach y Loliger, 2003) al ser el compuesto fenólico que forma mayor parte de la estructura del romero, también constituye el extracto con la mayoría de estudios sobre la capacidad

antioxidante, resultando mejor que aditivos químicos como BHT y BHA (Frankel, Huang, Aeschbach y Prior, 2000; Fernández, Zhi, Aleson, Perez y Kuri, 2005).

El alto contenido de compuestos fenólicos del romero permite obtener tanto compuestos hidrosolubles como liposolubles. La actividad antioxidante y antimicrobiana depende del tipo de compuesto presente, así extractos como carnosol y ácido carnósico presentan mayor efecto en sistemas lipídicos heterofásicos (emulsiones), estos compuestos ejercen actividad quelante frente a radicales peroxilo que intervienen en la peroxidación de los lípidos de la membrana (Frankel, Huang, Aeschbach y Prior, 2000). El ácido rosmarínico ejerce mayor efecto conservante en sistemas acuosos (Hopia, Huang, Schuwarz, German y Frankel, 2006). Además, muestra numerosas funciones del tipo biológicas (antivirales, antiinflamatorias, antibacterianas, antioxidantes) y para defensas contra agresiones externas (Wei y Wang, 2001).

El poder preservante del romero se debe a la suma de los compuestos que lo componen, los cuales presentan diferentes mecanismos de acción: las quinonas isoprenoides (metabolitos secundarios del romero) producen radicales libres inactivos y son secuestrantes de especies reactivas al oxígeno (ROS) como lo hacen los compuestos fenólicos (Basaga, Tekkaya y Acikel, 2005). También, actúan como agentes quelantes de iones metálicos (ión hierro) para evitar la generación de radicales libres y especies reactivas derivadas del oxígeno. Los compuestos fenólicos también tienen una distinta hidrofobicidad, lo cual interviene en el transporte en el interior de la membrana celular, lo que determina al mismo tiempo la actividad antibacteriana (Daglia, 2012). El aceite esencial de romero es el compuesto hidrófobo más importante ya que el 80% se encuentra formado por compuestos fenólicos de importancia como ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico y rosmanol (Aruoma, Halliwell, Aesch y Loliger, 2003; Del Bano et al., 2003) lo que le confiere propiedades antioxidantes como antimicrobianas.

Hernández, Ponce, Jaramillo y Guerrero, 2007 investigaron la actividad antioxidante de diferentes extractos de romero, salvia y orégano en pastas cárnicas, concluyendo que el extracto de romero presentó mayor poder antioxidante que los de orégano y de salvia. Moreira, Ponce, Del Valle y Roura, 2005 concluyeron mediante varios estudios *in vitro* que el aceite esencial de romero presentó un amplio espectro de acción antimicrobiana para bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Shelef, Naglik y Bogen, 2013 demostraron el efecto antimicrobiano de algunas especies actuando el romero principalmente contra organismos como: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

La propiedad antioxidante y antimicrobiana del romero le confiere la capacidad de ser conservante natural por lo que su uso es ampliamente aplicado en carne y sus derivados.

1.6.1 Aplicación del romero como preservante en carne y productos cárnicos

Estudios de Frankel, Huang, Aeschbach y Prior, 2000 sugieren que la actividad antioxidante del romero se debe al carnosol, ácido rosmarínico y al ácido carnósico.

El aceite esencial de romero inhibió con éxito el desarrollo de la oxidación lipídica y la estructura proteica en salchichas Frankfurt debido al efecto antioxidante del romero siendo más intenso a mayores concentraciones (Estevez y Cava, 2005). En otra investigación, se verificó la efectividad de un extracto de romero en concentraciones de 1500 y 2500 ppm versus BHT, BHA en salchichas de cerdo congeladas y precocidas-congeladas, en salchichas de cerdo frescas (500 a 3000 ppm) en refrigeración. Se valoró color, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) el cual es un índice para medir oxidación lipídica y pruebas sensoriales. El análisis del estudio demostró que el extracto de romero a 2500 ppm fue tan efectivo como el BHA y BHT en las

salchichas de cerdo refrigeradas y precocidas-congeladas al mantener valores bajos de TBARS. Mientras en las salchichas crudas los antioxidantes sintéticos presentaron menos eficacia que el extracto de romero al obtener valores TBARS altos o pérdida del color rojo (Sebrabnek, Sewalt, Robbins y Houser, 2005).

La oxidación lipídica en empanadas de carne fue inhibida por el extracto de romero, extracto de orégano, y ácido ascórbico. La combinación de ácido ascórbico y romero mostró la mayor protección contra el desvanecimiento del color y la oxidación de la mioglobina y de lípidos (Sánchez, Djenane, Torrescano, Beltrán y Roncales, 2003).

Diferentes dosis de extractos de romero (0, 250, 500, y 750 ppm) combinados con bajos niveles de nitrito de sodio (40, 80, y 120 ppm) retrasó positivamente la oxidación lipídica en paté de hígado. La concentración de nitrito sódico añadido a paté de hígado podría reducirse de 120 a 80 ppm cuando se añade extracto de romero en las tres concentraciones, sin ningún efecto negativo sobre la oxidación de lípidos, nivel de antioxidantes, y estabilidad de color. Además, el paté con mayor concentración de romero mantuvo el color rojo durante un mayor período de tiempo color (Balentine, Crandall, O'Bryan, Duong, y Pohlman 2006).

Los compuestos responsable de la acción antibacteriana son los fenoles diterpenoides (Del Campo, Amiot, y Nguyen, 2000; Cuvelier, Richard, y Berset, 2002). Estos compuestos actúan dañando la membrana celular, conduciendo a la fuga de los componentes celulares, inactivando de ese modo la destrucción de los microorganismos (Oussalah, Caillet, Saucier y Lacroix, 2006).

Los dos extractos etanólicos de romero *in vitro* e *in situ* presentaron efecto antimicrobiano frente a *S. aureus*, *L. Monocytogenes* y *Salmonella tiphynurium* en una investigación donde se analizó la actividad antimicrobiana del romero (Faixova y Faix, 2008).

Se realizó una investigación con romero para determinar el efecto del romero, cloruro de sodio, lactato de sodio y eritorbato de sodio en la limitación del crecimiento de *Lactobacillus*. Los 3 últimos compuestos no inhibieron el crecimiento microbiano lo que ocasionó el deterioro del alimento por la producción de ácido láctico, mientras el romero fue identificado como una variable más importante para la inclusión en un modelo de jamón cocido (Kalschne, Geitenes, Veit, Sarmiento y Colla, 2014).

En otro estudio, se evaluó el potencial conservante del aceite de romero a diferentes concentraciones, en salami, para sustituir total o parcialmente aditivos como nitrito, butilhidroxianisol. El extracto de romero de mayor concentración presentó mayor control antibacterial *in vitro* frente a *Clostridium perfringens* (Armitage, Hettiarachch y Moonsor, 2002). Productos cárnicos a base de carne de cerdo con diferentes presentaciones y concentraciones de romero fueron almacenados a temperaturas de refrigeración y evaluados a los 0, 1, 3 y 7 días. Los resultados fueron los siguientes: el aceite esencial de romero inhibió el crecimiento de bacterias coliformes y enterococos, mas no el de bacterias aerobias mesófilas, mientras que la especia seca incrementó el número de bacterias aerobias mesófilas, coliformes y enterococos (Hac-Szymanczuk, Lipinska, y Stasiuk, 2011).

El romero al estar compuesto de extractos con propiedades antimicrobianas y antioxidantes representa una ventaja y una nueva alternativa como preservante en productos cárnicos. Sin embargo, es importante emplear la correcta dosificación para así no afectar las propiedades organolépticas y evitar características indeseables en el alimento.

Reemplazar conservantes sintéticos por naturales constituye una alternativa hacia el consumo de productos cárnicos para crear una cultura de alimentación más sana para el ser humano evitando el consumo de aditivos químicos, manteniendo las características organolépticas del producto. Por tanto, sustituir los nitritos en las salchichas de pollo tipo Frankfurt, a partir de la evaluación de

los diferentes tipos de partícula del romero (*Rosmarinus Officinalis L*), planta aromática con potentes propiedades antimicrobianas y antioxidantes, constituye el problema a resolver en este estudio.

2. DESARROLLO METODOLÓGICO

2.1 Localización y duración experimental

El ensayo tuvo una duración de seis meses distribuidos en ensayos consecutivos, donde se elaboró la salchicha de pollo tipo Frankfurt. El estudio se realizó en los laboratorios de Producción de Alimentos y de Análisis pertenecientes a la Facultad de Ingeniería Agroindustrial y de Alimentos de la Universidad de las Américas.

2.2 Proceso de elaboración de salchicha de pollo tipo Frankfurt con adición de Romero

Para la fabricación de salchichas se utilizó una formulación específica para este tipo de embutidos como se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4. Formulación Salchicha Frankfurt.

Ingredientes	Formulación (600 g)	
	%	(g)
Pollo	49,28	295,68
Grasa de cerdo	19,25	115,51
Tocino	9,02	54,14
Hielo	19,25	115,51
Proteína Aislada	0,39	2,31
Carragenina	0,37	2,19
Fosfatos	0,03	0,17
Ácido Ascórbico	0,54	3,24
Eritorbato	0,16	0,98
Sal	1,54	8,66
Ajo	0,24	1,44
Miel de maple	0,02	0,11
Humo Líquido	0,01	0,05
TOTAL	100	600

El proceso de elaboración del producto se detalla en la *Figura 1*, Anexo 1. Es indispensable un cutter (mezclador) para formar la emulsión y también un proceso térmico que le otorgue una consistencia firme y elástica a la salchicha mediante la coagulación de las proteínas.

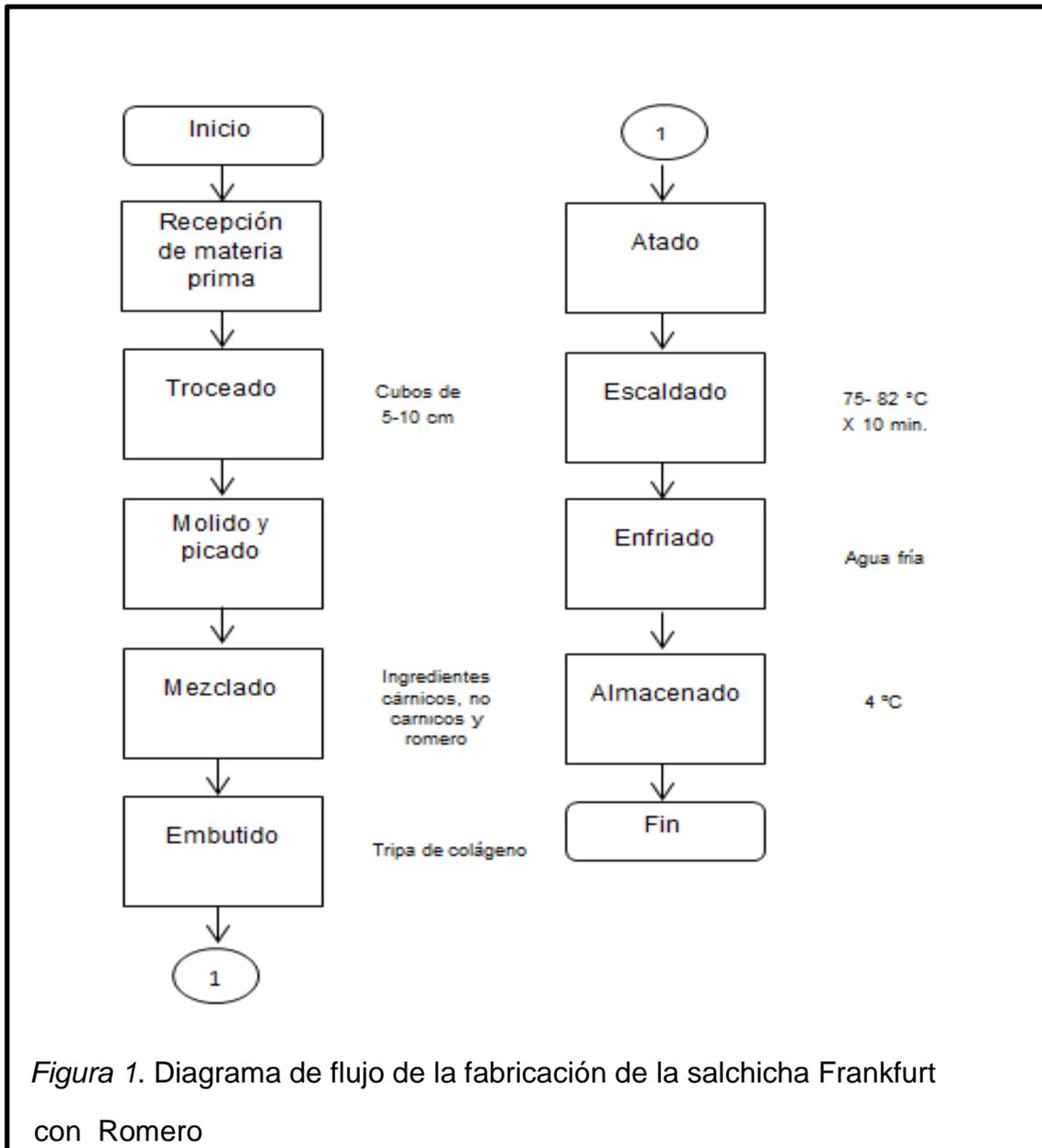


Figura 1. Diagrama de flujo de la fabricación de la salchicha Frankfurt con Romero

2.3 Descripción tecnológica del proceso

Recepción de Materia Prima: se utilizó carne de pollo, lonja de cerdo y tocino, las cuales estaban previamente refrigeradas.

Troceado: los pedazos de carne seleccionados se cortaron en pedazos de aproximadamente 5-10cm.

Molienda y picado: la carne y la grasa se molieron por separado.

Mezclado: esta operación se la realizó simultáneamente en el cutter, aparato provisto de cuchillas, el cual cortó finamente la carne y generó una mezcla homogénea. En el picado se añadieron los ingredientes en el siguiente orden:

1. Carne de pollo, sal y fosfatos, a velocidad lenta hasta alcanzar una pasta gruesa y homogénea.
2. Se agregó 50% de hielo, hasta obtener una pasta fina y bien ligada.
3. Se añadió la lonja o grasa de cerdo.
4. Se agregó la proteína aislada más los condimentos (miel de maple, humo líquido, ajo).
5. Se adicionó eritorbato, ácido ascórbico incluyendo el 25% de hielo restante.
6. Romero (hojas, polvo, aceite esencial), dependiendo el tratamiento.
7. La temperatura de la pasta no excedió de 15 °C.

Embutido: La pasta cárnica se embutió en tripas de colágeno.

Atado: las salchichas se ataron en cadena, alrededor de 10cm, utilizando hilo de algodón.

Tratamiento Térmico: las salchichas se sometieron a pasteurización (escaldado) en agua a 75- 82 °C por 10 minutos.

Choque Térmico: después del tratamiento térmico se bajó la temperatura bruscamente mediante una ducha de agua fría.

Empacado: se empacaron las salchichas al vacío en fundas de polietileno.

Almacenamiento: El producto fue almacenado bajo refrigeración a 4 °C.

2.4 Diseño Experimental

El presente estudio tuvo la finalidad de obtener el mejor tratamiento para elaborar salchichas de pollo tipo Frankfurt mediante el estudio de tres tipos de partícula de romero (polvo, hojas, aceite esencial) y dos concentraciones de la especia (290,350 ppm) como se indica en la Tabla 5. Se utilizó un diseño de Bloques completos al azar con arreglo factorial de 3 x 2 x 3 con seis tratamientos más el control (Tabla 6) y 3 repeticiones, con medidas repetidas en el tiempo a los 1, 15 y 30 días para evaluar características físico-químicos, microbiológicos y sensoriales. Se utilizó el programa estadístico "InfoStat" versión 7.0, con separación de medias Tukey con nivel de significancia del 95% para poder encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. El testigo no fue analizado dentro del programa estadístico ya que no presentó factores ni niveles experimentales al prescindir de romero, por lo que su desviación estándar no estuvo ajustada a la media a diferencia de los demás tratamientos. Para la evaluación sensorial el testigo si formó parte del análisis ya que se necesitaba diferenciar la influencia del romero en la aceptabilidad de las salchichas sin romero.

Tabla 5. Factores en Estudio

FACTOR A	Concentraciones de romero <ul style="list-style-type: none"> • A1 290 ppm • A2 350 ppm
FACTOR B	Tipo de partícula de romero <ul style="list-style-type: none"> • B1 Aceite • B2 Polvo • B3 Hojas

Tabla 6. Tratamientos Experimentales

TRATAMIENTOS	CÓDIGO	DETALLE
T1	A2B1	350 ppm + aceite de romero
T2	A1B1	290 ppm + aceite de romero
T3	A2B3	350 ppm + hojas de romero
T4	A1B3	290 ppm + hojas de romero
T5	A2B2	350 ppm + polvo de romero
T6	A1B2	290 ppm + polvo de romero
T7	Testigo	Sin romero

Para 1 repetición, 1 bloque se utilizó 4.200 g de carne, una formulación de 600 g se destinó para cada tratamiento. De los 600 g, 300 g se destinaron para la evaluación sensorial y los otros 300 g para las medidas repetidas en el tiempo, para los análisis microbiológicos y físico-químicos, se utilizó 2 salchichas por día de 50 gramos cada una.

2.4.1 Esquema Análisis de Varianza (ANDEVA)

El análisis de varianza de las diferentes variables en estudio se llevó a cabo con las Fuentes de Variación y Grados de Libertad que se muestran en la Tabla 7 y Tabla 8.

Tabla 7. Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Total	53
Concentración de Romero	1
Tipo de Partícula de Romero	2
Concentración de Romero x Tipo de Partícula de Romero	2
Tiempo x Concentración de Romero	2
Tiempo	2
Tiempo x Tipo de Partícula de Romero	4
Tiempo x Tipo de Partícula x Concentración	4
Repetición	2
Error	34

Tabla 8. Análisis de varianza de la evaluación sensorial.

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Total	239
Repetición	59
Tratamiento	6
Error	174

2.4.2 Variables en estudio

Humedad

El valor de humedad fue obtenido por medio de desecación en mufla (Norma ISO 1492:2014). Se pesó 5 gramos de salchicha (P), en un crisol con tapa, previamente pesado ($P_o = \text{Peso del crisol} + \text{Peso de la muestra}$), el mismo que fue introducido en la mufla a 105 °C por 24 h. Pasadas las 24 h el crisol se volvió a pesar (P_f) (Anexo 2) y el porcentaje de humedad se calculó con la ecuación 1.

$$\%H = [(P_o - P_f)/P] * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Acidez Titulable

Se pesó 10 gramos de salchicha la cual se introdujo en un vaso volumétrico de 100 ml y se añadió agua destilada a 40 °C hasta alcanzar 100 ml. La mezcla fue agitada y filtrada. Posteriormente se tomó 25 ml de la solución con una probeta lo que representó 2.5 g de la muestra. Finalmente, se llenó una bureta con una solución de sodio 0,1 N para medir la acidez, donde se va titulando la solución con fenoftaleína hasta alcanzar un color rosa para así tomar la lectura en la bureta y calcular la cantidad de hidróxido de sodio utilizado para neutralizar la acidez de la muestra (Anexo 3) y el porcentaje de humedad se calculó con la ecuación 2 (ISO 14388, s.f).

$$\% \text{ Acidez} = V \times N \times \text{Meq} \times 100 \text{ g o ml de muestra} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

V= volumen de NaOH consumidos

N= normalidad del NaOHMeq

Meq= miliequivalente del ácido predominante en la muestra

Potencial de Hidrógeno (pH)

El pH se determinó respecto a la Norma ISO 2917:2014 por homogenización. Se pesó 5 gramos de muestra, 45 ml de agua destilada y se mezcló en un homogeneizador por 1 minuto y se dejó reposar la muestra por 5 minutos. Posterior a esto, se midió el pH de la muestra con un pHmetro calibrado mediante una solución buffer pH 4 (Anexo 4).

Análisis Microbiológico

Para determinar el efecto antimicrobiano de las partículas de romero en las salchichas se evaluaron los microorganismos Aerobios mesófilos Totales según la Norma ISO 4833:2003. En medio de cultivo Tryptic Soy Agar por siembra a profundidad y *Staphylococcus aureus* (NTE INEN 1529 – 14 s.f) en medio de cultivo Mannitol Salt Agar mediante siembra por extensión en superficie. Se elaboró agua de peptona buferada para preparar las diferentes diluciones de siembra. Todos los medios y materiales necesarios se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 2 horas.

El tiempo de incubación para microorganismos Aerobios mesófilos Totales fue de 37 °C por 72 h, 37 °C por 32 h para *Staphylococcus aureus*.

La siembra se llevó a cabo en una cámara de flujo y cada muestra se analizó por triplicado. Se pesó 1 gramo de muestra con bisturís estériles y se la introdujo en tubo de ensayo. Al tubo de ensayo se le agregó 9 ml de agua de peptona. Posteriormente, se homogenizó por 15 minutos. Así, se logró la primera dilución, a partir de esta se obtuvieron las siguientes diluciones. La dilución se ajustó dependiendo de los recuentos. Una vez inoculadas las muestras estas fueron incubadas para proceder al recuento de unidades formadoras de colonias, mediante contador de placas, el resultado fue expresado como log ufc g⁻¹. (Anexo 5) y se calculó con la ecuación 3.

$$ufc = \#colonias \times \frac{1}{fdilución} \times \frac{1}{ml} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Análisis Sensorial

Con el objeto de evaluar los atributos sensoriales y la aceptabilidad de la salchicha de pollo tipo Frankfurt con romero, se realizó un análisis sensorial de olor, color, textura, sabor, sobresabor mediante una escala hedónica de 7 puntos en el Instituto Técnico Superior “Libertad”. Para esta evaluación se contó con un total de 30 estudiantes de enfermería. Cada evaluador recibió 4 muestras elegidas al azar de las cuales tres fueron de los tratamientos más el testigo que siempre estuvo entre las muestras. Las salchichas fueron calentadas y presentadas a los panelistas sobre platos plásticos codificados (tres dígitos) al azar, se utilizó agua y galletas como medio neutralizador. Además, los panelistas respondieron a la pregunta cuánto le gusta la salchicha en una escala hedónica de 1 a 7 puntos (Tabla 9) (Anexo 7).

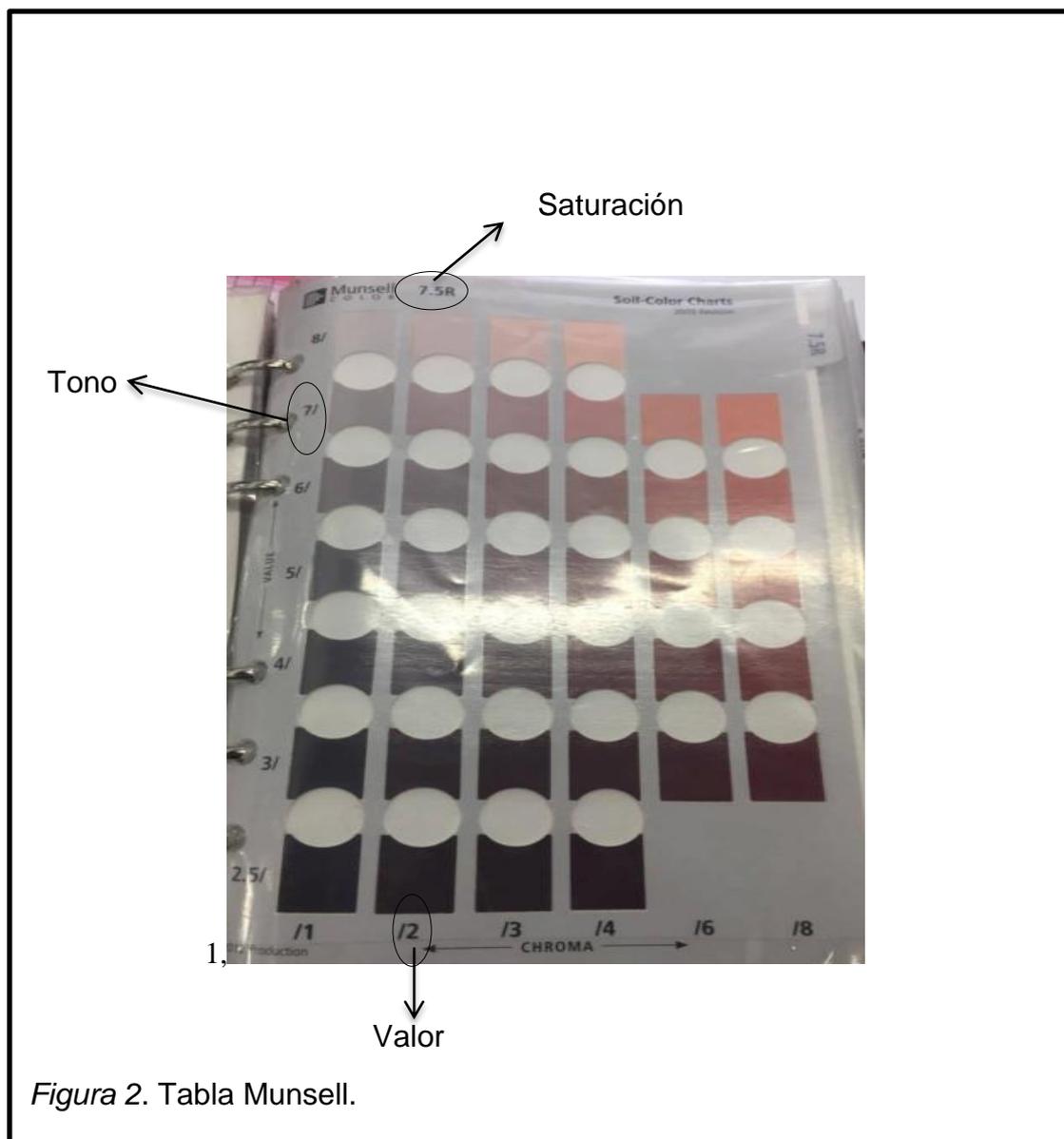
Tabla 9. Escala hedónica.

Valor	Grado de Aceptabilidad
7	Me gusta mucho
6	Me gusta moderadamente
5	Me gusta poco
4	No me gusta ni me disgusta
3	Me disgusta poco
2	Me disgusta moderadamente
1	Me disgusta mucho

Color

El color de las salchichas se determinó cualitativamente por medio de una tabla de colores Munsell, la cual comparó el color de las muestras con los colores de la carta, concediendo un valor de color de acuerdo a la intensidad de la

muestra. La notación del color de la muestra se escribió de la siguiente forma Tono Valor/Saturación (Anexo 7).



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Efecto en la humedad

La humedad constituye aproximadamente el 60%-65% de la composición de una salchicha Frankfurt. Brinda textura y es parte esencial del resultado final en el alimento.

La variable humedad se vio afectada, por la concentración del romero, el tipo de partícula del romero y por el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, la interacción entre los dos primeros factores nombrados, es la de mayor influencia en los resultados obtenidos, mientras el tiempo de almacenamiento fue afectado por la adición de romero, pero no de una manera altamente significativa como muestra la Tabla 10.

Tabla 10. Análisis de varianza de humedad encontrado en las salchichas Frankfurt de pollo durante 30 días.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	p-valor
Total	53	776.11	-	-
Concentración de Romero	1	82,14	82,14	0,0005 **
Tipo de Partícula de Romero	2	213.28	106,64	<0,0001 **
Concentración x Tipo de Partícula	2	120,00	60,00	0,0003 **
Tiempo x Concentración de Romero	2	1,29	0,65	0,8921 ns
Tiempo	2	37,07	18,54	0,0497 *
Tiempo x Tipo de Partícula de Romero	4	3,95	0,99	0,9498 ns
Tiempo x Tipo de Partícula x Concentración	4	3,14	0,79	0,9666 ns
Repetición	2	123,25	61,63	0,0002
Error	34	191,97	5,65	-

Nota: a. * Factor significativo ($P < 0.05$). b. ** Factor altamente significativo ($P < 0.001$). c. ns no significativo

La salchicha Frankfurt con menor humedad, fue la del tratamiento que contiene 350 ppm de aceite esencial de Romero lo que es estadísticamente significativo para todos los tratamientos (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis estadístico de la variable humedad durante 30 días.

Tratamientos	Día 1		Día 15		Día 30	
	Porcentaje de Humedad (Media)	DE	Porcentaje de Humedad (Media)	DE	Porcentaje de Humedad (Media)	DE
Polvo 290 ppm	60,31 A-x	3,37	61, 87 A- x	3,43	62,48 A- y	3,51
Hoja 350 ppm	60,8 A- x	3,31	61, 61 A- x	3,40	62,25 A- y	3,54
Hoja 290 ppm	60,00 A- x	3,27	61, 55 A- x	3,31	62,21 A- y	3,37
Aceite esencial 290 ppm	59,84 A-x	3,17	61,28 A- x	3,28	61,93 A- y	3,45
Polvo 350 ppm	59,75 A- x	3,21	61, 25 A- x	3,29	61,88 A- y	3,47
Aceite esencial 350 ppm	59,13 B- x	3,92	59,17 B- x	4,19	59,37 B- y	4,08
Testigo (sin romero)	60,6	4,92	62,17	5,00	62,47	4,70
Coefficiente de Variación	3,92 %					

Nota: ABC, Letras iguales en la misma columna no tienen diferencia significativa ($P>0.05$)

xyz, Letras iguales en la misma columna no tienen diferencia significativa ($P>0.05$)

El tratamiento de menor humedad (aceite esencial 350 ppm) se podría considerar como adecuado. Según Heinz y Hautzinger, p.5, una baja actividad de agua en una salchicha, evita la proliferación de microorganismos durante el almacenamiento. Estos resultados se podrían explicar porque el aceite esencial de romero desplazó el agua de las salchichas debido a la naturaleza hidrófoba del aceite (Aruoma, Halliwell, Aesch y Loliger, 2003; Del Bano et al.,

2003). El aceite de romero se considera un producto estable (FAO, s.f) porque el secar las hojas previo a la extracción del aceite, limita la reacción con otras sustancias y alarga la vida del aceite esencial. Por otro lado, la actividad antioxidante del aceite esencial de romero mantiene la capacidad de retención de agua de la estructura proteica en embutidos, específicamente Frankfurters (Estevez y Cava, 2005). Las proteínas miofibrilares son las responsables de retener altas cantidades de agua siempre y cuando estas no sufran oxidación. (Estevez y Cava, 2005).

En una comparación no estadística con el control sin romero, todos los tratamientos presentaron menor humedad en este estudio. Las salchichas de control presentaron mayor humedad lo que se podría explicar a la falta de romero y nitrito en la formulación los cuales actúan disminuyendo la humedad y la actividad de agua para cumplir su función conservante (Heinz, Hautzinger, 2007, p.35).

El porcentaje de humedad en productos escaldados como salchichas Frankfurt según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1338:96 tiene un máximo del 65%. Todos los tratamientos se encuentran dentro del límite permitido.

El aceite esencial de romero de 350 ppm afectó la humedad de las salchichas tipo frankfurt, disminuyendo las probables reacciones que ésta podría presentar durante el tiempo de almacenamiento.

3.2 Efecto en la acidez

La acidez en productos cárnicos determina su grado de aceptación por el consumidor. Además, los ácidos en el alimento generalmente inhiben el crecimiento bacteriano y por otro lado es importante su medición ya que una acidez desarrollada en el producto significaría deterioro del producto por reacciones microbiológicas, enzimáticas. En esta investigación, se pudo determinar el efecto del romero en la acidez de las salchichas tipo Frankfurt durante su tiempo de almacenamiento (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de varianza de la acidez de las salchichas durante 30 días.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	p-valor
Total	53	0,85	-	-
Concentración de Romero	1	0,0042	0,00	0,57 ns
Tipo de Partícula de Romero	2	0,27	0,14	0,0003 **
Concentración x Tipo de Partícula	2	0,02	0,01	0,50 ns
Tiempo x Concentración de Romero	2	0,01	0,00	0,69 ns
Tiempo	2	0,02	0,01	0,44 ns
Tiempo x Tipo de Partícula de Romero	4	0,01	0,00	0,97 ns
Tiempo x Tipo de Partícula x Concentración	4	0,04	0,01	0,57 ns
Repetición	2	0,04	0,02	0,22
Error	34	0,44	0,01	-

Nota: a. * Factor significativo ($P < 0.05$). b. ** Factor altamente significativo ($P < 0.001$). c. ns no significativo

La Tabla 12 indica que el tipo de partícula fue el factor determinante en la variable acidez. El aceite esencial de romero, presentó el mayor porcentaje de acidez en las salchichas en todos los días de análisis, haciendo que se diferencie de la hoja y polvo de romero (Tabla 13).

Tabla 13. Diferencia entre las medias de la acidez en las salchichas de pollo Frankfurt durante los 30 días de almacenamiento.

Tipo de Partícula de Romero	Porcentaje de Acidez (Media) (%)	Desviación Estándar
Aceite Esencial	0,373 A	0,21
Hoja	0,340 B	0,21
Polvo	0,330 B	0,19
Testigo (sin romero)	0,305	0,33
Coefficiente de Variación	56, 87 %	

Nota: ABC, Letras iguales en la misma columna no tienen diferencia significativa ($P > 0.05$)

El porcentaje de acidez de las salchichas con aceite esencial en cualquiera de las 2 concentraciones es más adecuado ya que los productos cárnicos necesitan de un nivel acidez leve para así no favorecer el crecimiento bacteriano durante el tiempo de almacenamiento y potenciar la acción de los antimicrobianos (Heinz y Hautzinger, 2007, p.5). El aceite esencial de romero junto con el ácido ascórbico de la formulación actuaron como sinergistas (Sánchez, Djenane, Torrescano, Beltrán y Roncales, 2003), es decir, el ácido ayudó a que el aceite esencial cumpla la función preservante, aumentando la acidez del producto para evitar el desarrollo de bacterias patógenas. También ejerció protección contra el desvanecimiento del color y la oxidación de la mioglobina y de lípidos (Sánchez, Djenane, Torrescano, Beltrán y Roncales, 2003).

Comparando aquellas salchichas sin romero con los demás tratamientos, estas se acidificaron a los 15 días de almacenamiento esto debido a una caída de pH (5,48-5,82-5, 58) (Tabla 13) probablemente a causa del desarrollo de bacterias ácido lácticas las cuales actúan bajando el pH mediante la producción de ácidos orgánicos (láctico), estos resultados coinciden con los de (Kalschne, Geitenes, Veit, Sarmiento y Colla, 2014) y son las principales bacterias causante de deterioro en productos cárnicos escaldados (Devlieghere, Geeraerd, Versyck, Bemaert, Van Impe y Debevere, 2000).

El aceite esencial de romero tuvo efecto en la acidez de las salchichas tipo frankfurt, evitando acidificación del producto durante los 30 días de almacenamiento y manteniendo un medio ácido leve inhibiendo el crecimiento bacteriano.

3.3 Efecto en el pH

El control del pH es un importante indicador en la elaboración de embutidos, tanto de condiciones higiénicas como de procesos de transformación, además de asegurar el correcto grado de acidez del producto. Para este estudio se evaluó el efecto del romero en el pH durante el tiempo de almacenamiento (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de varianza del potencial de Hidrógeno encontrado en las salchichas Frankfurt de pollo durante 30 días.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	p-valor
Total	53	6,97	-	
Concentración de Romero	1	0,01	0,01	0,64 ns
Tipo de Partícula de Romero	2	0,10	0,05	0,35 ns
Concentración x Tipo de Partícula	2	0,03	0,01	0,76 ns
Tiempo x Concentración de Romero	2	0,21	0,10	0,11 ns
Tiempo	2	3,32	1,66	<0,0001 **
Tiempo x Tipo de Partícula de Romero	4	0,17	0,04	0,45 ns
Tiempo x Tipo de Partícula x Concentración	4	0,39	0,10	0,09 ns
Repetición	2	1,22	0,61	<0,0001
Error	34	1,53	0,04	-

Nota: a. * Factor significativo (P<0.05). b. ** Factor altamente significativo (P<0.001). c. **ns** no significativo

La Tabla 14 indica que la variable pH se vio afectada, por el tiempo de almacenamiento. A partir de los 30 días de elaboración las salchichas presentaron una diferencia significativa en el pH (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis estadístico de la variable pH.

Tiempo (días)	Valor de pH (Media)	Desviación Estándar
30	5,92 x	0,33
15	5,69 y	0,29
1	5,55 y	0,38
Testigo (30)	5,58	0,63
Testigo (15)	5,82	0,71
Testigo (1)	5,48	0,62
Coefficiente de Variación	3,99 %	

Nota: xyz, Letras iguales en la misma columna no tienen diferencia significativa ($P > 0.05$)

Para la identidad de derivados cárnicos escaldados es necesario un aumento de pH de 5.6 a 6 para obtener una alta capacidad de retención de agua (CRA) (Heinz y Hautzinger, 2007, p.4), estos resultados se pueden observar en la Tabla 15.

En una comparación no estadística con las salchichas de control, éstas bajaron el pH en esta investigación (Tabla 13), esto posiblemente se debe a procesos deteriorativos como la oxidación probablemente debido a que el testigo no presentó romero en la formulación el cual cumple una importante acción antioxidante en productos cárnicos debido a polifenoles diterpenos: ácido carnósico, carnosol (Aruoma, Halliwell, Aeschbach y Loliger, 2003) los cuales presentan mayor efecto en sistemas lipídicos heterofásicos (emulsiones), estos compuestos ejercen actividad quelante frente a radicales peroxilo que intervienen en la peroxidación de los lípidos (Frankel, Huang, Aeschbach y Prior, 2000). Además, los compuestos fenólicos producen radicales libres inactivos que son secuestrantes de especies reactivas al oxígeno (Basaga,

Tekkaya y Acikel, 2005). Algunos autores citan estudios donde el romero actúa como antioxidante en pastas cárnicas, salchichas Frankfurt, salchichas de cerdo, empanadas de carne (Hernández, Ponce, Jaramillo y Guerrero, 2007; Estevez y Cava, 2005; Sebrabnek, Sewalt, Robbins y Houser, 2005; Sánchez, Djenane, Torrescano, Beltrán y Roncales, 2003).

El valor máximo de pH en productos escaldados como salchichas Frankfurt según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1338:96 es de 6,2. Todos los tratamientos se encuentran dentro del límite permitido.

El romero afectó el pH de las salchichas tipo frankfurt, manteniendo una alta capacidad de retención de agua, retardando procesos oxidativos y conservando el rango de pH adecuado durante el tiempo de almacenamiento.

3.4 Efecto en el crecimiento de Aerobios mesófilos

Un recuento de aerobios mesófilos en productos cárnicos representa una variable para determinar el tiempo de vida útil del alimento ya que refleja la calidad sanitaria, las condiciones de manipulación, las condiciones higiénicas de la materia prima. En la presente investigación se determinó el efecto del romero como antibacterial frente al crecimiento de bacterias mesófilas durante el tiempo de almacenamiento de las salchichas Frankfurt (Tabla 15).

Tabla 16. Análisis de varianza de Aerobios mesófilos encontrado en las salchichas Frankfurt de pollo durante 30 días.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	p-valor
Total	53	36954,57	-	-
Concentración de Romero	1	2477,96	2477,96	0,03 *
Tipo de Partícula de Romero	2	5242,69	2621,34	0,01 *
Concentración de Romero x Tipo de Partícula de Romero	2	993,78	496,89	0,04 *
Tiempo x Concentración de Romero	2	1487,57	743,78	0,25 ns
Tiempo	2	4466,33	2233,17	0,02 *
Tiempo x Tipo de Partícula de Romero	4	1487,57	788,95	0,21 ns
Tiempo x Tipo de Partícula x Concentración	4	752,22	188,05	0,21 ns
Repetición	2	1079,18	539,59	0,36
Error	34	17299,04	508,80	-

Nota: a. * Factor significativo (P<0.05). b. ** Factor altamente significativo (P<0.001). c. ns no significativo

La Tabla 16 indica que la variable aerobios mesófilos se vio afectada por la concentración del romero, el tipo de partícula del romero y por el tiempo de almacenamiento.

El crecimiento de aerobios mesófilos en los tratamientos, se diferenció significativamente por el tipo de partícula y la concentración del romero en la salchicha. El aceite esencial de romero de 350 ppm, mostró el menor recuento de aerobios mesófilos, haciendo que la salchicha, sea diferente a todas las demás (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis estadístico de la variable Aerobios mesófilos a través del tiempo.

Tratamientos	Día 1		Día 15		Día 30	
	(Media) (Log UFC/g)	D.E	(Media) (Log UFC/g)	D. E	(Media) (Log UFC/g)	D. E
Polvo 290 ppm	1,00 A-x	0,00	40,01 21,6 A- x	36,30	56, 15 A-y	52,20
Hoja 350 ppm	1,00 A-x	0,00	15,01 AB-x	0,00	20, 63 AB-y	0,00
Hoja 290 ppm	1,00 A-x	0,00	13,34 AB-x	0,00	19, 14 AB-y	43,90
Aceite esencial 290 ppm	1,00 A-x	0,00	11, 06 AB-x	12,30	17, 42 AB-y	21,80
Polvo 350 ppm	1,00 A-x	0,00	9, 00 AB-x	12,30	15, 02 AB-y	49,10
Aceite esencial 350 ppm	1,00 A-x	0,00	1,00 B- x	0,00	1,00 B-y	0,00
Testigo (sin romero)	61,11	0,00	72, 20	13,90	118,7	16,90
Coefficiente de Variación	8, 15%					

Nota: ABC, Letras iguales en la misma columna no tienen diferencia significativa ($P > 0.05$), xyz, Letras iguales en la misma fila no tienen diferencia significativa ($P > 0.05$). D.E= Desviación Estándar

A partir de los 15 días de elaboración el aceite esencial de romero de 350 ppm logró la mayor reducción logarítmica de crecimiento bacteriano en las salchichas de pollo tipo Frankfurt (Anexo 8), a diferencia de estudios reportados por Hac-Szymanczuk, Lipinska y Stasiuk,(2011) quienes concluyeron que los extractos de romero no tuvieron ningún efecto en el crecimiento de aerobios mesófilos en derivados cárnicos. El efecto antimicrobiano del aceite esencial de romero posiblemente se debe a que fue el tratamiento que presentó menor porcentaje de humedad (Tabla 11) y un apropiado nivel de acidez (Tabla 13).

Una menor actividad de agua y correcta acidez en el alimento evita la proliferación de microorganismos (Heinz y Hautzinger, p. 5). La actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero depende de la concentración usada (Armitage, Hettiarachch y Moonsor, 2002; Sebrabnek, Sewalt, Robbins y Houser, 2005), por esta razón es que las salchichas con aceite esencial de 350 ppm son las que mayor reducción de aerobios mesófilos presentaron comparándolas con las salchichas sin romero en esta investigación. El aceite esencial de romero contiene un conjunto de compuestos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, destacándose el ácido carnósico por el poder antimicrobiano el cual actúa desnaturalizando las proteínas y lípidos de los microorganismos debido a su poder antioxidante, lo que origina la desorganización de la permeabilidad de la membrana celular (Oussalah, Caillet, Saucier, y Lacroix, 2006).

De acuerdo a Heinz y Hautzinger, 2007, p. 60 los microorganismos tienen fases de crecimiento de latencia, logarítmica, de retraso y terminal. Realizando una comparación no estadística de aquellas salchichas sin romero con los demás tratamientos, en este estudio al día 1, tanto en las salchichas con aceite esencial como el control las bacterias aerobias mesófilas se mantuvieron en fase de latencia (1 UFC/g), mientras a los 15 y 30 días estas empezaron la fase logarítmica de crecimiento, donde el romero al día 15 probablemente empezó el efecto antibacteriano y antioxidante ya que mantuvo el recuento bacteriano inicial.

La Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1338:96 permite un máximo de 250000 UFC/g de aerobios mesófilos en productos cárnicos escaldados. Todos los tratamientos se encuentran dentro del límite permitido.

El aceite esencial de romero de 350 ppm afectó el crecimiento de aerobios mesófilos en las salchichas tipo frankfurt, debido a la acción antimicrobiana del ácido carnósico el cual actúa sobre la membrana celular lo que conduce a la fuga de los componentes celulares, inactivando de ese modo la destrucción de los microorganismos.

3.5 Efecto en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*

En el proceso de elaboración de embutidos un recuento de *Staphylococcus aureus* es importante como indicador de contaminación cruzada y recontaminación durante el proceso de elaboración.

El efecto antimicrobiano del romero no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, en una comparación no estadística con las salchichas sin romero, aquellas con romero presentaron mayor reducción de crecimiento de *Staphylococcus aureus* hasta los 30 días en esta investigación, a diferencia de investigaciones de Moraes, Pereira, Almeida, Barcellos y Bersot, 2014; Waters et al., 2011 quienes demostraron la resistencia de *Staphylococcus aureus* a nitritos y antibióticos lo que no ocurrió con el romero, lo que quiere decir que probablemente el romero tuvo efecto antibacteriano independientemente del tipo de partícula y concentración. Resultados similares reportaron Shelef, Naglik y Bogen, 2013; Barut, 2013 donde el romero presentó un amplio espectro de acción antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Heinz y Hautzinger, (2007, p. 324), explican que *Staphylococcus aureus* es el patógeno que presenta mayor tolerancia a la actividad de agua donde las salchichas sin romero presentaron mayor humedad (Tabla 11) lo que facilitó el desarrollo de esta bacteria, además de ser las que menor acidez presentaron. A pesar de que al día 1 las salchichas con o sin romero no presentaron diferencia de crecimiento (1,00 UFC/g), en el día 15 es donde posiblemente al haber sobrevivido esporas o la toxina de *Staphylococcus aureus* durante el tratamiento térmico del control esta empezó la fase logarítmica de crecimiento en concordancia con FAO, s.f. que explica la termoresistencia de la toxina de *Staphylococcus aureus*, es decir, al día 15 es donde el efecto antibacteriano del romero empezaría.

La Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1338:96 permite un máximo de 1000 UFC/g de *Staphylococcus aureus* en productos cárnicos escaldados. Todos los tratamientos se encuentran dentro del límite permitido.

Se puede concluir que estadísticamente las salchichas con romero no presentaron una diferencia significativa, pero al ser las salchichas de control las que mayor contaminación microbiana presentaron se podría deducir que el romero influyó en la reducción de *Staphylococcus aureus* durante los 30 días de almacenamiento disminuyendo la humedad y manteniendo un medio ácido de las salchichas de pollo tipo Frankfurt.

3.6 Efecto en la aceptación de la salchicha

El análisis sensorial afectivo de un producto es esencial para determinar la aceptación del mismo por el consumidor como también permite evaluar que tanto gusto encuentran en el color, olor, textura y sabor del alimento. En esta investigación se evaluó la aceptabilidad de salchichas de pollo tipo Frankfurt con romero (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis de varianza del análisis sensorial en las salchichas Frankfurt de pollo en el día 1.

F.V	COLOR			OLOR			TEXTURA			SABOR		
	S.C	C.M	p-valor	S.C	C.M	p-valor	S.C	C.M	p-valor	S.C	C.M	p-valor
Total	239	821,98	-	-	767,56	-	-	767,18	-	-	927,85	-
Repetición	59	207,13	0,11	3,51	232,71	0,005	23,94	242,90	0,0023	4,1	216,14	0,25
Tratamiento	6	139,19	<0,0001 **	23,2	126,70	<0,0001 **	21,12	120,38	<0,0001 **	20,06	154,30	<0,0001 **
Error	174	475,67	-	-	408,16	-	2,35	403,90	-	2,32	557,42	3,20
C.V	C.V (%) : 36,01			C.V (%) : 32,67			C.VT (%) : 33,06			C.V (%) : 42,36		

Nota: a. *Factor significativo (P<0.05). b. ** Factor altamente significativo (P<0.001). c. ns = Factor no significativo (P>0.05). d. F.V= Fuente de variación. e. C.M= Cuadrados medios. f. S.C= Suma de cuadrados. g. C.V= Coeficiente de variación.

La aplicación de romero en las salchichas de pollo tipo Frankfurt influyó en la aceptación en las variables de color, olor, sabor, textura en el producto durante el primer día de evaluación (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis estadístico de la Aceptación de las Salchichas.

TRATAMIENTO	COLOR		OLOR		TEXTURA		SABOR	
	M	D.E	M	D.E	M	D.E	M	D.E
Aceite esencial 350 ppm	6 A	1,27	6 A	1,01	6 A	1,13	6 A	1,55
Aceite esencial 290 ppm	5 AB	2,11	5 AB	1,86	5 AB	1,91	5 AB	2,55
Hoja 350 ppm	5 AB	1,49	5 AB	1,41	5 AB	7,19	5 AB	1,56
Hoja 290 ppm	5 AB	1,52	5 AB	1,46	5 AB	1,51	5 AB	1,55
Polvo 350 ppm	4 ABC	1,66	5 AB	1,68	5 AB	1,50	5 AB	1,57
Polvo 290 ppm	4 ABC	1,97	5 AB	1,95	5 AB	2,03	4 ABC	2,11
Testigo (sin romero)	3 D	1,64	3 C	1,67	3 C	1,33	3 D	1,19

Nota: a. ABCD, Letras iguales en la misma columna no tienen diferencia significativa ($P > 0.05$).
 b. 6: Me gusta moderadamente. c. 5: Me gusta poco. d.4: No me gusta ni me disgusta. e. 3: Me disgusta poco. f. M: Media. g. D.E: Desviación estándar

La Tabla 19 indica que el aceite esencial de 350 ppm es el que gustó moderadamente y el que se diferenció con el control en las variables sensoriales de color, olor, textura y sabor en las salchichas, por lo tanto, las salchichas con romero gustaron más que aquellas sin la especia, esto posiblemente debido a que el aceite esencial de romero fue el que presentó una adecuada acidez (Tabla 13) lo que puede explicar porque a las personas les gustó el sabor, además de ser considerado el romero como una especia que realza el sabor de las comidas (Rodríguez, 2011). El gusto del olor de las salchichas con romero se puede explicar debido a que el aceite esencial de romero está formado por un grupo de compuestos altamente volátiles a temperatura ambiente como verbenona, α -pineno, canfeno y borneol (Okamura, Haraguchi y Yagi, 1994). El gusto moderado por el color y textura de

las salchichas con aceite esencial de romero podría ser debido a la capacidad antioxidante del romero ya que la acción conjunta del ácido ascórbico con el romero ayuda a ejercer protección contra el desvanecimiento del color y la oxidación de la mioglobina. (Sánchez, Djenane, Torrescano, Beltrán y Roncales, 2003).

Los resultados estadísticos en base a la escala hedónica muestran que las salchichas con aceite esencial de 350 ppm fueron las que mayor puntuación presentaron respecto a los demás tratamientos, por lo tanto, existió una diferencia de opinión en los catadores ya que encontraron un gusto moderado de color, olor, textura y sabor por aquellas salchichas con aceite esencial de 350 ppm a diferencia de las salchichas sin romero que mostraron disgusto a los panelistas.

3.7 Efecto del Color

Los consumidores asocian la mayoría de productos cárnicos procesados como salchichas con un color rosa o rojo atractivo después del tratamiento térmico. Mediante el uso de tablas Munsell se evaluó el efecto del uso de romero en el color de las salchichas a través del tiempo (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de color durante los 30 días de almacenamiento.

Tratamientos	Día 1	Día 15	Día 30
	COLOR	COLOR	COLOR
Polvo 290 ppm	8/22.5 Y	8/210Y R	8/22.5 Y
Hoja 290 ppm	8/12.5 Y	8/210Y R	8/27.5 YR
Hoja 350 ppm	8/12.5 Y	8/210Y R	8/27.5 YR
Polvo 290	8/12.5 Y	8/110Y R	8/12.5 Y
Aceite esencial 290 pm	8/22.5 Y	8/27.5 YR	8/27.5 YR
Aceite esencial 350 ppm	7/12.5 YR	8/37.5 R	8/37.5 R
Testigo	8/25 YR	7/37.5 YR	7/27.5 YR

Nota: a. Los valores de Color están dados por Tono/Valor/Saturación. b. Y: Amarillo. c. YR: Amarillo-Rojo. d. R: Rojo



Figura 3. Color día 1 Testigo.

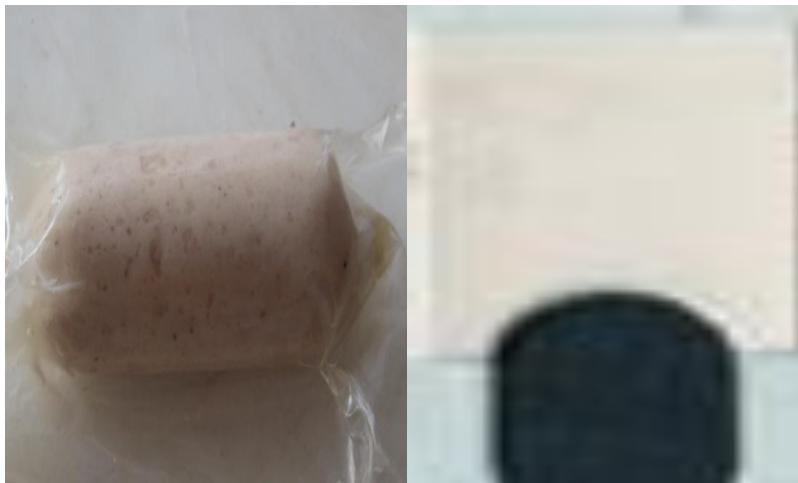


Figura 4. Color día 1 AE 350 ppm.



Figura 5. Color día 15 AE 350 ppm.



Figura 6. Color día 15 Testigos.



Figura 7. Color día 30 AE 350 ppm.



Figura 8. Color día 30 Testigo.

Las salchichas con aceite esencial de romero de 350 ppm mantuvieron un color rosa durante los 30 días de almacenamiento. Estos resultados se pueden explicar debido a que el romero al actuar como antioxidante retrasa procesos de rancidez en las salchichas evitando alteración de olor, sabor, color (Balentine, Crandall, O'Bryan, Doung y Pohlman, 2006), específicamente, la combinación de ácido ascórbico y romero en esta investigación podría tener efecto contra el desvanecimiento del color y la oxidación de la mioglobina de las salchichas con romero (Sánchez, Djenane, Torrescano, Beltrán y Roncales, 2003), comparándolas con aquellas sin romero. Estos resultados se pueden explicar ya que para lograr el deseado color rojo o rosáceo de los productos cárnicos se utiliza nitrito y las salchichas de control prescindieron de este aditivo el cual tiene la capacidad de reaccionar con la mioglobina del tejido muscular de la carne en un medio ácido para formar nitrosomioglobina, un pigmento de la carne curada, un compuesto rojo brillante, que es estable al calor (Heinz y Hautzinger, 2007, p. 35).

4. CONCLUSIONES

El aceite esencial de romero tuvo el mayor efecto antimicrobiano en las salchichas de pollo tipo Frankfurt al reducir la humedad, mantener un medio ácido apropiado y presentar la mayor reducción logarítmica de crecimiento de aerobios mesófilos. El tipo de partícula no influyó en el crecimiento *Staphylococcus aureus* durante los 30 días de almacenamiento.

El contenido de agua y crecimiento bacteriano de aerobios mesófilos en las salchichas de pollo Frankfurt se vieron reducidas por el aceite esencial de romero de mayor concentración (350 ppm). La concentración de romero no tuvo influencia en el crecimiento *Staphylococcus aureus* durante los 30 días de almacenamiento.

Las salchichas de pollo tipo Frankfurt con aceite esencial de romero de 350 ppm son las más adecuadas para el consumo humano hasta los 30 días de almacenamiento ya que cumplen con los requisitos establecidos por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1338:96.

Las salchichas de pollo tipo Frankfurt con aceite esencial de 350 ppm fueron las que gustaron moderadamente a los consumidores, por su sabor, color, olor y textura.

5. RECOMENDACIONES

Utilizar el aceite esencial de romero de 350 ppm como ingrediente de embutidos escaldados.

Continuar con nuevos estudios en los que se trabaje con diferentes concentraciones de aceite esencial de romero en combinación con plantas de la familia *Labiatae* para lograr un mayor efecto antimicrobiano.

Extender el tiempo de análisis hasta que las salchichas no se encuentren dentro de los parámetros permitidos por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1338:96 para lograr dar un tiempo estimado de vida útil.

Realizar estudios de vida útil evaluando la estabilidad oxidativa del producto para así valorar el efecto del aceite de romero como antioxidante hasta los 45 días a partir de la fecha de elaboración.

Evaluar sensorialmente las salchichas escaldadas con aceite esencial de romero de 350 ppm hasta los 45 días de almacenamiento asegurando la inocuidad del producto y alcanzando un mayor gusto sensorial por los consumidores.

Ampliar investigaciones del romero sobre el espectro de actividad antimicrobiana en embutidos en bacterias de importancia como *Clostridium botulinum*.

REFERENCIAS

- Armitage, D., Hettiarachchy, N., y Monsoor, M. (2002). Natural antioxidants as a component of an egg albumen film in the reduction of lipid oxidation in cooked and uncooked poultry. *Journal of Food Science*. 2(67), 631-634. Recuperado el 14 de Abril del 2015 de: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10650.x/epdf?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com
- Aruoma , O., Halliwell, B., Aeshbach, R., y Loliger, J. (2003). Antioxidant and prooxidant properties of active rosemary constituents: Carnosol and Carnosic Acid. *PubMed*. 22(2), 257-268. Recuperado el 22 de Febrero del 2003 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378672>.
- Babalan, N., y Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. Recuperado el 16 de Junio del 2000 de: <http://www.journals.elsevier.com/international-journal-of-food-microbiology/open-access-articles/>.
- Balentine, C., Crandall, P., O'Bryan, C., Doung, D., y Pohlman, F. (2006). The pre and post grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and colour during storage of ground beef. *Meat Science*. Recuperado el 7 de Julio del 2006 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062478>.
- Basaga, H., Tekkaya, C., y Acikel, F. (2005). Antioxidative and Free Radical Scavenging Properties of Rosemary Extract. *Food Science and Technology*. Recuperado el 1 de Febrero del 2005 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643896901279>.
- Calleja, C., Lanzarote, I., Björkroth, J., Gonzáles, R., Moragrega, R., y Cocero, J. (2010). *Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos*. Madrid: IM&C.
- Camack , R., Joannou, C., Cui, X., Torres, C., Maraj, S., y Hughes, M. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et*

- Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. Recuperado el 11 de Octubre de 2000 de: <http://europepmc.org/abstract/MED/10320676>.
- Cardona, F., & Mejía, G. (2009). Evaluation of Antioxidant Effects of Essential Oils and Extracts from *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, and *Thymus vulgaris*. *Biosalud*. Recuperado el 1 de Septiembre del 2014 de: <http://www.revistavirtualpro.com/biblioteca/evaluacion-del-efecto-antioxidante-de-aceites-esenciales-y-extractos-de-eugenia-caryophyllata-origanum-vulgare-y-thymus-vulgaris>.
- Chan, E., Kong, L., Yee, K., Chua, W., y Loo, T. (2012). Antioxidant and antibacterial properties of some fresh and dried *Labiatae* herbs. *Free Radicals and Antioxidants*. Recuperado el 13 de Julio del 2012 de: https://www.researchgate.net/publication/257747393_Antioxidant_and_antibacterial_properties_of_some_fresh_and_dried_Labiatae_herbs.
- Codex Alimentarius Commission*. (s.f). Distribution of the Report of the Fifteenth Session of the Codex Committee on Processed Meat and Poultry Products. Recuperado el 10 de Julio del 2000 de: http://www4.fao.org/cgi-bin/faobib.exe?rec_id=316509&database=faobib&search_type=link&table=mona&back_path=/faobib/mona&lang=eng&format_name=EFMON.
- Codex Alimentarius, C*. (s.f). Norma General para los Aditivos Alimentarios. Recuperado el 1 de Febrero del 2016 de: http://www.codexalimentarius.net/gsfonline/docs/CXS_192s.pdf.
- Crampton, R. (2000). Carcinogenic dose-related response to nitrosamines. *Pubmed*. Recuperado el 1 de Diciembre del 2000 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7443156>.
- Cuvelier, M., Richard, H., y Berset, C. (2002). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists Society*. Recuperado el 3 de Mayo del 2002 de: <http://link.springer.com/article/10.1007%2F02518121#page-1>.

- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*. Recuperado el 23 de Abril del 2012 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21925860>.
- Dávila, R. (2008). *Estudio de Factibilidad para a Instalación de una Fábrica de Embutidos en el Sector de San Jacinto*. (Tesis Maestria). Universidad Técnica del Norte. Ibarra.
- Del Bano, M., Lorente, J., Castillo, J., Benavente, O., Del Río, J., y Ortuno, A. (2003). Phenolic Diterpenes, Flavones and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems and Roots of *Rosmarinus officinalis*. *PubMed*. Recuperado el 16 de Julio del 2003 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12848492>.
- Del Campo, J., Amiot, M., y Nguyen, T. (2000). Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*. Recuperado el 6 de Octubre del 2000 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11041135>.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A., Versyck, K., Bemaert, H., Van Impe, J., y Debevere, J. (2000). Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International Journal Food Microbiology*. Recuperado el 30 de Junio del 2000 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10898466>.
- Dong, X., y Holley, R. (2012). Antimicrobial and Antioxidative Strategies to Reduce Pathogens and Extend the shelf life of Red Fresh Meats. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Recuperado el 12 de Junio del 2012 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2012.00188.x/abstract>.
- Estevez, M., y Cava, R. (2005). Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. *Meat Science*. Recuperado el 7 de Febrero del 2005 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22061564>.
- Faixova, Z., y Faix, S. (2008). Biological effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil. *Folia Veterinaria*. Recuperado el 25 de

- Febrero del 2008 de:
http://www.ramiran.net/doc08/FOLIA_2008_3_4/FOLIA_Faixova.pdf.
- Fazio, T., Howard, J., y White, R. (2001). Analysis of nitrite- and-or nitrate-processed meats for N-nitrosodimethylamine. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. Recuperado el 4 de Julio del 2008 de:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444144>.
- Fernández, J., Zhi, N., Aleson, L., Perez, J., y Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*. Recuperado el 6 de Marzo del 2005 de:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062974>.
- Food and Agriculture Organization [FAO]*. (s.f). Guidelines for slaughtering, meat cutting and further processing. Recuperado el 13 de Julio del 2000 de: <http://www.fao.org/docrep/004/t0279e/T0279E00.htm>.
- Food and Agriculture Organization [FAO]*. (s.f). Codex Alimentarius Commission. In F. FAO, Procedural Manual - Twelfth Edition. Recuperado el 19 de Abril del 2000 de: <http://www.fao.org/3/a-i3243e.pdf>.
- Food and Agriculture Organization [FAO]*. (s.f). Experiences of Near East Countries on Utilization and Processing of Rosemary. Recuperado el 2 de Febrero del 2012 de:
<http://www.fao.org/docrep/meeting/024/mc937e.pdf>.
- Food and Drug Administration [FDA]*. (s.f). Substances Generally Recognized as Safe. Recuperado el 6 de Enero del 2014 de:
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=182.20>.
- Frankel, E., Huang, S., Aeschbach, R., y Prior, E. (2000). Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Recuperado el 18 de Enero del 2000 de: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf950374p>.
- Hac-Szymanczuk, E., Lipinska, E., y Stasiuk, M. (2011). The Effect of Rosemary Preparations on the Microbial Quality and TBARS Value of

- Model Pork Batters. *Scientiarum Polonorum*. Recuperado el 11 de Febrero del 2011 de: http://www.food.actapol.net/pub/3_2_2011.pdf.
- Heinz, G., y Hautzinger, P. (2007). *Meat Processing Technology for Small to Medium Scale Producers*. Bangkok: ISBN. pp. 1-428.
- Hernández, E., Ponce, E., Jaramillo, M., y Guerrero, I. (2007). Efecto Antioxidante de Extractos de Romero (*Rosmarinus officinalis L.*) de Salvia de Bolita (*Buddleia perfoliata Kunth*) y de Oregano Mexicano (*Lippia spp*) en pastas cárnicas. *RESPYN*. Recuperado el 24 de Agosto del 2010 de: [https://www.EfectoAntioxidantedeExtractosdeRomero\(Rosmarinus+officinalis+L.\)deSalviadeBolita\(Buddleia+perfoliataKunth\)ydeOreganoMexicano\(Lippia+spp\)enpastasc%C3%A1rnicas](https://www.EfectoAntioxidantedeExtractosdeRomero(Rosmarinus+officinalis+L.)deSalviadeBolita(Buddleia+perfoliataKunth)ydeOreganoMexicano(Lippia+spp)enpastasc%C3%A1rnicas).
- Hopia, A., Huang, S., Schuwarz, K., German, B., y Frankel, E. (2006). Effect of Different Lipid Systems on Antioxidant Activity of Rosemary Constituents Carnosol and Carnosic Acid with and without α -Tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Recuperado el 15 de Agosto del 2006 de: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf950777p>.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]*. (s.f). Carne y Productos Cárnicos. Salchichas. Recuperado el 13 de Enero del 2011 de: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1338.2012.pdf>.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]*. (s.f). NTE INEN 1529-14 (s.f): Control microbiológico de los alimentos. *Staphylococcus aureus*. Recuperado el 1 de Mayo del 2011 de: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.14.1998.pdf>.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]*. (s.f). NTE INEN 1529-5 (s.f). Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. Recuperado el 1 de Enero del 2006 de: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.5.2006.pdf>.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]*. (s.f). Carne y Productos Cárnicos. Recuperado el 1 de Julio del 2011 de: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1338.2012.pdf>.

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos [INEC]. (s.f). Sistema Integrado de Consulta de Clasificaciones y Nomenclatura. Recuperado el 24 de Mayo del 2012 de: http://www.inec.gob.ec/estadisticas/SIN/co_alimentos.php?id=21174.01.03.

International Organization for Standardization [ISO]. (s.f). Acid-base accounting. Recuperado el 12 de Febrero del 2014 de: <http://www.iso.org>.

International Organization for Standardization [ISO]. (s.f). Determination of moisture content. Recuperado el 11 de Octubre del 2015 de: <http://www.iso.org>.

International Organization for Standardization [ISO]. (s.f). Measurement of the pH. Recuperado el 1 de Diciembre del 2001 de: <http://www.iso.org>.

James, S., y James, C. (2002). *Meat Refrigeration* (1ra Edición). England. ISBN.

Joint World Health Organization/ Food and Agriculture Organization Expert Committee on Food Additives (Joint WHO/FAO). (s.f). Recuperado el 25 de Junio del 2005 de: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v05je15.htm>.

Joint World Health Organization/ Food and Agriculture Organization Expert Consultation (Joint WHO/FAO). (2003). Diet, Nutrition and the prevention of Chronic Diseases. Recuperado el 5 de Diciembre del 2003 de: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/download/en/>.

Kalschne, D., Geitenes, L., Veit, M., Sarmiento, C., y Colla, E. (2014). Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by rosemary: a model approach. *Meat Science*. Recuperado el 9 de Diciembre del 2014 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25108514>.

Larsson, S., Bergkvist, L., y Wolk, A. (2006). Processed meat consumption, dietary nitrosamines and stomach cancer risk in a cohort of Swedish women. *National Institute of Health*. Recuperado el 15 de Agosto del 2006 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16550597>.

- Mac Donald , B., Gray, J., y Gibbins, L. (2000). Role of Nitrite in Cured Meat Flavor: Antioxidant Role of Nitrite. *Journal of Food Science*. Recuperado el 5 de Julio del 2000 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1980.tb07473.x/abstract>.
- Magee, P., y Barnes, J. (2001). The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Relevance of Nitrosamines in human Cancer*. Recuperado el 10 de Marzo del 2001 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2074083/>.
- Mann, C., y Markham, J. (2002). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*. Recuperado el 8 de Abril del 2002 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9633651>.
- Moraes, L., Pereira, J., De Almeida, J., Barcellos, V., y Bersot, L. (2014). Behavior of *Staphylococcus aureus* and autochthone microbiota in fresh sausages added of sodium nitrite and stored under refrigeration. *Ciência Rural*. Recuperado el 22 de Febrero del 2014 de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014001001880.
- Moreira, M., Ponce, A., Del Valle, C., y Roura, S. (2005). Inhibitory Parameters of Essential oils to Reduce a Food Borne Pathogen. *Food Science Technology*. Recuperado el 17 de Agosto del 2005 de: https://www.researchgate.net/publication/222186515_Inhibitory_parameters_of_essential_oils_to_reduce_a_foodborne_pathogen.
- Okamura, N., Haraguchi, H., y Yagi, A. (1994). Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*. Recuperado el 3 de Noviembre de 1994 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765765>.
- Rodriguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*. Recuperado el 1 de Abril del 2011 de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46116742014>.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., y Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida*

- strain isolated from meat. *Meat Science*. Recuperado el 25 de Junio del 2006 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062294>.
- Sánchez, A., Djenane, D., Torrescano, G., Beltrán, J., y Roncales, P. (2003). Antioxidant Action of Borage, Rosemary, Oregano, and Ascorbic Acid in Beef Patties Packaged in Modified Atmosphere. *Journal of Food Science*. Recuperado el 20 de Julio del 2006 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14162.x/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+3+Mar+from+10-13+GMT+for+monthly+maintenance>.
- Savic, I. (2000). Small-scale sausage production. *FAO Corporate Document Repository*. Recuperado el 19 de Noviembre del 2000 de: <http://www.fao.org/docrep/003/x6556e/X6556E00.htm>.
- Sebrabnek, J., Sewalt, V., Robbins, K., y Houser, T. (2005). Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science*. Recuperado el 9 de Febrero del 2005 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062821>.
- Sen, N., Donaldson, B., Iyengar, J., y Panalaks, T. (2007). Nitrosopyrrolidine and Dimethylnitrosamine in Bacon. *Nature*. Recuperado el 16 de Febrero del 2007 de: <http://www.nature.com/nature/journal/v241/n5390/abs/241473a0.html>.
- Sen, N. (2011). The evidence for the presence of dimethylnitrosamine in meat products. *Food and Cosmetics Toxicology*. Recuperado el 10 de Abril del 2011 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5072821>.
- Shelef, L., Naglik, O., y Bogen, D. (2013). Sensitivity of some common foodborne bacteria to the spices sage, rosemary, and all spice. *Journal of Food Science*. Recuperado el 15 de Julio del 2013 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1980.tb07508.x/abstract>.
- Vanderzant, C., Russel, J., y Foster, A. (2001). *An Evaluation of the Role of Microbiological Criteria for Foods and Food Ingredients*. Washington: National Academies Press (US).

- Tiwari, B., Valdramidis, V., Donnell, C., Muthukumarappan, K., Bourke, P., y Cullen, J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Recuperado el 23 de Junio del 2009 de: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf900668n>.
- Valle, P., y Florentino, B. (2000). *Toxicología de alimentos*. Instituto Nacional de Salud Pública. Recuperado el 5 de Diciembre del 2000 de: <http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Toxicologiaderaliemnatosar.pdf>.
- Walker, R. (2006). Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: A review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Taylor & Francis Group*. Recuperado el 7 de Noviembre del 2006 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2079111>.
- Waters, A., Contente, T., Buchhagen, J., Liu, C., Watson, L., Pearce, K., y Price, L. (2011). Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry. *Clinical Infectious Diseases*. Recuperado el 1 de Mayo del 2011 de: <http://cid.oxfordjournals.org/content/early/2011/04/14/cid.cir181.full>.
- Wei, Z., y Wang, S. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Recuperado el 9 de Noviembre del 2001 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714298>.
- World Health Organization [WHO]*. (s.f). Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Recuperado el 4 de Julio del 2002 de: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=711>.

ANEXOS

Anexo 1: Proceso de elaboración de salchicha de pollo tipo Frankfurt con adición de Romero



Anexo 2: Determinación de Humedad



Anexo 3: Determinación de acidez



Anexo 4: Medición de pH



Anexo 5: Análisis microbiológico



Anexo 6: Análisis sensorial



PRUEBA AFECTIVA DE SALCHICHAS TIPO FRANKFURT

Nombre:

2015

Fecha: 11-09-

INSTRUCCIONES

1. Frente a usted hay cuatro muestras de salchichas Frankfurt codificadas con 3 dígitos.
2. Pruebe cada una de las muestras de izquierda a derecha en el orden de la presentación.
3. Tome un sorbo de agua y a continuación galletas de soda para limpiar el paladar antes de degustar cada una de las muestras.
4. Una vez degustada la salchicha completa coloque el puntaje que usted crea le da a cada característica de la muestra (apariciencia, aroma, textura, sabor, sobresabor) basándose en la escala hedónica de 7 puntos que se encuentra en el cuadro inferior, de acuerdo a la codificación de cada muestra.

Código: 518

Característica	Me disgusta mucho (1)	Me disgusta moderadamente (2)	Me disgusta poco (3)	No me gusta ni me disgusta (4)	Me gusta poco (5)	Me gusta moderadamente (6)	Me gusta mucho (7)
Apariciencia (color)							
Aroma (olor)							
Textura							

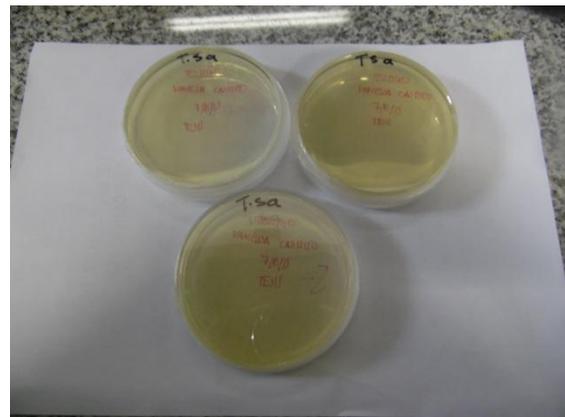
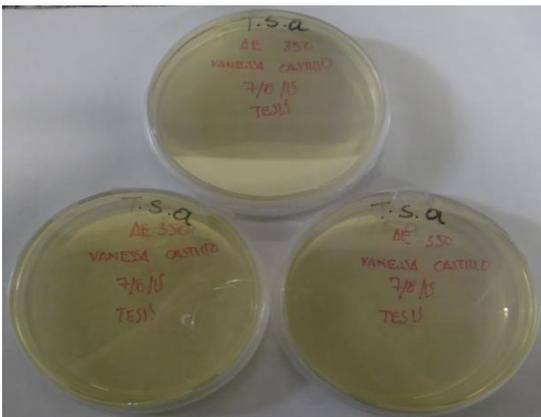
Anexo 7: Determinación de Color



Anexo 8: Resultados de crecimiento de Aerobios mesófilos de Aceite esencial 350 ppm y Testigo.

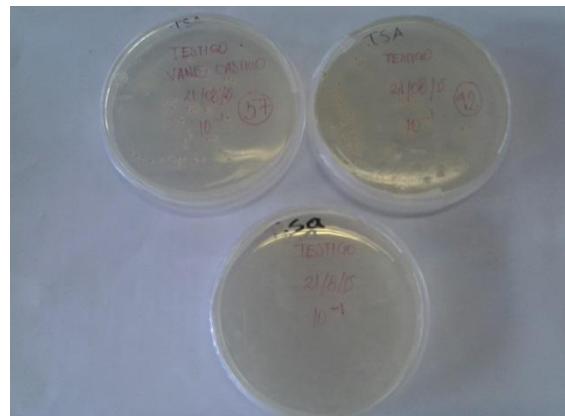
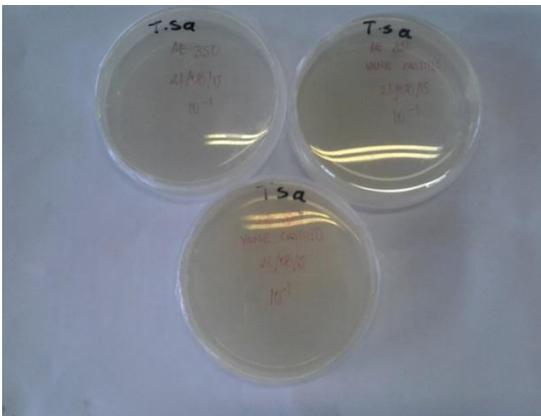
Día 1: Aceite esencial de Romero 350 ppm

Día 1: Testigo

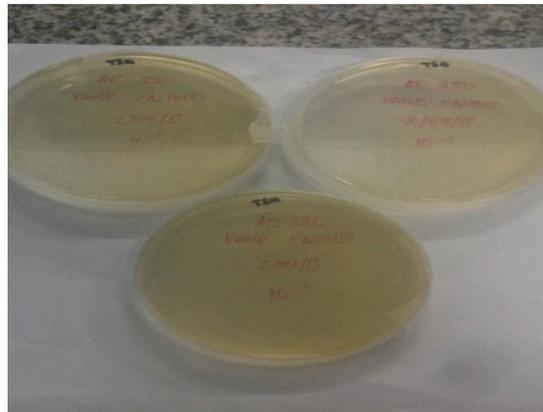


Día 15: Aceite esencial de Romero 350 ppm

Día 15: Testigo

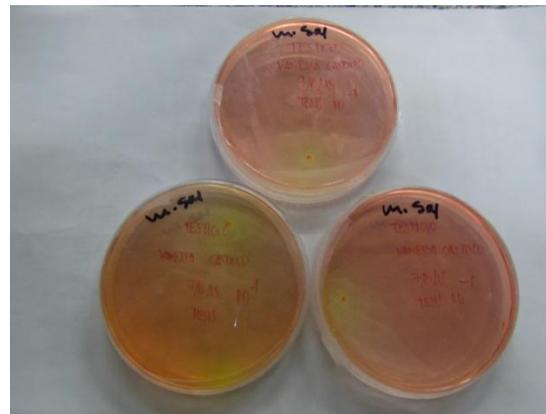
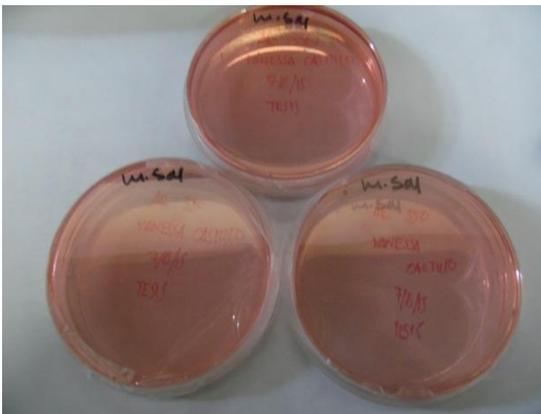


Día 30: Aceite esencial de Romero 350 ppm Día 30: Testigo

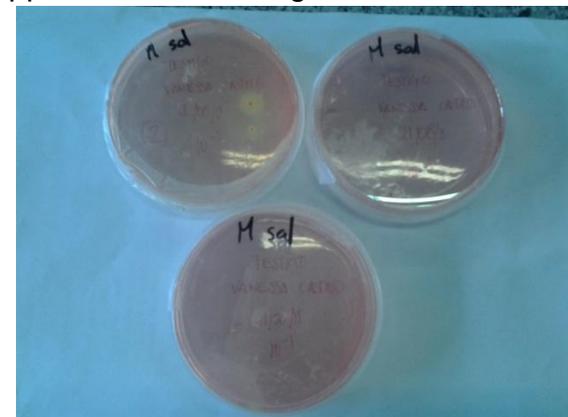
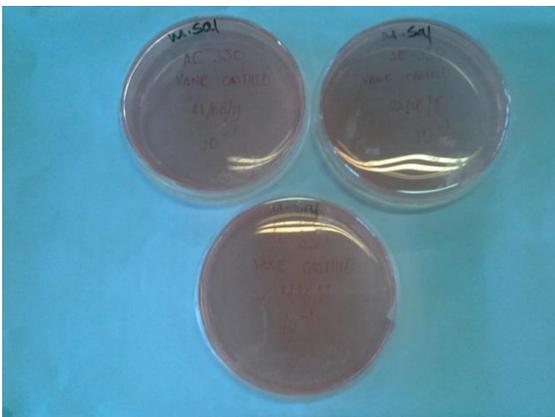


Anexo 9: Resultados de crecimiento de *Staphylococcus aureus* de Aceite esencial 350 ppm y Testigo.

Día 1: Aceite esencial de Romero 350 ppm Día 1: Testigo



Día 15: Aceite esencial de Romero 350 ppm Día 15: Testigo



Día 30: Aceite esencial de Romero 350 ppm Día 30: Testigo

