



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES SOBRE LA
OXIDACIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA EN CARNE DE
BOVINO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ALEJANDRA NAYELI GUILLERMO CHÁVEZ

MEXICO, D.F

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: María de los Ángeles Valdivia López

VOCAL: Profesor: Hermilo Leal Lara

SECRETARIO: Profesor: Luis Medina Torres

1er. SUPLENTE: Profesor: Abraham Itzcoatl Acatzi Silva

2° SUPLENTE: Profesor: Verónica Hernández Briones

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 322-323 Alimentos y Biotecnología

Depto. Alimentos y Biotecnología conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M en C María de los Ángeles Valdivia López

SUSTENTANTE:

Alejandra Nayeli Guillermo Chávez

AGRADECIMIENTO

Gracias al instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) por el apoyo financiero para la realización de este trabajo que forma parte del proyecto “Efecto de las altas presiones isoestáticas sobre la calidad integral de la carne de bovino”, PICS0842. Asimismo gracias por la beca otorgada para la realización de este estudio.



DEDICATORIA

A mi padre Francisco Javier Guillermo Alvarado y a mi madre María Guadalupe Chávez Martínez, por su interminable apoyo en cada momento de mi vida, por sus enseñanzas, su capacidad de entrega, por sus sabios consejos, gracias a ustedes he llegado a esta gran meta. Los amo.

A mis queridos hermanos Javier y Estefanía, por compartir tantos maravillosos momentos, por sus palabras de corazón brindadas en los momentos que más he necesitado, por su apoyo, su entrega incondicional y su gran amistad.

A mis abuelos paternos Pastor y Guillermina, que aunque en el cielo se encuentran, siempre estarán en mi corazón y sé que estarían orgullosos. A mis abuelos maternos Roberto y Elena, por todo su apoyo y cariño brindado.

A mis amigos, por su tan valiosa amistad, por cada plática escuchada y por cada mano extendida en los momentos que necesite.

A mi prima Blanca por cada momento compartido, por su hermandad y su apoyo.

A todo el equipo del laboratorio 322-323. Julieta, gracias.

INDICE

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS	4
1. ANTECEDENTES	5
1.1. Generalidades de la carne	5
1.1.1. Definición de carne	5
1.1.2. Importancia de la carne	5
1.1.3. Composición y estructura del músculo	5
1.1.4. Estructura del músculo esquelético	8
1.2. Conservación de la carne	11
1.3. Congelación	11
1.4. Altas Presiones Hidrostáticas	12
1.4.1. Antecedentes de las APH	13
1.4.2. Sistemas de presurización	14
1.4.3. Fundamento de las APH	14
1.4.4. Equipo de tratamiento por APH	15
1.4.5. Efecto de la alta presión sobre los constituyentes de los alimentos	17
1.4.6. Efecto de la APH sobre los microorganismos	20
1.5. Deterioro químico de los lípidos	21
1.5.1 Lipólisis	21
1.5.2 Oxidación de los lípidos	21
1.5.2.1 Mecanismo general de la autooxidación	22
1.5.2.2. Papel del oxígeno en el proceso oxidativo	24
1.5.2.3. Descomposición de hidroperóxidos	25
1.5.2.4. Descomposición de aldehídos formados	26

1.5.2.5. Variables que afectan la velocidad de la oxidación lipídica	26
1.6. Desnaturalización de proteínas	31
2. DIAGRAMA DEL ESTUDIO	33
2.1. Primera parte. Selección de condiciones	33
2.2. Segunda parte. Monitoreo bajo condiciones tiempo- presión seleccionadas	34
3. METODOLOGÍAS	35
3.1. Extracción de lípidos por el método de Bligh & Dyer	35
3.2. Índice de peróxidos. Método volumétrico	35
3.3. Índice de peróxidos. Método colorimétrico	36
3.4. Índice de Kreis	36
3.5. Acidez titulable	37
3.6. Obtención del concentrado de proteínas	38
3.7. Determinación de la proteína soluble. Lowry	37
3.8. Electroforesis en gel de Acrilamida	38
3.9. Cuenta indirecta de Microorganismos. Prueba de Tetrazolio	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1. Selección y preparación de muestra	42
4.1.1 Elección de la presión hidrostática y tiempo empleados	43
4.2, Extracción de grasa	45
4.3. Evaluación del efecto de las APH en la rancidez oxidativa	47
4.3.1. Determinación de peróxidos	47
4.3.2. Determinación de Índice de Kreis	49
4.4. Evaluación del efecto de las altas presiones hidrostáticas en la liberación de ácidos grasos.....	51
4.5. Evaluación del efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre las proteínas..	52
4.5.1. Determinación de la proteína soluble	52
4.5.2. Pesos moleculares de las proteínas	54

4.6. Evaluación del efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la carga microbiana presente en la carne	59
--	----

CONCLUSIONES	61
---------------------------	-----------

SUGERENCIAS	63
--------------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA	64
---------------------------	-----------

ANEXO

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del músculo esquelético	9
Figura 2. Equipo de altas presiones hidrostáticas a nivel industrial	16
Figura 3. Esquema general de la Autooxidación de los lípidos	22
Figura 4. Formación de compuestos no radicales estables	24
Figura 5. Esquema de la descomposición de hidroperóxidos	25
Figura 6. Muestra presurizada a 70Kpsi por 1 minuto	43
Figura 7. Muestra presurizada a 43Kpsi por 5 minuto	44
Figura 8. Aplicación de presión de forma uniforme en la utilización de las APH	45
Figura 9. Gel electroforético de Acrilamida. Tiempo inicial	56
Figura 10. Gel electroforético de Acrilamida. Tiempo final	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del tejido muscular magro	6
Tabla 2. Contenido de ácidos grasos en carne de res.....	7
Tabla 3. Concentración de Hierro en diversas especies	39
Tabla 4. Gel separador y concentrador para electroforesis	39
Tabla 5. Relación de pesos moleculares de los marcadores empleados	40
Tabla 6. Porcentaje de grasa para cada lote de muestra	46
Tabla 7. Resultados de la formación de compuestos carbonílicos en las muestras almacenadas a -18°C. Índice de Kreis	50
Tabla 8. Pesos moleculares de las muestras en el tiempo inicial. Electroforesis en gel de Acrilamida	55
Tabla 9. Pesos moleculares de las proteínas de carne. Tiempo final	57

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Evolución de los índices de formación de peróxidos. Método colorimétrico	48
Gráfica 2. Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la liberación de los ácidos grasos	51
Gráfica 3. Monitoreo de la proteína soluble. Lowry	53
Gráfica 4. Evaluación del crecimiento de los microorganismos durante el almacenamiento a -18 °C	60

RESUMEN

La tecnología más empleada para la conservación de la carne es la congelación, la cual permite alargar la vida de anaquel, sin embargo, genera pérdida de nutrientes y/o cambios en las características sensoriales y fisicoquímicas. Existen nuevas tecnologías que permiten conservar los alimentos por tiempos prolongados sin causar daño significativo, tal es el caso de las Altas Presiones Hidrostáticas.

Se realizó un primer estudio, en donde se determinaron los parámetros de tiempo-presión que serían aplicados en el estudio general. En este ensayo se eligieron ciertas condiciones y se evaluó su efecto sobre la proteína soluble, formación de aglomerados o subunidades de proteínas, carga microbiana y color de la carne. Se determinó que no se manejarían presiones por arriba de los 70kpsi, debido a que a esa presión el color de la carne era desagradable para el consumidor.

El segundo estudio se llevó a cabo con el objetivo de conocer el impacto de las altas presiones sobre la oxidación de lípidos de carne, el impacto en las proteínas solubles y en la disminución de la cuenta de microorganismos. La muestra consistió en carne de Bovino corte Sirloin, homogeneizada y empacada en bolsas de polivinilo a vacío. Se manejaron diferentes tratamientos de presión-tiempo, sin exceder los 70kpsi. Las muestras se almacenaron durante 19 semanas en condiciones de congelación (-18°C). De igual forma se dejó muestra sin presurizar de cada tratamiento, solo empacada a vacío y almacenada bajo congelación, sirviendo éstas como su respectivo control.

Durante las 19 semanas que duró el almacenamiento de las muestras bajo congelación, no se encontró deterioro oxidativo, tanto para las muestras presurizadas como para sus controles. La etapa oxidativa que prevaleció durante este tiempo de estudio fue la etapa de INICIACIÓN.

Para evaluar la liberación de los ácidos grasos por el efecto de la alta presurización, se determinó la acidez titulable, permitiendo de esta forma relacionar la acidez presente en la carne con los ácidos grasos libres, y por ende el efecto de las Altas Presiones Hidrostáticas (APH) sobre las lipasas. Se determinó un comportamiento similar entre muestras congeladas y las muestras presurizadas, donde la presurización no muestra un efecto notable en la liberación de los ácidos grasos.

Se evaluó el efecto de las altas presiones en la desnaturalización de las proteínas, observándose que el decremento de la proteína soluble es similar entre muestras congeladas y muestras presurizadas. De igual forma se evaluó mediante electroforesis, los pesos moleculares a tiempo inicial y tiempo final de las muestras presurizadas y sus controles. El efecto de la alta presión y tiempos seleccionados, no generan un gran impacto sobre la formación de agregados proteínicos de la carne de Bovino, en comparación con el efecto que genera insitu el proceso de congelación.

La carga microbiana sufre una inactivación bajo los tratamientos de alta presión aplicados. El gran impacto de las APH sobre la disminución de la carga microbiana fue notable desde que se llevó a cabo el tratamiento de presurización, así como durante el almacenamiento, observándose que en las muestras presurizadas había menor crecimiento de microorganismos en comparación con las muestras congeladas. Con los resultados obtenidos se determinó que las altas presiones tienen una gran ventaja en la inactivación de los microorganismos presentes en la matriz cárnica, brindando un mayor valor agregado en comparación con el tradicional método de congelación.

Un estudio bajo las mismas condiciones de trabajo empleadas, pero con un mayor tiempo de almacenamiento, permitiría esclarecer si la alta presión a tiempos largos de almacenamiento genera una vida de anaquel más prolongada, sobre la carne, en comparación con el tratamiento de congelación.

INTRODUCCIÓN

La carne es un alimento con alto contenido de humedad, que la hace muy susceptible al deterioro químico y biológico. Dentro de los componentes de la carne se encuentran el agua, los lípidos, las proteínas y los carbohidratos, éstos últimos en cantidades muy bajas, minerales y vitaminas.

Los lípidos juegan un papel muy importante en la calidad de la carne como en la mayoría de los alimentos, debido a que la oxidación de éstos es la principal causa de deterioro de la calidad, perjudicando el sabor y su valor nutricional.

La congelación es una tecnología ampliamente utilizada para la conservación de alimentos, en especial para la carne, basándose en la disminución del A_w , así como la velocidad de las reacciones químicas y biológicas desfavorables, retardando de esta manera su descomposición, prolongando la vida de aquel. De igual forma tiene sus desventajas, como es el deterioro en las características sensoriales (tal es el caso del aumento en la dureza de la carne), ocasionando un posible rechazo por parte del consumidor.

Como consecuencia del aumento de la demanda de productos “idénticos a los frescos” con garantías sanitarias, la industria y la ciencia de los alimentos se encuentran trabajando en el desarrollo de nuevas tecnologías de procesado y conservación. Como resultado va en aumento la sustitución de los tratamientos tradicionales por nuevas técnicas de conservación. Dentro de estas tecnologías emergentes destacan los pulsos eléctricos o magnéticos, la alta presión hidrostática, los ultrasonidos, la irradiación y los destellos de luz blanca.

De las tecnologías emergentes las altas presiones hidrostáticas se caracterizan por su utilidad en la conservación de alimentos por tiempos prolongados. Dentro de los efectos que genera las altas presiones hidrostáticas en los alimentos son la inactivación de microorganismos, efecto sobre la cinética

de las reacciones enzimáticas; inactivación de las enzimas que tienen que ver con el deterioro del alimento, así como alteraciones en reacciones importantes de alimentos, tal es el caso de las reacciones de Maillard y la autooxidación de los lípidos. Además la estructura y funcionamiento de biopolímeros como proteínas, lípidos, almidón y otros polisacáridos, son susceptibles a sufrir daño debido a la presión.

Por lo que con este estudio se podrá evaluar el efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la oxidación de la fracción de los lípidos, la integridad de las proteínas de la carne y la reducción de la carga microbiana. Los resultados permitirán conocer la utilidad de las altas presiones sobre la conservación de la carne de Bovino.

HIPÓTESIS

1. El aumento de la presión producirá un incremento en la oxidación de los lípidos.
2. Las proteínas de la matriz cárnica, presentarán modificaciones debido a la presión hidrostática ejercida.
3. Mediante la alta presión se reducirá la carga microbiana existente en la carne, siendo esta directamente proporcional a la magnitud de presión empleada.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Al finalizar el estudio se podrá conocer el efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la oxidación de la fracción lipídica y la integridad de las proteínas de la carne de Bovino, determinando su utilidad en la preservación de ésta matriz alimenticia.

Objetivos particulares

- Conocer la evolución del proceso oxidativo de los lípidos en muestras de carne de Bovino empacadas a vacío, sometidas a altas presiones hidrostáticas, almacenadas en congelación a -18°C.
- Conocer la evolución de la solubilidad de las proteínas, en muestras de carne de Bovino empacadas a vacío, sometidas a altas presiones hidrostáticas, almacenadas en congelación a -18°C.
- Conocer el impacto de ésta tecnología sobre los microorganismos presentes en la carne.

1 ANTECEDENTES

1.1 Generalidades de la carne

1.1.1 Definición de carne

Se define como carne a la estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo como, además de nervios, vasos linfáticos y sanguíneos, de los animales aptos para consumo humano, que no ha sido sometida a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas.³

Después de la muerte del animal, la fibra muscular, sufre cambios físicos y bioquímicos. La transformación del músculo a carne involucra una serie de importantes modificaciones fisicoquímicas en el tejido muscular, las cuales dan lugar a un producto que estará en condiciones de ser consumido por el hombre.²

1.1.2 Importancia de la carne

La importancia de la carne en la alimentación humana no sólo radica en su alto valor nutritivo, sino además en sus características sensoriales agradables: la textura y dureza , jugosidad y color. Sin embargo y debido a que es un producto perecedero, fue necesario desarrollar diversas prácticas que permitieran mantener su calidad óptima desde los centros de producción hasta su llegada a manos del consumidor.

1.1.3 Composición y estructura de del músculo

Los componentes mayoritarios en la carne son, agua, proteínas y lípidos, la proporción de cada uno de ellos está en función de la actividad desarrollada por el músculo del cual provenga, así también en menor proporción se encuentran los

carbohidratos (glucógeno) y los minerales (hierro, zinc, magnesio, potasio y sodio).¹

Tabla 1. Composición del tejido muscular magro. ⁴

Composición (g /100g de producto fresco)				
Especie	Agua	Proteínas	Lípidos	Cenizas
Res	70-73	20-22	4.8	1
Cerdo	68-70	19-20	9-11	1.4
Pollo	73.7	20-23	4.7	1
Cordero	73	20	5-6	1.60
Bacalao	81.2	17.6	0.3	1.2
Salmón	64	20-22	13-15	1.3

El contenido de agua representa entre el 68 a 80% del peso de la carne; encontrándose en mayor proporción formando parte del interior de las células (miofibrillas) como principal constituyente del sarcoplasma.

La composición de la carne varía notablemente entre las diferentes especies y cortes existentes, siendo la primordial fuente de variación el contenido de lípidos que depende entre otros factores del consumo y tipo de alimento ingerido por el animal, llegando a representar entre 0.5% a 20% del peso de éste, cantidad aportada por la grasa localizada alrededor del músculo y la que se encuentra en el interior.

La fracción grasa de la carne se encuentra conformada por triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y algunas vitaminas liposolubles. La composición lipídica se clasifica según su localización, esto es, en el tejido muscular o en el tejido adiposo. En el tejido muscular, la grasa se puede encontrar fuera de los haces musculares primarios de manera subcutánea, o asociada a estructuras celulares como pared celular y mitocondrias. En el tejido adiposo, la fracción grasa se

encuentra en forma de gotitas muy finas, distribuidas en la fibra muscular, responsable del marmoleo.

En la carne de res, los lípidos de la porción magra o muscular asociada a estructuras celular, constituyen entre el 2-4% del total de los lípidos, sin embargo, y a pesar de ser una fracción pequeña, son de gran trascendencia en el proceso oxidativo debido a su alto contenido de ácidos grasos insaturados. En comparación con los lípidos del tejido adiposo, la fracción magra contiene proporciones mayores de fosfolípidos, siendo sus ácidos grasos más insaturados que los triacilglicéridos del tejido adiposo.

Cabe hacer notar en el caso de la carne de res magra, que los ácidos grasos que presentan 2 ó 3 insaturaciones (de un total de 31.1%), el 25.2% de ellos se encuentra en fosfolípidos, mientras que los triglicéridos solo los contienen en un 6.1%; comportamiento similar se presenta con los ácidos grasos con 4 o más insaturaciones ya que de los 19.3% presentes, los fosfolípidos los contienen en un 19.2%, y los triglicéridos solo en 0.1%⁵

Tabla 2. Contenido de ácidos grasos en carne de res ⁵

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

En el tejido adiposo, los triglicéridos junto con los ácidos grasos libres son los lípidos más abundantes del tejido adiposo. En lo que se refiere a su composición, se sabe que la grasa animal posee en general un alto contenido de ácidos grasos C16 y C18, cantidades intermedias de ácidos insaturados (principalmente oleico y linoleico) y pequeñas cantidades de ácidos grasos de cadena impar. ⁴

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

1.1.4 Estructura del músculo esquelético

El músculo más importante desde el punto de vista alimentario, es el músculo estriado esquelético. Es un órgano compuesto principalmente de células musculares estriadas y tejido conjuntivo.

Las células del músculo esquelético son cilíndricas muy alargadas, presentan varios núcleos que se sitúan en la periferia y que tienen una membrana celular que se denomina sarcolema, tienen estructuras estriadas que se denominan miofibrillas, debido a éstas, el tejido muscular esquelético es estriado.

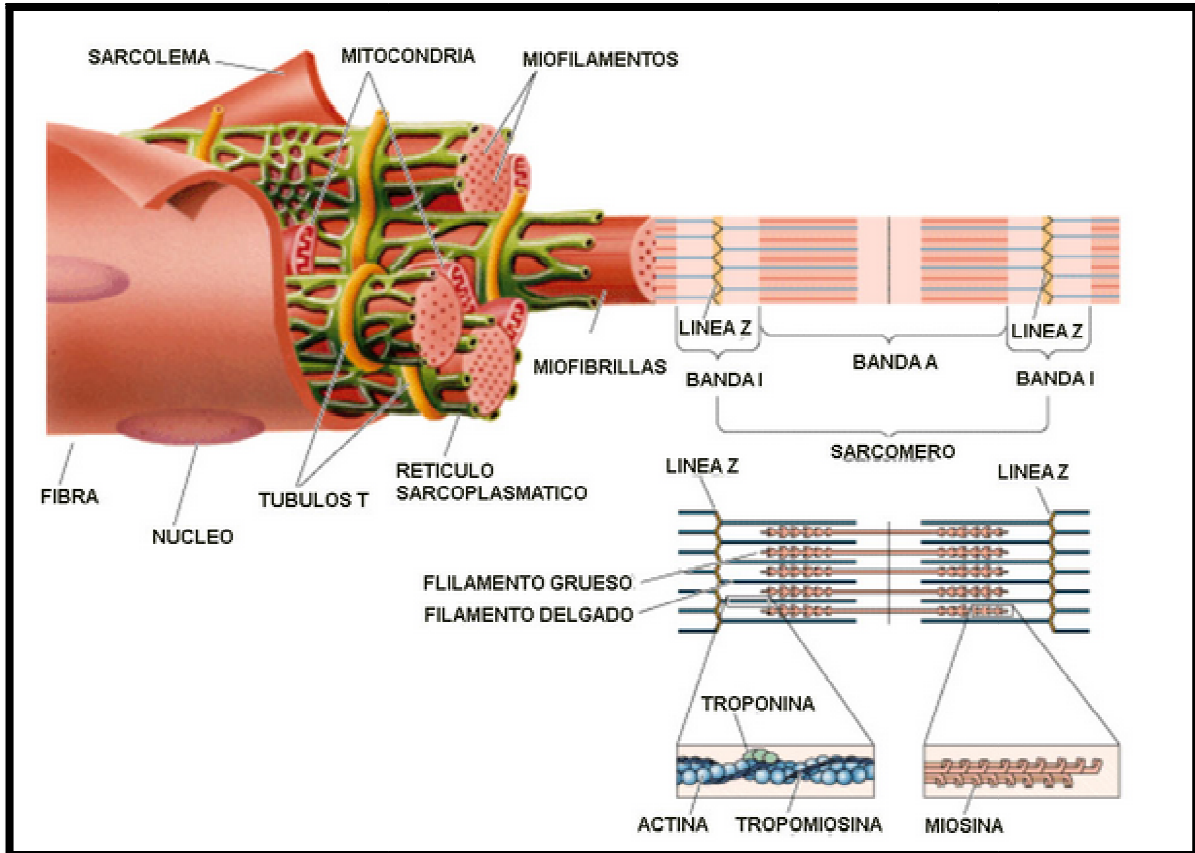


Figura 1. Estructura del músculo esquelético.⁵⁹

Como se observa en la figura 1, las estriaciones de las miofibrillas se deben a dos tipos de filamentos: gruesos y delgados. Las bandas oscuras (bandas A) son las predominantes en los filamentos gruesos. Las bandas H sólo tienen filamentos gruesos y su tamaño dependerá de la contracción del músculo. La zona de intersección de los filamentos delgados es la línea Z. La línea M es la zona central de los filamentos gruesos. La unidad estructural de una miofibrilla es la que va de una línea Z otra y se denomina sarcómero.^{3,6}

El músculo está conformado por dos tipos de proteínas: proteínas miofibrilares o contráctiles y las sarcoplásmicas. Las proteínas contráctiles clásicamente se han considerado solamente solubles en disoluciones salinas de alta fuerza iónica y no en agua. Sin embargo, algunas proteínas contráctiles se

pueden extraer con agua, pero las condiciones requeridas para la extracción dependera de la especie. Por otro lado las proteínas sarcoplásmicas son solubles en agua, en sales o simplemente insolubles³.

Las proteínas contráctiles participan en el proceso físico de la contracción muscular, encontrándose dentro del sarcómero. La más importantes van a ser la actina (principal componente de los filamentos delgados) y la miosina (principal componente de los filamentos gruesos).

- Miosina: Corresponde al 50% aproximadamente de las proteínas miofibrilares, la cual está compuesta por dos cadenas pesadas y cuatro ligeras. Las dos cadenas pesadas forman la cola y tienen una estructura fibrilar. Las cadenas ligeras forman la cabeza y tienen una estructura globular. El punto isoeléctrico de la miosina es 5.3.
- Actina: Es la parte fundamental de los filamentos delgados. Se encuentra en un 25% dentro de las proteínas fibrilares. Esta integrada por filamentos que se denominan F-actina, los cuales se forman por los monómeros de G-actina. El punto isoeléctrico es de 4.7.
- Tropomiosina: Corresponde entre 8 a 12% de las proteínas miofibrilares. Tienen estructura fibrilar y forma parte del filamento delgado sobre la actina y de vez en cuando uniéndose a ella.
- Troponina: Está presente en un bajo porcentaje, es globular y se encuentra en los filamentos delgados a la altura de la unión de la tropomiosina con la actina. Está implicada en procesos de regulación de la contracción muscular.⁷

Las proteínas sarcoplásmicas corresponden alrededor del 30 a 35% del total de las proteínas del músculo, encontrándose en el sarcoplasma. La más importante de éstas es la mioglobina, constituida por una parte proteica (globina) y una parte no proteica (grupo hemo). La hemoglobina es un tetrámero de la molécula de mioglobina.

1.2 Conservación de la carne

Los métodos para la preservación de la carne fresca, buscan manipular las condiciones ambientales, logrando controlar el desarrollo microbiano, posibles pérdidas de peso, modificaciones de apariencia, sabor o textura.

Los procedimientos utilizados comunmente para prevenir los cambios en la carne causados por microorganismos o reacciones físicas y químicas son: eliminación o inmovilización de agua, eliminación de componentes activos, como oxígeno o glucosa, utilización de aditivos químicos, disminución de temperatura, aplicación de energía y envasado.

La creciente demanda de productos alimenticios con las características propias de los alimentos “frescos”, sin perder las garantías sanitarias y una conservación prolongada, ha conducido a la introducción de nuevas tecnologías en el ámbito de la conservación de alimentos. Hay que tener en cuenta que hoy en día no sólo tiene importancia la duración de la vida útil de un producto, sino también el que todos los alimentos almacenados mantengan íntegra su calidad nutricional y sensorial.

1.3 Congelación

Actualmetne, la congelación se considera el método de preservación de los alimentos más práctico y efectivo. La preservación por medio de la congelación se consigue por medio de dos factores: la aplicación de temperaturas a las cuales la proliferación de microorganismos y la actividad de enzimas no son posibles, y la deshidratación del alimentos por medio de la formación de cristales.

La congelación llevada a cabo por periodos muy prolongados o en condiciones no óptimas puede generar ciertos defectos en la calidad de la carne, como la modificación del color, cambios en su olor, sabor y textura y un proceso de deshidratación. Las razones principales de estas modificaciones son las siguientes:

- Formación de cristales de hielo intramusculares e incluso intracelulares, que conllevan a la ruptura de estructuras y a generar un daño mecánico. Esto está relacionado con una velocidad de congelación ya sea muy lenta o muy rápida y provoca la pérdida de la capacidad de retención de agua y el exudado durante la descongelación.
- Desnaturalización de proteínas, principalmente miofibrilares, que genera cambios en la textura.
- Sublimación del agua, causante de la deshidratación de la superficie.
- Oxidación lipídica, responsable principal de los cambios en aroma y sabor de la carne.

La intensidad que puedan traer estos factores dependen de la velocidad y eficiencia de la congelación, así como condiciones y tiempo de almacenamiento. De igual forma el material de empaque influye en la calidad del proceso de congelación.

Es muy importante mencionar que a pesar de ser la congelación un método muy efectivo de conservación, no logra inhibir la oxidación lipídica, incluso se ve favorecida debido a la baja actividad acuosa.¹³

1.4 Altas Presiones Hidrostáticas

La demanda de los consumidores por la seguridad, disminución del procesado y alimentos libres de aditivos, ha propiciado nuevas investigaciones sobre el uso de las altas presiones hidrostáticas en el procesado de alimentos.

Reportes de varios grupos de científicos alrededor del mundo, han sugerido un rango de 100MPa-1000MPa para probar los efectos de las altas presiones en alimentos^{17,33}. Las áreas en donde se pretende tener un impacto son: la muertes de los microorganismos, control de la actividad enzimática, alteración de la conformación de biopolímeros para cambiar su funcionalidad y los cambios de fases.

1.4.1 Antecedentes de las APH

La primera aplicación de las altas presiones en un alimento se llevó a cabo en la leche, donde se intentó esterilizar este alimento mediante presurización, siendo el primer trabajo que demostró la reducción de la población microbiana mediante la aplicación de altas presiones³⁸.

Existen investigaciones que se enfocaron en analizar las propiedades de los materiales una vez sometidos a altas presiones, así como en desarrollar procedimientos de aplicación de altas presiones y en diseñar nuevos equipos de generación de Alta presión^{44,45,46}. De igual forma se realizaron trabajos en donde se enfocaron al diseño de las vasijas o cámaras donde se presurizan las muestras^{47,48}.

No es hasta la década de los 80 cuando realmente se empieza a investigar de forma exhaustiva las relaciones entre APH y alimentos. Se realizó una recopilación de algunos trabajos realizados hasta entonces en la conservación de leche, carne y zumos de frutas³⁹. En 1914 se realizó un estudio sobre el efecto de la alta presión sobre la clara de huevo, observándose que la desnaturalización proteica de la clara del huevo se produce de forma irreversible a partir de 300MPa y se intensifica con el aumento de la presión y el tiempo de tratamiento⁴³.

En la década de los ochenta Japón fue el pionero en el desarrollo de la alta presión para su utilización en la industria de alimentos, lo que trajo el lanzamiento al mercado de los primeros alimentos presurizados, tratándose de alimentos tipo ácido, como zumos y derivados de frutas. El primer tipo de productos alimenticios presurizados fueron mermeladas de diferentes frutas, las cuales fueron lanzadas al mercado por la compañía japonesa Meidi-Ya Food Co., saliendo a la venta en abril de 1990. Hoy en día se comercializan muchos más productos en Japón y en menor medida en USA y en Europa²³.

1.4.2 Sistemas de presurización

Según varios autores se conocen 3 procesos básicos donde se usan altas presiones con o sin variación de temperatura. En los sistemas de presión isostática en frío (PIF), en donde las presiones aplicadas oscilan entre 50-600MPa, se operan a temperatura ambiente y el tiempo de tratamiento oscila entre 1 y 30 minutos. Esta técnica se empleó inicialmente en la industria de metales, cerámicas, carbón grafito y plástico. Hoy en día promete ser la de mayor aplicación en la industria de alimentos.³²

1.4.3 Fundamentos de las APH

La utilización de altas presiones hidrostáticas se rige fundamentalmente por dos principios:

- a) La ley de Pascal (anexo). Según esta ley una presión externa aplicada a un fluido confinado se transmite de forma uniforme e instantánea a través de todo el material biológico (en todas las direcciones) tratado por la alta presión, hablando entonces de un proceso isostático.³⁰ Gracias a que el proceso es isostático, se evita la presencia de zonas sobretratadas, así como da deformación del producto, y hace que éste sea más homogéneo.
- b) Principio de Le Chatelier. Enuncia que cualquier fenómeno (reacción química, cambios moleculares, etc.), que va acompañado de disminución de volumen sufre una estabilización al aumentar la presión, y viceversa. El comportamiento de las proteínas bajo altas presiones es regido por el principio de Le Chatelier, por lo que se buscará un equilibrio, en donde el estado que ocupe un menor volumen se verá favorecido por la aplicación de la alta presión. Interacciones moleculares no covalentes se verán desfavorecidas por la presión: la solvatación de grupos cargados, la formación de interacciones electrostáticas, así como es el caso de las interacciones hidrofóbicas, presentan un incremento de volumen, viendose

desfavorables con la aplicación de presión. Los enlaces de puente de hidrógeno y las interacciones entre anillos aromáticos, son favorecidas por las altas presiones debido a que estas dos presentan cambios de volumen negativo⁴⁹. Se ha observado que los enlaces covalentes tienen baja compresibilidad y no se ven afectados por presiones inferiores a 1000-2000MPa. De esta manera la estructura de las biomoléculas de bajo peso molecular (hidratos de carbono, péptidos y lípidos) y la estructura primaria de las moléculas no se ven modificadas. Es conocido también que diferentes reacciones de Maillard (por ejemplo xilosa-lisina) son reducidas o inhibidas bajo presión.

La sensibilidad de los microorganismos a la aplicación de alta presión hidrostática (barosensibilidad) depende de múltiples factores, siendo objeto de múltiples investigaciones. En cuanto a los efectos en los componentes y características de los alimentos, en las condiciones habituales de procesado, no se afectan enlaces covalentes y puede decirse que no se alteran los aromas ni el valor nutritivo de los alimentos. Sin embargo, si que se pueden producir cambios de color, apariencia, y modificaciones en los atributos de textura, aunque los efectos varían de unos alimentos a otros.³⁰

1.4.4 Equipo de tratamiento por APH

El tratamiento de la alta presión se puede llevar a cabo en dos tipos de equipos en función del producto a tratar, normalmente se utiliza el tipo discontinuo para productos líquidos o sólidos ya envasados, y el tipo semicontinuo para líquidos no envasados.

Los equipos discontinuos consisten en un cilindro de acero inoxidable con una pared gruesa y resistencia que contiene en su interior el líquido de compresión (agua o una mezcla de agua y aceite). Este líquido es impulsado desde un depósito de agua hasta el recipiente de tratamiento.

El alimento se coloca en un recipiente de plástico estéril, se sella y se introduce en la cámara de presurización. Se recomienda que el material de plástico sea una película de alcohol de polivinilo (PVOH) y películas copoliméricas de alcohol de etileno y vinilo (EVOH). Una vez empacado es introducido dentro del cilindro, un par de bombas inyectan agua dentro del cilindro hasta alcanzar la presión adecuada, manteniendo la presión durante el tiempo seleccionado, para finalmente realizar la descompresión^{54,23,29}.



Figura 2. Equipo de altas Presiones Hidrostáticas a nivel industrial.

1.4.5 Efecto de la Alta Presión sobre los constituyentes de los alimentos

- a) **Agua.** La presión modifica muchas propiedades del agua. El volumen del agua disminuye un 4% a 100MPa y un 15% a 600MPa a una temperatura de 22°C.³³ Los alimentos con un contenido alto de humedad y poco gas reaccionan a una compresión similar a la del agua. Esta disminución de volumen implica un aumento de la densidad y, como consecuencia, los coeficientes de difusión de los solutos disminuyen. La compresión adiabática del agua causa un aumento de temperatura de 2 a 3°C por cada 100MPa, aumento que depende de la temperatura inicial del agua y de la velocidad de compresión. Este cambio es reversible cuando se realiza la descompresión ya que se produce una disminución de la temperatura de la misma magnitud.³⁴ El pH del agua también disminuye bajo presión, pasando de 7 a 6.27 cuando la presión aumenta de 0.1MPa a 1000MPa, debido a un aumento en la disociación iónica del agua, en donde el agua se organiza de forma más compacta alrededor de las cargas iónicas.⁵⁷
- b) **Lípidos.** La temperatura de fusión de los lípidos, en especial de los triacilglicéridos, presenta un aumento con la presión de manera reversible en más de 10°C por cada 100MPa, es por eso que los lípidos en estado líquido a temperatura ambiente pueden cristalizar bajo presión. Esto puede explicar algunas de las causas de destrucción de los microorganismos por la presión debida a los cambios cristalinos en los fosfolípidos de la membrana celular. El aumento de la presión puede producir un aumento de la oxidación de los lípidos insaturados del alimento. Se ha observado que el tratamiento de alta presión en alimentos de alto contenido proteico como la carne y pescado produce un incremento de la oxidación lipídica. Se cree que este aumento de oxidación está relacionado con la desnaturalización de las proteínas causada por la presión, quedando libres iones metálicos que catalizarían la oxidación lipídica.

- c) **Hidratos de carbono.** A pesar de los pocos trabajos que existen sobre el efecto de la alta presión sobre los hidratos de carbono, los autores coinciden en afirmar que los azúcares simples no resultan afectados por ese tratamiento.³³ Las reacciones de condensación de Maillard son inhibidas por la aplicación de la alta presión entre 50 y 200MPa.³⁶ En consecuencia del desarrollo del sabor y del color típico de esta reacción no se producen. La alta presión afecta la transición sol-gel de los polisacáridos formándose geles diferentes a los obtenidos por aplicación de calor.³⁷
- d) **Proteínas.** Se han realizado numerosos estudios sobre el efecto de la presión sobre la estructura y funcionamiento de las proteínas, en donde de forma general se concluye que las modificaciones de las proteínas se deben a cambios en las interacciones intra e intermolecular entre grupos funcionales de los aminoácidos. Existe un aumento de las interacciones hidrofóbicas a presiones de 300 y 400MPa, debido a la alta compresibilidad del agua libre. Por otra parte, los grupos sulfhidrilo pueden oxidarse dando lugar a puentes disulfuro en presencia de oxígeno. En general, la aplicación de presiones superiores a 100-200MPa a temperatura ambiente, provoca la disociación de macroestructuras en subunidades, así como el despliegue y desnaturalización de estructuras monoméricas, probablemente debido al debilitamiento de las interacciones o separación de los puentes salinos inter o intramolecular, según sea el caso⁵³. Un estudio elaborado sobre el efecto del uso de presión en un rango de 100-300 MPa por 5 minutos sobre carne de bovino, con un tiempo de sacrificio del animal de 4 días, demostró que el efecto de la suavización de la carne y el incremento de sabor fueron favorecidos bajo éstas condiciones. En las muestras sometidas a alta presión, se observó que la interacción actiomiosina sufrió cambios, al igual que se produjo una fragmentación de la miofibrilla, permaneciendo en condiciones normales la línea Z. Con respecto al colágeno que conforma al tejido conectivo, éste no sufrió cambios significativos. Hubó un incremento

de la cantidad de aminoácidos y péptidos, los cuales contribuyen al sabor de la carne⁴⁰.

e) **Enzimas.** Las altas presiones modifican la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, lo cual significa que las enzimas son alteradas por la APH. Esta alteración es debida a la modificación de las estructuras intermoleculares y cambios conformacionales en el sitio activo de la enzima. Se ha observado que algunas enzimas se inactivan con las altas presiones, mientras que otras se activan. Por ejemplo, las deshidrogenasas de *E. coli* se inactivan completamente cuando se someten a presiones de 100MPa durante 15min a 27°C, mientras que la actividad de la aspartasa de esta bacteria se incrementó cuando la presión se elevó a 680MPa. De igual forma se encontró que las lipasas encontradas en muestras de sardina, perdieron su actividad catalítica debido al tratamiento de presión. Por otra parte la alta presión podría afectar a nivel de la interacción sustrato-enzima, en donde si el sustrato es una macromolécula, la alta presión podrían modificar la conformación de la macromolécula o su disociación en subunidades afectando su actividad, haciendo más fácil o difícil el ataque de la enzima²³.

f) **Vitaminas.** El efecto de las altas presiones sobre la estabilidad de las vitaminas ha sido uno de los estudios que más interés ha suscitado entre los diferentes autores que evalúan este proceso en comparación con los tratamientos térmicos⁵⁰. Según diversos autores, el proceso tecnológico de las altas presiones hidrotáticas es el menos dañino para las vitaminas hidrosolubles, lo que contribuye a conservar la calidad nutricional del alimento^{52,51}.

1.4.6 Efecto de la APH sobre los microorganismos

Las altas presiones inducen cambios de tipo morfológico, bioquímico y genético, que tienen lugar en la membrana y en la parte celular de los microorganismos. Además, provocan cambios en el funcionamiento y la reproducción de los microorganismos.³³ Está bien establecido que la aplicación de las altas presiones tienen como resultado la muerte de los microorganismos, y que por tanto pueden ser aplicables en las esterilización o pasteurización de los alimentos. La inactivación de los microorganismos por las APH se explica a que las membranas celulares sufren cambios conformacionales y como resultados una mayor permeabilidad y daño en el material genético de la célula²³. Se han observado varios cambios morfológicos de las células bajo el efecto de la presión como la compresión de las vacuolas de gas, la elongación de la célula, la contracción con formación de poros y la modificación del núcleo. En cuanto al material genético, éste se ve afectado a nivel de las enzimas implicadas en la replicación y transcripción del ADN.³³

Una de las operaciones más difíciles en la conservación de alimentos es la inactivación de las esporas bacterianas. Aunque es posible inactivar las esporas por tratamientos térmicos, no es muy deseable debido a que el calor afecta la calidad del alimento destruyendo nutrientes que son termolábiles. A temperatura ambiente, las esporas de levaduras y mohos se inactivan fácilmente a presiones que oscilan entre 300-400MPa. Para el caso de las esporas bacterianas, éstas tendrán una mayor resistencia, soportando muchas veces presiones de hasta 1000MPa, por lo que para la inactivación de las esporas bacterianas, generalmente se usan combinaciones de presión y temperatura, debido a que la alta presión resulta insuficiente, de esta forma la presión induce la germinación de las esporas, la subsecuente presión y la temperatura actúan sobre la espora germinada reduciendo así la carga bacteriana.

1.5 Deterioro químico de los lípidos

Existen dos mecanismos principales por medio de los cuales se lleva a cabo la descomposición de los lípidos. Estos son la lipólisis y la oxidación, mejor conocida como autooxidación.

1.5.1 Lipólisis

Es la hidrólisis de los enlaces éster de los lípidos, liberando a los ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos y fosfolípidos, lo cual provoca una disminución en el pH. Esta reacción se da ya sea por aumentos de temperatura, como ocurre durante la fritura de los alimentos, o bien por la acción de las enzimas llamadas lipasas.

Durante el almacenamiento en congelación de carne de res, cerdo y aves, el efecto de la lipólisis no es significativo ya que la actividad lipolítica se ve inhibida por las bajas temperaturas empleadas, así como por la baja disponibilidad de agua. Es importante considerar el efecto sobre los triglicéridos y fosfolípidos durante el tiempo previo a la congelación de las muestras, puesto que un aumento de la concentración de ácidos grasos libres hará más susceptible a los lípidos a sufrir rancidez oxidativa.

1.5.2 Oxidación de los lípidos

La oxidación de los lípidos es la principal causa del deterioro de los alimentos. Produce muchas pérdidas económicas en la industria alimentaria, ya que da lugar a la aparición de sabores y olores desagradables, generalmente denominados “a rancio”. Las reacciones oxidativas rebajan la calidad nutrimental y generan algunos productos oxidativos potencialmente tóxicos.

1.5.2.1 Mecanismo general de la autooxidación.

La reacción de compuestos orgánicos con el oxígeno molecular vía mecanismo autocatalítico se le conoce como autooxidación, reacción que sigue un mecanismo de radicales libres, el cual se caracteriza por su alta producción de hidroperóxidos (ROOH), y ser catalizada por metales así como por exposición a la luz. Los cambios oxidativos en los lípidos de los alimentos involucran principalmente reacciones de autooxidación, las cuales son acompañadas por posteriores reacciones no oxidativas.

El mecanismo de la autooxidación, como mecanismo de radicales libres se da en tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

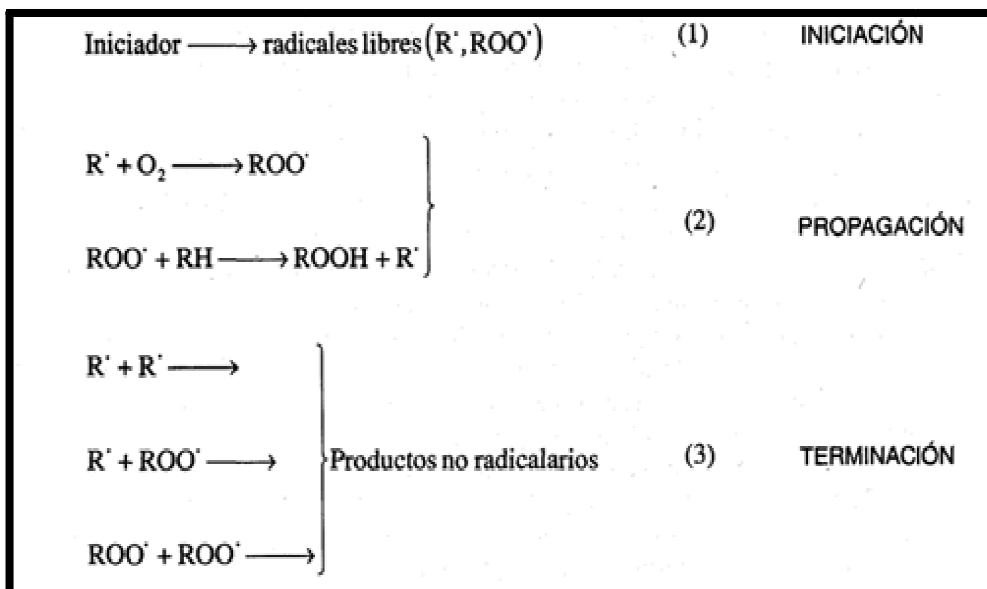


Figura 3 Esquema general de la Autooxidación de los lípidos ⁴

- a) Iniciación. La reacción en cadena es iniciada por la formación de un radical libre a partir de la pérdida de un hidrógeno radical en un ácido graso. Existen distintos medios para generar radicales libres, y dependiendo de cuál de ellos se lleve a cabo, será la estructura del radical que se forme.

La etapa de iniciación puede iniciarse por tres rutas principalmente. La primera es la iniciación por radiación electromagnética, como rayos ultravioleta, luz, rayos gamma, etc., la segunda es la descomposición de un hidroperóxido de bajo peso molecular y la tercera ruta es por medio de un catalizador metálico. Recientemente se ha propuesto que la especie activa para la iniciación de la autooxidación es el oxígeno singulete⁴

- b) Propagación. La reacción de formación de radicales libres continua, y una vez formado un número suficiente de radicales libres, la reacción se propaga por medio de reacciones en cadena que consumen oxígeno produciendo radicales peróxido ($\text{ROO}\cdot$); estos compuestos son inestables, siendo capaces de captar átomos de hidrógeno de otros compuestos presentes en la matriz formándose los hidroperóxidos (ROOH) y nuevos radicales libres ($\text{R}\cdot$); estos a su vez reaccionan con el oxígeno repitiéndose la secuencia de la reacción descrita.

Los átomos de hidrógeno de las posiciones α de los dobles enlaces en los ácidos grasos son los más susceptibles a ser sustraídos por radicales.

Los hidroperóxidos, productos primarios de la autooxidación lipídica, son relativamente inestables y están involucradas en numerosas y complejas reacciones para la formación de radicales alcoxilo y peroxilo, que son los responsables de la producción de los denominados productos de oxidación secundaria tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, etc., de distintos pesos moleculares, capaces de producir aromas, en donde los de bajo peso molecular son los responsables de olor y sabor a rancio.

- c) Terminación. En esta última etapa de la autooxidación, la reacción en cadena es terminada con la reacción entre dos moléculas de radicales libres produciendo dímeros y polímeros estables.

Cuando ha disminuido la cantidad de lípidos insaturados disponibles, aumenta la probabilidad de la reacción entre radicales libres para formar compuestos no radicales estables:



Figura 4. Formación de compuestos no radicales estables.

1.5.2.2 Papel del oxígeno en el proceso oxidativo

Se ha postulado que la especie activa involucrada en la producción de los primeros radicales libres necesarios para desencadenar la etapa de iniciación es el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), actuando como sensibilizadores los pigmentos tisulares, como son la clorofila y la mioglobina. Esta especie tiene los dos electrones de los orbitales 2p con espines opuestos, lo que da una gran repulsión electrostática y reactividad.

No es probable que la iniciación de la oxidación tenga lugar por ataque directo del oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$) sobre los dobles enlaces de los ácidos grasos, ya que los enlaces C=C de los ácidos grasos y los hidroperóxidos, se hallan en estado singulete, por lo que esta reacción no obedecería la ley de la conservación del spín. El oxígeno en estado singulete es más electrófilo que el que está en estado triplete y puede reaccionar rápidamente con zonas de densidad electrónica alta, como es el caso de los enlaces C=C. Una vez formados los hidroperóxidos iniciales, prevalece el mecanismo de reacción en cadena por radicales libres.

1.5.2.3 Descomposición de hidroperóxidos

Los hidroperóxidos se degradan por etapas, dando lugar a numerosos productos de descomposición. Cada uno de los hidroperóxidos origina una serie de productos de degradación inicial, que son característicos y que dependen de la posición del grupo hidroperóxido en la molécula original. Estos productos de degradación pueden experimentar oxidaciones y posteriores descomposiciones, contribuyendo así a la formación de numerosos y variados radicales libres.⁴

La descomposición de los hidroperóxidos se lleva a cabo por medio de un mecanismo de radicales libres:

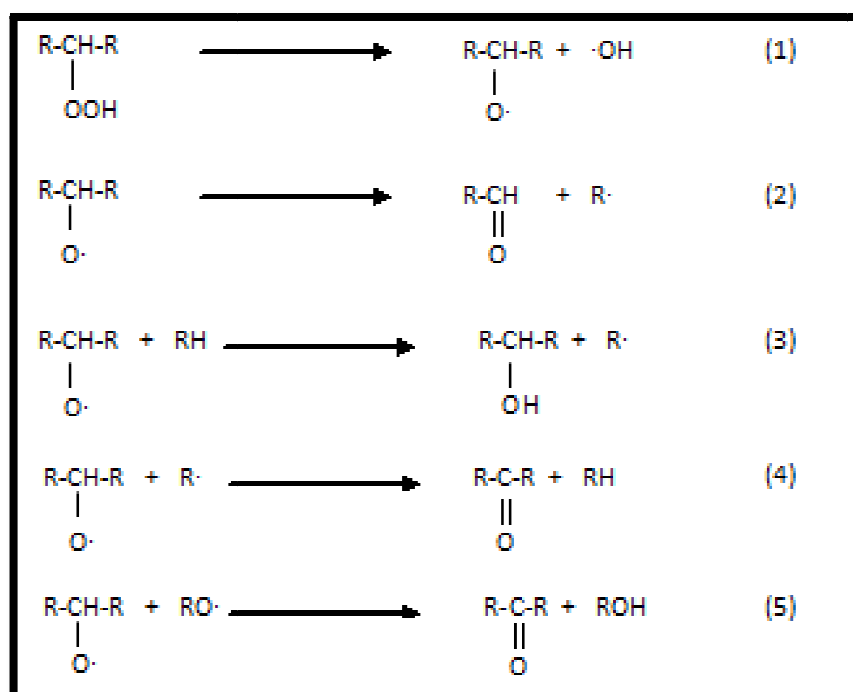


Figura 5. Esquema de la descomposición de hidroperóxidos

En la reacción 1 de la figura 5, se muestra al hidroperóxido, el cual se descompone en dos radicales libres, radical alcoxi e hidroxilo. En las reacciones de la 2 a la 5 se da la combinación del radical libre alcoxi con otras moléculas ya sea

con o sin radicales libres, generando los productos de la descomposición de los hidroperóxidos, ya sean aldehídos, alcoholes o cetonas.¹⁰

Generalmente el radical alcoxilo sufre rupturas posteriores en el enlace carbono-carbono. Cuando la ruptura se lleva en el lado ácido de la molécula, da origen a la formación de un aldehído y un ácido o un éster. La ruptura por el lado hidrocarbonado o metilo, resulta en un hidrocarburo y un oxoácido u oxoéster. Sin embargo, si en tal ruptura aparece un radical vinílico, se forma un grupo aldehído.

1.5.2.4 Descomposición de aldehídos formados

Los aldehídos se encuentran entre los compuestos típicos mayoritarios que se obtienen en la oxidación de las grasas. El origen de muchos de los aldehídos encontrados en las grasas oxidadas no puede ser explicado únicamente a partir de la ruptura de los hidroperóxidos, lo que no es sorprendente si se tiene en cuenta la facilidad y diversidad de reacciones que pueden sufrir los aldehídos.

Los aldehídos saturados pueden ser oxidados fácilmente dando lugar a los ácidos correspondientes, llegando a participar en reacciones de condensación y dimerización. Los aldehídos insaturados pueden llegar a experimentar la autooxidación clásica mediante el ataque del oxígeno en las posiciones α -metilénicas, desencadenando la formación de hidrocarburos de cadena corta, aldehídos y dialdehídos.

1.5.2.5 Variables que afectan la velocidad de la oxidación lipídica

Las principales variables que tienen relevancia en el proceso oxidativo se pueden dividir en dos grupos que hacen referencia, por una parte, a las condiciones externas al sustrato oxidable, entre las cuales destacan la disponibilidad de oxígeno y la temperatura y, por otra, a las características intrínsecas al propio sustrato, como son la composición de los lípidos, ácidos grasos libres, área superficial, actividad del agua y la presencia de componentes

menores de actividad antioxidante o prooxidante, capaces de modificar drásticamente la velocidad de las reacciones oxidativas.^{11,12}

Oxígeno: El oxígeno es el factor limitante en la reacción de autooxidación, en donde la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de oxígeno. Es importante considerar que la presión de oxígeno se ve afectada por algunos factores, como son la temperatura y el área superficial¹¹.

Temperatura: La velocidad de oxidación aumenta con la temperatura. La temperatura influye también en la reacción entre la velocidad y la presión parcial de oxígeno, ya que, a medida que aumenta la temperatura, disminuye la influencia de la presión parcial de oxígeno sobre la velocidad de reacción, porque disminuye la solubilidad parcial del oxígeno en los lípidos y el agua.⁴

Actividad del agua: La actividad del agua es uno de los principales factores que afectan la velocidad de oxidación de los lípidos. Durante el almacenamiento en congelación, el proceso oxidativo se ve favorecido, debido a la disminución de la actividad acuosa, pasando de 0.99 en carne fresca a 0.6 en carne congelada, permite que los componentes moleculares del alimento estén más cerca, aumentando así la posibilidad de interacción entre éstos, así como se favorece el acceso de oxígeno.

Es importante considerar que los metales presentes en la matriz, los cuales actúan como catalizadores de la autooxidación, se encuentran más disponibles en actividades acuosas bajas, ya que su hidratación será mínima y su actividad alta.

Composición de los lípidos: La velocidad de oxidación se ve afectada por el número, la posición y la geometría de los dobles enlaces.

Los lípidos que presentan un mayor grado de insaturación son más susceptibles al deterioro oxidativo. Los ácidos grasos saturados son oxidados lentamente a temperatura ambiente, permaneciendo prácticamente inalterados cuando es perfectamente detectable el enranciamiento de los ácidos grasos

insaturados. A elevadas temperaturas, los ácidos grasos insaturados pueden presentar oxidación con velocidades de reacción considerables.

Los ácidos grasos con interacciones en cis se oxidan más fácilmente que los isómeros trans, así como las dobles ligaduras conjugadas son más reactivas que las no conjugadas.

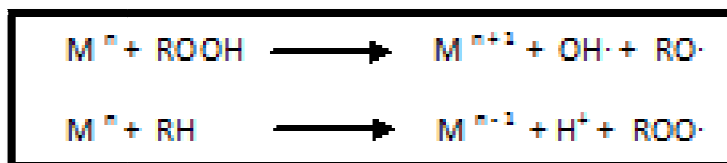
Ácidos grasos libres: Los ácidos grasos libres son mucho más fácilmente oxidables que los correspondientes a los triacilglicéridos ¹³. Para que los ácidos grasos libres tengan un impacto notable sobre la rapidez de oxidación, tiene que haber una concentración considerable de éstos, debido a que si es baja la cantidad de ácidos grasos libres, éstos pueden ser acoplados a la membrana celular y ser protegidos contra la oxidación por algunos antioxidantes naturales, como es el caso de la vitamina E.

Área superficial: La velocidad de oxidación aumenta directamente proporcional al área superficial del lípido expuesta al aire. Además, a medida que aumenta el cociente superficie-volumen, va disminuyendo la influencia de la presión parcial en la velocidad de la reacción.⁴

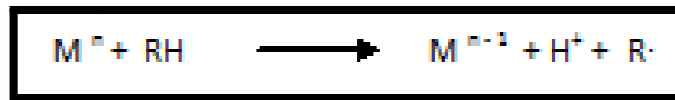
Catalizadores: Los metales de transición, en especial aquellos que tienen dos o más estados de valencia, como son cobalto, cobre, hierro, magnesio y níquel, actúan como agentes pro-oxidantes. Estos favorecen la velocidad de oxidación, ya que disminuyen el período de inducción.

Algunos mecanismos que explican ésta catálisis son:

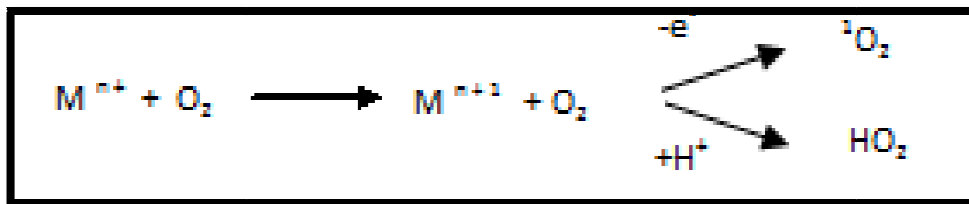
- Aceleración de la descomposición de los hidroperóxidos



- Reacción directa con el sustrato no oxidado



- Activación del oxígeno molecular para dar oxígeno singulete y radicales peróxido.



Dentro de los metales que pueden actuar como prooxidantes en la carne destaca el Hierro, ya que éste se encuentra ampliamente distribuido en el tejido muscular, variando entre tipos de músculo y la especie.

Tabla 3. Concentración de Hierro en diversas especies. ²

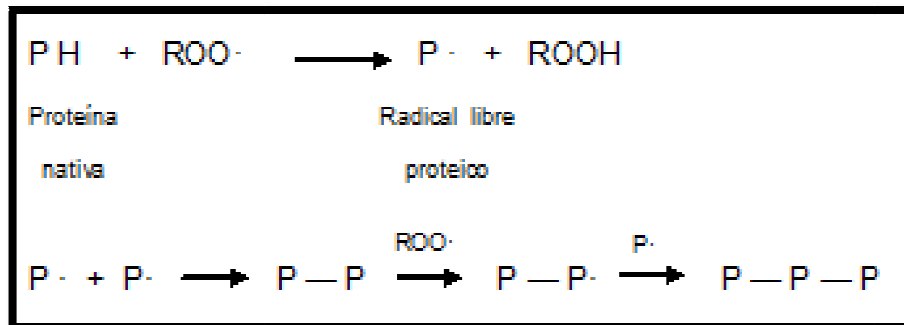
Concentración de hierro en el músculo de diversas especies (µg Fe/g músculo)		
Especie	Hierro Soluble	Hierro libre "catalítico"
Vaca	20	0.7
Cerdo	3.6	0.2
Pollo	3.4	0.2
Pavo	-	0.9

El hierro del grupo Hemo, facilita la oxidación de los lípidos mediante la reacción hemoglobina-oxígeno que produce oxígeno singulete, o bien por exposición del hierro a consecuencia del desplegamiento que pueden sufrir las proteínas durante el almacenamiento en congelación. La catálisis por hierro requiere de la presencia del ion ferroso, por lo que además de la concentración de hierro depende de la presencia de sistemas o agentes reductores que promueven la presencia del hierro en su forma reducida¹⁵.

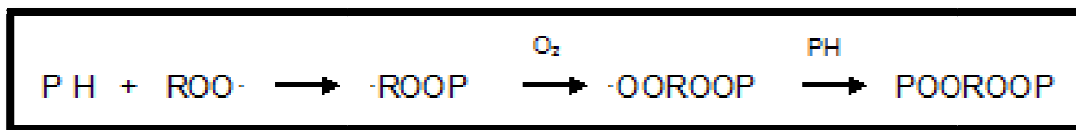
Presencia de altas concentraciones de proteínas en la matriz alimentaria: En los alimentos almacenados en presencia de lípidos, ricos en proteínas, se generan enlaces cruzados covalentes inter o intramoleculares, ocasionando una polimerización, produciendo cambios en la textura de la carne.

Se piensa que son dos mecanismos los involucrados en la formación de estas interacciones:

- a) El primero de ellos es el inducido por la presencia de radicales alcoxido ($RO\cdot$) y/o radicales peróxidos ($ROO\cdot$), generando radicales libres de proteínas ($P\cdot$), los cuales polimerizan con gran facilidad.



- b) El segundo mecanismo involucra la polimerización de radicales libres lípido-proteína, producto de la unión de radicales lipídicos ($ROO\cdot$) y proteínas nativas (PH).



En presencia de compuestos carbonílicos se produce pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard, proceso que se ve favorecido durante la cocción, liberando compuestos volátiles de aroma desagradable, disminuyendo la digestibilidad de la fracción proteica por la formación de melanoidinas de color pardo o negro.

1.6 Desnaturalización de proteínas

La desnaturalización de proteínas se define como la pérdida o modificación de su estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, la cual provoca una disminución en la solubilidad o capacidad de extracción bajo condiciones en las que la proteína nativa es solubilizada o extraída. Esta desnaturalización involucra el rompimiento de enlaces de hidrógeno de otras interacciones intra e intermoleculares como los enlaces de hidrógeno entre cadenas laterales, enlaces S-S cruzados y puentes salinos.

La desnaturalización de proteínas esta influenciada por varios factores. Entre ellos se encuentran los cambios en la temperatura, pH y detergentes, así como a la radiación, los cambios en el tipo de solvente, y los agentes oxidantes y reductores que pueden alterar las uniones S-S.

La desnaturalización de proteínas puede llevar a la formación de agregados de proteínas desnaturalizados, e inducir una precipitación, coagulación o gelificación. La agregación de proteínas involucra la formación de complejos de proteínas desnaturalizados de alto peso molecular, los cuales se unen por puentes y sitios específicos en toda la molécula. La desnaturalización es entonces un

requisito previo para la formación de agregados proteicos o geles. Los pasos para la coagulación de proteínas en disolución son:

1. Disociación reversible de la estructura cuaternaria dentro de las subunidades o monómeros (La disociación reversible de los polímeros en su estado nativo puede tomar lugar en el primer paso de desnaturalización)
2. Desnaturalización irreversible de la estructura terciaria y secundaria (desdoblamiento de la proteína)¹

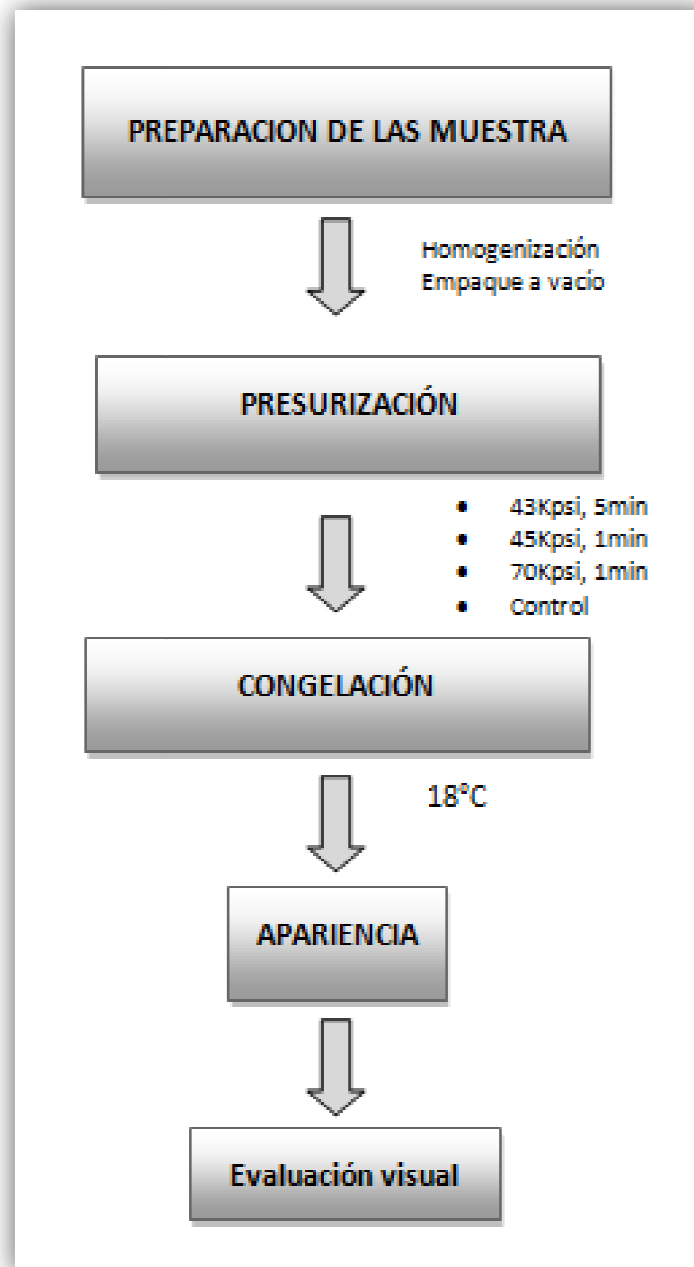
Debido a la disociación y el entrecruzamiento de las proteínas, se exponen los grupos de los hidrocarburos de las proteínas globulares, permitiendo mayor interacción de los grupos hidrofóbicos de las proteínas. El entrecruzamiento de los agregados de proteínas se explica mediante los siguientes mecanismos:

1. Reacciones de oxidación química de las proteínas como resultado de la interacción covalente de sus grupos funcionales.
2. Entrecruzamiento de proteínas por agentes polifuncionales (incluyendo iones metálicos) en solución.

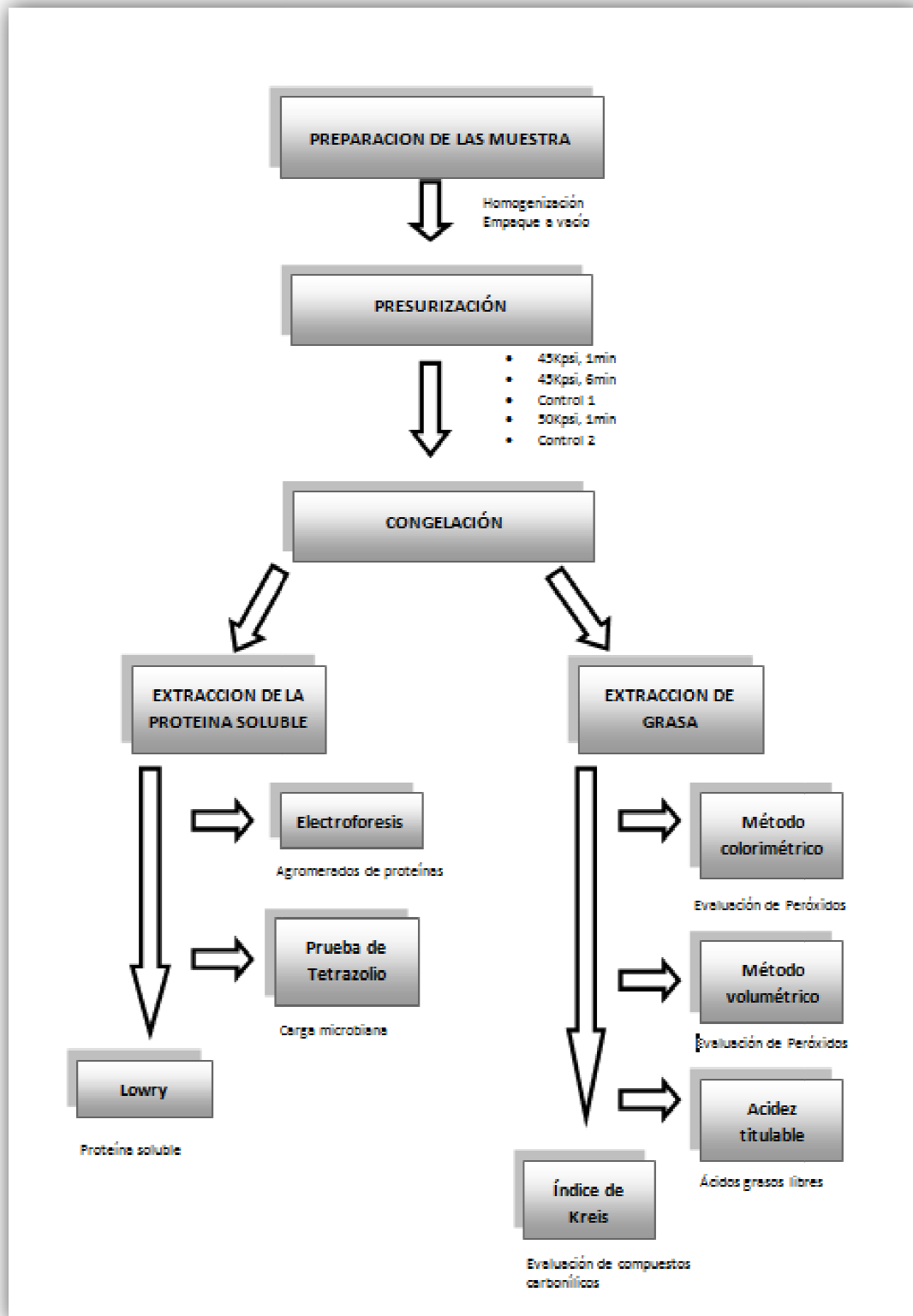
Disminución de la solubilidad por que se favorecen las interacciones hidrofóbicas y la consecuente modificación en la estructura proteínica¹.

2 DIAGRAMA DEL ESTUDIO.

2.1 . Primera parte. Selección de condiciones.



2.2. Segunda parte. Monitoreo bajo condiciones tiempo-presión seleccionadas.



3. METODOLOGIAS.

3.1. Extracción de lípidos por el método de Bligh & Dyer

Se pesaron de 2 a 20g de carne homogeneizada en un vaso mezclador, se adicionó agua destilada suficiente para llevar a un total de 16mL (determinar previamente contenido de humedad para hacer el ajuste de agua) junto con 40mL y 20mL de diclorometano.

Se molió por 2min, adicionándose posteriormente 20mL de diclorometano y se homogeneizó durante 30s. Se centrifugó la mezcla en una centrífuga LABTRONIC scientific H-1650 durante 10min a una velocidad de 2500rpm.

Se extrajo la fase orgánica y se filtró a través de papel filtro. El filtrado se vació en un matraz de bola de peso constante y se evaporó el disolvente a 40°C en un rotavapor BUCHI R-20, equipado con un baño BUCHI Heating Bath B-490 y una bomba de vacío BUCHI Vac V-500.

Una vez evaporado el disolvente, el matraz se llevó a sequedad en una estufa de vacío National Appliance Company Modelo 5831, a 60°C hasta peso constante y por diferencia de peso se calculó el contenido de grasa.^{1,26}

3.2. Índice de peróxidos. Método volumétrico

Se pesaron de 0.5± 0.05g de grasa en un matrás Erlenmeyer de 125mL y se adicionaron 2.5mL de una solución de ácido acético/diclorometano (3:2), disolviendo perfectamente. Se Adicionó 0.05mL de una solución saturada de yoduro de potasio, dejándose reposar en la oscuridad 60seg, medidos con cronómetro.

Se añadió 7.5mL de agua destilada hervida y fría. Se adicionó 0.1mL de una solución de almidón indicador (almidón soluble al 1% en agua). Al presentarse una coloración azul oscuro (en toda la solución o en forma de puntos aislados), se

titulaba lentamente con tiosulfato de sodio 0.001N hasta la desaparición total del calor azul.²⁵

3.3. Índice de peróxidos. Método colorimétrico

Se pesaron 0.3g de grasa en un tubo de ensaye. Se añadieron diclorometano/metanol (70:30 v/v) hasta un volumen de 9.9mL y se mezclaron para disolver la muestra. Se adicionaron 0.05mL de una solución de tiocianato de amonio (30% m/v), se mezcló y se midió la absorbancia a 500nm (E₀) contra un blanco de la mezcla de diclorometano/metanol (70:30). Se adicionó 0.05mL de una solución de cloruro ferroso (0.35% m/v que contiene 2% de HCl 10N). Se mezcló y después de exactamente 5 minutos se midió la absorbancia de nuevo a 500nm (E₂); simultáneamente se realiza un blanco de reactivos (E₁).

Se preparó una curva de calibración con cloruro férrico (FeCl₃) en concentraciones que contengan entre 5 y 50µg de Fe/10mL obtenidos en la reacción, con el peso de la muestra. La cantidad de Fe se obtuvo a partir de la curva de calibración, utilizando la absorbancia obtenida, una vez corregida por los blancos $[E_2 - (E_1 + E_0)]$.²⁴

3.4. Índice de Kreis.

Se disolvieron de 50 a 500mg de grasa en 5mL de diclorometano. Se añadieron 10mL de una solución de ácido tricloroacético al 30% en ácido acético glacial y 1mL de fluoroglucinol al 1% en ácido acético. Se incubó por 15 minutos en un baño maría a 45°C, se dejó enfriar y se agregaron 4mL de etanol. Finalmente se midió la absorbancia de la muestra a 540nm frente a un blanco de reactivos. El índice de Kreis se calculó como Absorbancia a 540nm/g de grasa.²⁰

3.5. Acidez titulable.

En un matr az Erlenmeyerde 125mL se colocó 0.5g de lípidos y se adicionó 25mL de alcohol previamente neutralizado (utilizando fenolftaleína 0.1% como indicador). Se calentó en un baño de agua en ebullición suave y se tituló en caliente con KOH 0.0025N, agitando fuertemente después de cada adición de álcali.

3.6. Obtención del concentrado de proteínas.

Se colocó 1g de carne en un vaso de precipitado de 100mL y se adicionaron 10mL de una solución de EDTA 0.02M (a un pH de 10), la mezcla se homogenizó en un homogenizador de alta velocidad (ULTRA-TURRAX T25) y posteriormente se centr ofugo a una velocidad de 2500rpm en un centrifugador Labtronic Scientific H-1650, se separó el sobrenadante para de esta forma obtener el concentrado de proteína

3.7. Determinación de proteína soluble. Lowry

Se colocó 1mL del concentrado de proteína en tubos de ensaye perfectamente etiquetados. Se adicionó 1mL del reactivo C preparado recientemente (50mL de A y 1mL de B) (A: Carbonato de sodio 2% y Tartrato de sodio 0.02% en NaOH 1M; B: Sulfato de cobre 0.5%), dejándose reposar 10 minutos; transcurrido el tiempo se adicionaron a la mezcla 0.3mL del reactivo D (1 parte de reactivo de Folin con 1 parte de agua), agitando inmediatamente. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se determinó la absorbancia del color azul producido a 750nm contra un blanco preparado de la misma manera con 1mL de agua en vez de la solución problema.

La concentración de proteína se calculó a partir de una curva patrón con albúmina bovina sérica en concentraciones de 10 a 100 g/mL, tratadas de la misma manera.²⁷

3.8. Electroforesis en gel de acrilamida

Soluciones utilizadas en la electroforesis:

- Solución acrilamida/bisacrilamida 30% w/v acrilamida y 2.7% bis-acrilamida.

Aforar con agua destilada.

- Persulfato de amonio al 10% recién preparado. Aforar con agua destilada.
- TEMED
- Buffer electroforético (pH 8.3). Tris 25mM, Glicina 92mM, SDS 0.1%, aforado a 1L con agua destilada. (Al emplear, realizar dilución 1:10).
- Buffer de carga 4x. Adicionar 0.4g de SDS, 5mL Glicerol, 2.5mL de Buffer concentrador, 400 μ L Azul de Bromofenol (0.5%). Llevar a 9mL con agua destilada. Separar 900 μ L en tubos de 1.5mL y adicionar 100 μ L de β -mercaptoetanol antes de usar.
- Azul de Coomassie. Adicionar 1g de Azul de Coomassie, 450mL Metanol, 450mL de agua destilada y 100mL de Ácido acético Glacial.
- Solución Desteñidora. Adicionar 100mL de Metanol, 100mL Ácido acético Glacial y 800mL de agua destilada.

Tabla 4. Gel separador y concentrador para electroforesis.

	Gel separador 7.5%	Gel concentrador 7.5%
Agua	6.525mL	2.715mL
Solución de Acrilamida	3.15mL	622.5µL
Tris 1.0M pH8.8	2.865mL	----
Tris 0.5M pH6.8	----	375µL
SDS	127.5µL	37.5µL
Persulfato de Amonio	90µL	30µL
TEMED	9µL	3µL

En la Tabla 4 se encuentran desglosadas las proporciones de cada reactivo con los que se prepara cada uno de los geles.

Los geles se montaron en la cámara MINIPROTEAN II de Bio-Rad una vez gelificados y con los pocillos formados. En el reservorio superior se colocó buffer electroforético hasta inundar los pocillos y en el reservorio inferior se colocó el buffer hasta un poco más de cubrir 1/3 del volumen de la cámara.

El marcador empleado fue el de amplio peso molecular de SIGMA S8320. Los péptidos que contiene en marcador son los siguientes:

Tabla 5. Relación de pesos moleculares de los marcadores empleados.

Proteína	Peso molecular (Da)	Alto rango (161-0303)	Ultra bajo rango (M3546)	Amplio rango (S8445)
Miosina de músculo de conejo	200,000	X	-	X
β -Galactosidasa de <i>E. coli</i>	116,250	X	-	X
Fosforilasa b de músculo de conejo	97,000	X	-	X
Albúmina de suero bovino	66,000	X	-	X
Glutámico deshidrogenasa de hígado bovino	55,000		-	X
Ovalbúmina de huevo de gallina	45,000	X	-	X
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo	36,000	-	-	X

La muestra se preparó mezclando 20 μ L de muestra que contiene 5000 μ g/mL de proteína con 5 μ L de buffer de tratamiento 4X. Esta mezcla se calentó a ebullición durante 5 minutos para permitir que el β -mercaptoetanol actuara reduciendo los enlaces disulfuro.

Los geles se cargaron con 20 μ L de mezcla muestra/buffer de tratamiento 4X o con 5 μ L de marcador. El marcador empleado ya contenía buffer, por lo que no requirió la adición de buffer de tratamiento.

Se corrió la electroforesis a una intensidad constante de 100 V hasta que se observó la salida del frente colorido.

Los geles se desmontaron y se dejaron tiñendo toda la noche con una solución de Coomasie. Al día siguiente los geles fueron desteñidos con la solución desteñidora hasta que se vieron bandas claras.

Por último se determinó el peso molecular de las bandas del gel tiempo inicial, utilizando el densitómetro modelo GS 700 Bio-Rad y el programa de computadora Quantity-One.

3.9. Cuenta indirecta de Microorganismos. Prueba de Tetrazolio.

Se pesaron 5g de la muestra y se agregó 30mL de agua destilada esterilizada. Posteriormente se homogeneizó. Se agregaron 0.5mL de una solución al 0.5 de cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio, más 5mL de una de una solución reguladora de fosfatos a pH de 7. Se incubo a 38 ± 1 °C durante 7 horas.

Por último se extrajo el formazan obtenido mediante agitación con 30mL de butanol (se centrifujo). Se leyó a 485nm.

Para la preparación de la curva de calibración se pesó 1g de 2,3,5-trifeniltetrazolio con 1g de ácido ascórbico, disolviendose con 25mL de agua destilada, más 5mL de una solución de NaOH al 10% (w/v). La reducción se completó en 20min. Se neutralizó, filtró y el trifenilformazan se lavó sobre papel filtro, secando a 37°C.

Se prepararon diluciones por concentración, usando butanol como disolvente. Se leyo a 485nm.

4 RESULTADOS

4.1. Selección y preparación de muestra.

Para facilitar el manejo de la muestra así como la extracción del material lipídico se buscó contar con piezas de un alto contenido graso. El corte de Bovino Sirloin, se caracteriza por ser un corte con abundante marmoleo y con grasa en los bordes que le dan sabor, suavidad y jugosidad.

Para la preparación de las muestras se cortó la carne y se mezcló, buscandose obtener muestras lo más homogéneas posibles. Es importante mencionar que a pesar de corresponder las muestras a un mismo corte (Sirloin), pueden presentarse diferencias en la composición de éstas, en donde debido a las variaciones del metabolismo, las condiciones de crianza, y de manera muy importante a la alimentación de cada animal, pueden haber oscilaciones principalmente en el porcentaje de grasa y el perfil de ésta.¹

Cuando los alimentos se tratan bajo APH contenidos dentro de algún envase, éste debe ser flexible y deformable (ha de tolerar reducciones de volumen de hasta un 15%). Es especialmente importante la evacuación de los gases del interior para evitar que su compresión reduzca la eficacia de la presurización²³. Es por eso que se colocaron 70g de carne en cada bolsa de Polivinilo, a vacío con sellado térmico, seguido por un tratamiento de presurización y posteriormente congelación a -18°C o en el caso de los controles un tratamiento de congelación a -18°C. Las muestras fueron almacenadas en congelación a -18°C por un tiempo de 19 semanas. Para cada determinación se realizó sacrificio de muestra.

4.1.1. Elección de la presión hidrostática y tiempo empleados

La apariencia de la carne es un factor muy importante a conservar, ya que el consumidor exige mantener la mayor cantidad de atributos sensoriales que una carne fresca ofrece, entre los que se destacan, dureza, color y sabor.

Varios autores sugieren un rango de 100MPa-1000MPa (14.5kpsi- 145kpsi), en tiempos de entre 1-10min de exposición, aproximadamente, para probar los efectos de las altas presiones en alimentos^{17, 33}.

Para la selección de las presiones a utilizar en el estudio, se llevaron a cabo pruebas a diferentes presiones y tiempos sobre carne de res fresca, permitiendo de esta forma evaluar de manera preliminar el efecto de la alta presión sobre la apariencia de la carne.

Las condiciones empleadas de tiempo y presión fueron:

- Presión manométrica del equipo de 70kpsi, 1 min.
- Presión manométrica del equipo de 45kpsi, 5 min.
- Presión manométrica del equipo de 43kpsi, 1 min.



Figura 6. Muestra presurizada a 70kpsi (1 minuto)



Figura 7. Muestra presurizada a 43Kpsi (5 minutos)

Las muestras presurizadas presentaron cambios en el color al momento de ser presurizadas. Para las presiones de 43kpsi (5 minutos) y 45Kpsi (1 minuto), el cambio de color fue igual, pero ese color aún era de una tonalidad roja, siendo aceptable. La muestra que presentó un mayor daño en el color fue la sometida a 70Kpsi (1 minuto), dando un color amarillento, el cual es muy desagradable, ya que se espera que la carne de Bovino tenga un color rojo. Esto se explica a que la oximioglobina sufre mayor daño a presiones más elevadas, es decir, el daño será directamente proporcional a la intensidad de la presión aplicada⁵⁵.

Con esto se podría descartar la conservación de carnes de Bovino a presiones iguales o mayores que 70Kpsi, pues como ya se mencionó, el color es un punto muy importante a evaluar por el consumidor.

La forma del alimento permaneció intacta, ya que como se mencionó anteriormente, según la ley de Pascal³⁰, no se deforma el alimento al aplicar igual presión en todas direcciones, tal cual lo muestra la figura 8.

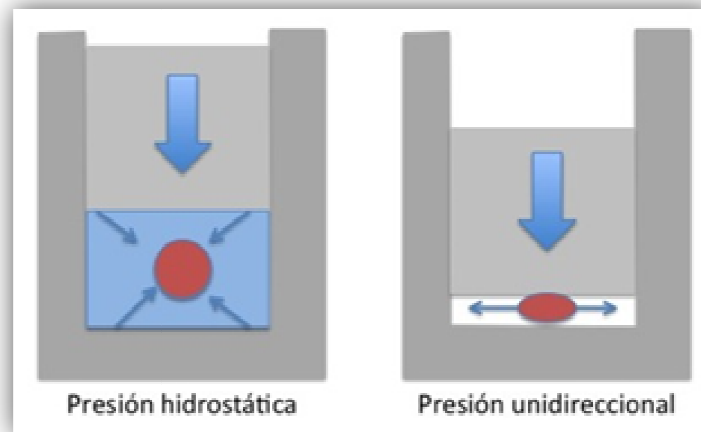


Figura 8. Aplicación de presión de forma uniforme en la utilización de las APH.

Con los resultados obtenidos se determinó que las pruebas para el presente estudio se realizarían en el rango de presión donde se observó que la carne sometida a la alta presión presentaba una apariencia de color y apariencia aceptable, refiriéndonos a un intervalo de entre 45-50kpsi con variación del tiempo de exposición.

Las condiciones que se seleccionaron para llevar a cabo el estudio fueron:

- Presión manométrica en el equipo de 45kpsi, 1 min.
- Presión manométrica en el equipo de 45kpsi, 6min.
- Presión manométrica en el equipo de 50kpsi, 1min.

4.2. Extracción de grasa.

Se empleó el método de Bligh y Dyer, ya que por medio de éste se obtienen buenos rendimientos de extracción para alimentos con alto contenido de humedad, siendo así el caso de la carne de Bovino. Además, al no usar altas temperaturas, el grado de oxidación de la grasa no es alterado, obteniéndose así resultados confiables durante el monitoreo de la oxidación lipídica¹.

Las muestras sometidas a una presión y tiempo de 45 Kpsi 1 min y 45 Kpsi 6 min, así como su control corresponden al lote 1 de muestra (Carne comprada en un primer establecimiento), la muestra sometida a 50Kpsi 1 min y su respectivo control corresponden al lote 2 (Carne adquirida de una segunda tienda).

Tabla 6. Porcentaje de grasa para cada lote de muestra.

Lote	Muestra	Grasa (g /100 g de muestra)
1	50Kpsi - 1 min	1.96 ± 0.08
	Control 2	
2	45Kpsi -1 min	4.36 ± 0.16
	45Kpsi - 6 min	
	Control 1	

Existe una diferencia notoria entre el porcentaje de grasa obtenido de cada lote, tal cual se puede ver en la tabla 6. Como ya se mencionó, los lotes son de diferente procedencia (lugar de compra), por lo que la variación de la extracción de grasa está en función de muchas variables, como es el personal que prepara la muestra, el animal del cual la carne proviene, y a su vez, como ya se mencionó previamente, la alimentación del animal, región de origen, entre otras. Por tal razón se buscó homogenizar la carne lo mayor posible.

4.3. Evaluación del efecto de las APH en la rancidez oxidativa.

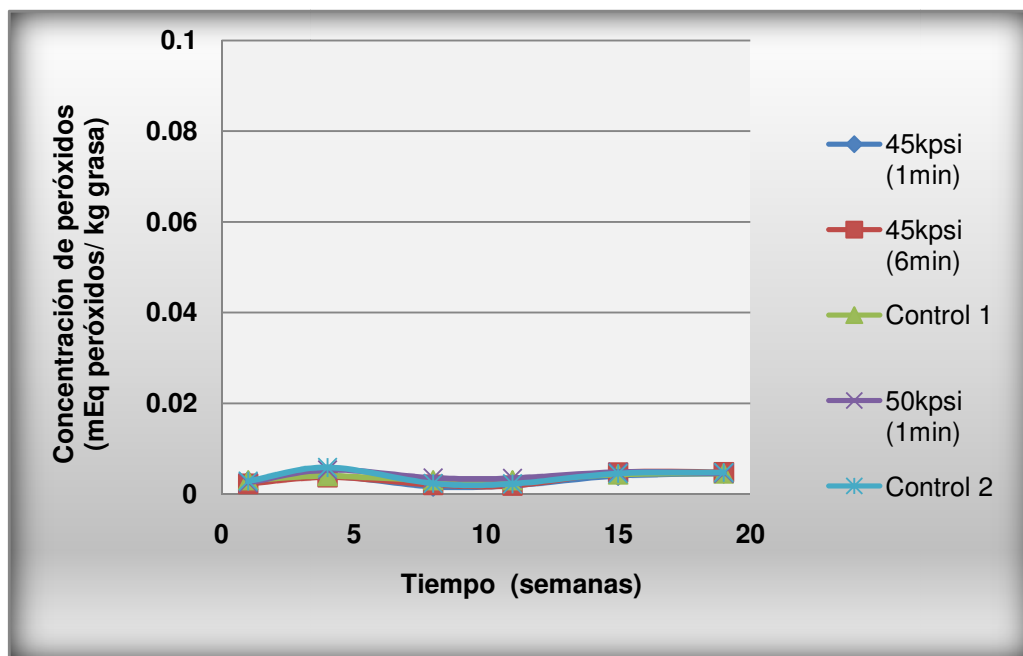
Se realizó un estudio para muestras presurizadas y congeladas a -18°C y sus respectivos controles conservados a congelación a -18°C . Este estudio se realizó para los dos diferentes lotes, en los cuales se evaluó el índice de peróxidos por los métodos colorimétrico y volumétrico e índice de Kreis, en un lapso de tiempo de 19 semanas.

4.3.1. Determinación de peróxidos

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Como ya se mencionó con anterioridad las muestras de carne de res (corte Sirloin), se mantuvieron almacenadas en bolsas de Poliovinilo bajo condiciones de congelación a -18°C por un tiempo de 19 semanas.

Para evaluar la presencia de los peróxidos se utilizaron dos métodos: el volumétrico y el colorimétrico:

En la gráfica 1 se presentan los datos obtenidos a través del monitoreo de los productos de oxidación de los lípidos presentes en la carne por el método colorimétrico. Para el método volumétrico, durante el monitoreo de las 19 semanas no hubo respuesta positiva a esta prueba. La determinación de peróxidos bajo el método colorimétrico mostró concentraciones de peróxidos muy bajas, siendo despreciables.



Gráfica 1. Evolución de los índices de formación de peróxidos. Método colorimétrico.

Como se puede observa en la gráfica 1, no hay aumento de la concentración de los peróxidos. El índice de peróxidos de las muestras control y las muestras presurizadas no son significativos, ya que la AOCS⁵⁶ determina como límite de aceptabilidad para aceites comestibles un valor de peróxidos de 10.0meq/kg de grasa, de acuerdo con lo cual todas las muestras, desde la primer semana hasta la semana 19 cumplen con las especificaciones, estando muy por debajo de ese límite.

Como ya se mencionó, las muestras fueron empacadas a vacío y almacenadas en congeladores donde se procuró tener un control de la luz, para que no hubieran diferencias en los resultados debida a este parámetro. El vacío ocasiona un déficit de oxígeno, siendo el oxígeno el factor limitante en la reacción de autooxidación, en donde la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de oxígeno¹¹.

Se sabe que con buenas condiciones de empaque al vacío, la concentración de oxígeno se reduce por debajo del 1%. Por esta razón es posible que se lleve a cabo la oxidación de grasas de productos empacados, pero con velocidades de reacción muy bajas. Es por esto que las grasas de estos productos se oxidarán en tiempos prolongados.

Estudios sobre las altas presiones en lípidos de puerco muestran que una presión de 116kpsi por 20 min, se induce a la oxidación lipídica, reduciendo el periodo de inducción, en comparación con sus controles. Las presiones utilizadas en el estudio no sobrepasan los 50kpsi, es decir, se habla de la mitad de presión que se utilizó en el estudio de referencia y en tiempo solo se manejaron como máximo tiempos de 5min, lo que nos da hincapié a pensar que si se manejan presiones y tiempo más elevados será probable observar un efecto en la oxidación lipídica debida a la alta presión.

4.3.2. Determinación de Índice de Kreis.

La prueba se caracteriza por ser una determinación colorimétrica, dando una coloración rosada al existir una concentración considerable de productos secundarios (compuestos carbonílicos), indicando que la reacción es positiva.

Como se observa en la tabla 7 no hay un incremento en la abs /g de las muestras durante las 9 semanas. La prueba para las diferentes muestras fue negativa, ya que en ningún momento se observó la coloración rosada característica de esta prueba, lo que está indicando, que no hay un aumento de la formación de los compuestos carbonílicos provenientes de una oxidación lipídica.

El índice de peróxidos mostró ausencia de éstos (concentraciones muy bajas de peróxidos como para ser detectados por ambas técnicas anteriormente señaladas), por lo que es de esperar que la reacción de la formación de compuestos carbonílicos se lleve a cabo a velocidades de reacción bajas. La

descomposición de los hidroperóxidos desencadenará la formación ya sea de aldehídos, alcoholes o cetonas.¹⁰

En otras fuentes enfocadas al estudio de la oxidación de carne de bovino congelada, se ha visto que es necesario llegar a índices de Kreis superior a los 0.62 abs/g de grasa para que la reacción de señal positiva. En otras fuentes el índice debe superar los 0.4abs/g de grasa^{2,11}. Por tanto se puede considerar que las muestras no presentan hasta ese tiempo de almacenamiento la concentración adecuada de compuestos secundarios para dar una respuesta positiva.

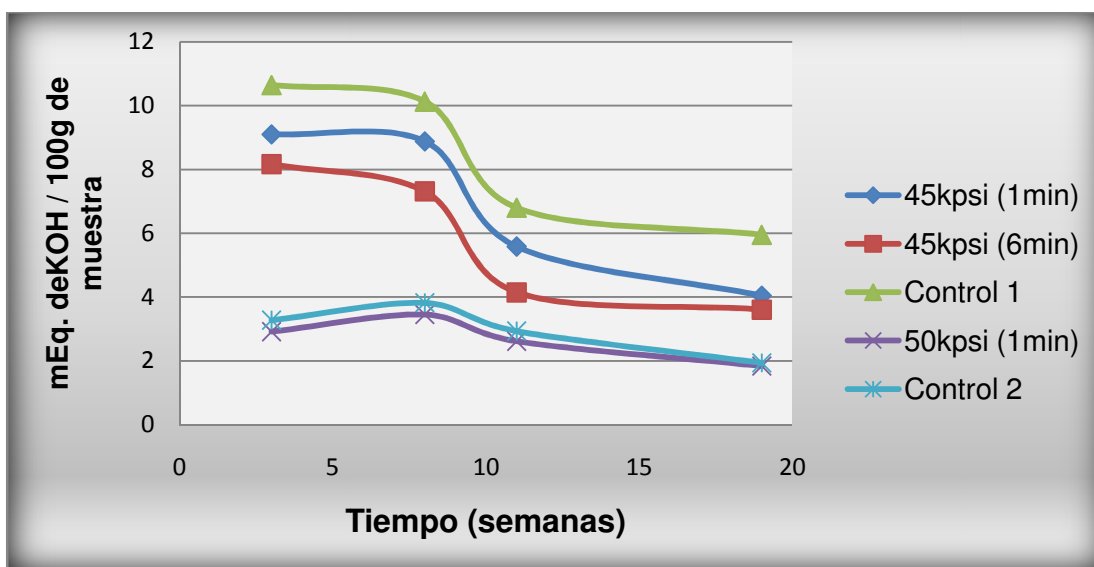
Tabla 7. Resultados de la formación de compuestos carbonílicos en las muestras almacenadas a -18°C. Índice de Kreis.

Tiempo de almacenamiento en congelación a -18°C (semanas)	Tratamiento				
	45kpsi (1min)	45kpsi (6min)	Control 1	50kpsi (1min)	Control 2
	abs / g				
1	0.2654±0.0046	0.1910±0.0110	0.1937±0.0045	0.0557±0.0043	0.0617±0.0019
3	0.2507±0.0107	0.2868±0.0148	0.3783±0.0126	0.1656±0.0029	0.0382±0.0018
8	0.2017±0.0058	0.1512±0.0032	0.2588±0.0086	0.1091±0.0019	0.0422±0.0022
11	0.2311±0.0132	0.1545±0.0057	0.0767±0.0005	0.1165±0.0050	0.0958±0.0052
15	0.2339±0.0015	0.1875±0.0067	0.0975±0.0043	0.1118±0.0059	0.0647±0.0032
19	0.2720±0.0100	0.2061±0.0111	0.1062±0.0054	0.0789±0.0029	0.0622±0.0015

4.4. Evaluación del efecto de las altas presiones hidrostáticas en la liberación de ácidos grasos.

La hidrólisis de los enlaces éster de los lípidos se produce por acción enzimática o por calentamiento en presencia de agua, permitiendo la liberación de ácidos grasos. Esta liberación tiene como consecuencia la aparición de sabores a rancio en diferentes alimentos. Cierta número de investigaciones señalan que la liberación de los ácidos grasos de los triacilglicerolos incrementa la tendencia a la autooxidación. Si se producen AGL (ácidos grasos libres) durante el almacenamiento de la carne, es posible que se generen sabores extraños y también interacciones con las proteínas contráctiles desnaturalizandolas⁴.

Para conocer la evolución de la rancidez hidrolítica en la carne, se determinó indirectamente la concentración de ácidos grasos libres, mediante la determinación de los mEq. de KOH gastados por cada 100g de grasa. La reacción es una reacción ácido-base, formándose las sales correspondientes de los ácidos grasos.



Gráfica 2. Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la liberación de los ácidos grasos.

Se puede apreciar en el gráfico 2 una disminución de la concentración de los ácidos grasos libres en el transcurso del monitoreo, pues como se mencionó anteriormente, la concentración de ácidos grasos libres es directamente proporcional al volumen de base empleado (KOH).

Estudios realizados en pescado han mostrado que las lipasas de pescado se ven afectadas con el proceso de presurización, obteniéndose una menor liberación de ácidos grasos libres. En el gráfico 2 se puede apreciar como no hay diferencia apreciable entre las muestras controles y las muestras presurizadas, observándose que el decremento de acidez es similar entre ambas. Estudios señalan que durante almacenamiento en congelación de carne de res, cerdo y aves, el efecto de la lipólisis no es significativo ya que la actividad lipolítica se ve inhibida por las bajas temperaturas empleadas, observándose claramente este efecto, ya que no hubo liberación de ácidos grasos apreciable.

Debido a que los sustratos se encontraban inmovilizados, disminuyendo la oportunidad de que actúe la enzima en ellos. La concentración de ácidos grasos libres no presenta un incremento y por el contrario, aquellos ácidos grasos que ya se encontraban en forma libre serán más susceptibles a sufrir un proceso oxidativo⁴.

4.5. Evaluación del efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre las proteínas.

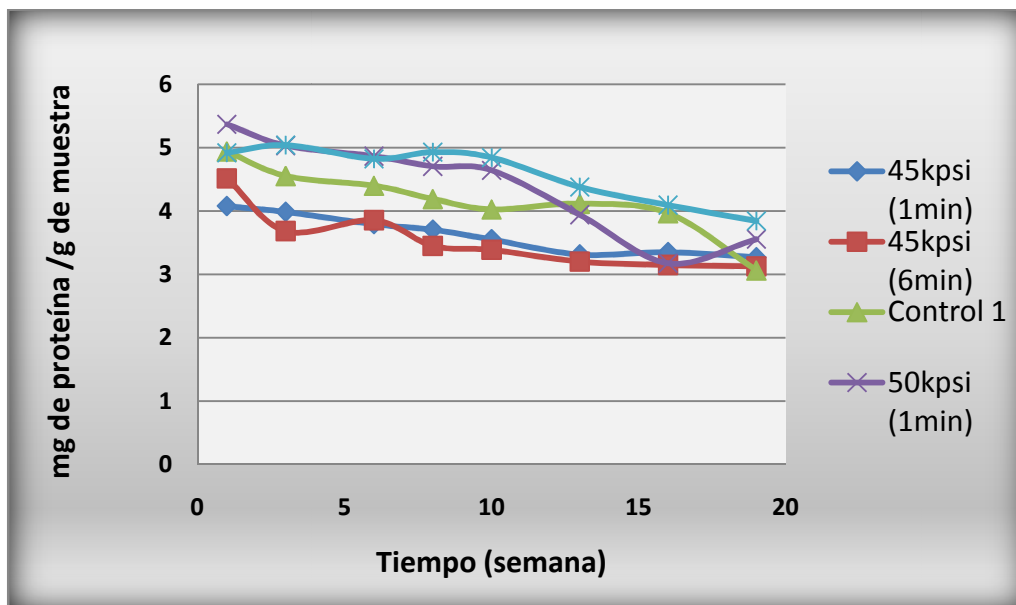
4.5.1. Determinación de la proteína soluble.

El cambio de la solubilidad que presentan las proteínas está relacionado directamente con la pérdida de la calidad nutricional, es decir, conforme hay un decremento de la solubilidad se considera que la proteína se encuentra menos disponible para ser aprovechada por el organismo, debido a la aglomeración que

éstas van presentando, dificultando el encuentro de las enzimas proteolíticas con sus sitios específicos de acción⁷.

Estudios realizados en carne de Bovino sometida a procesos de congelación muestran que la congelación tiene un efecto en la desnaturalización de las proteínas, llevándose a cabo la formación de agregados de proteínas de alto peso molecular. La desnaturalización es entonces un requisito previo para la formación de agregados de proteínas¹.

Por otro lado se ha demostrado que las altas presiones hidrostáticas tienen un impacto considerable en la desnaturalización de las proteínas. Investigaciones posteriores señalan que tratamientos en rango de presión alto (110kpsi, aproximadamente 757.9MPa) invariablemente producen desnaturalización proteínica, mientras que tratamientos moderados (14.69kpsi, aproximadamente 69MPa) permiten estabilizar la forma nativa de las proteínas⁴³, debido al efecto que tiene la presión sobre las interacciones de las proteínas.



Gráfica 3. Monitoreo de la proteína soluble. Lowry

El gráfico 3 permite identificar las diferencias existentes entre las muestras de carne presurizadas y los controles.

A partir de la gráfica 3, se observa que a una presión de 45kpsi durante 1 y 6 minutos, el decremento de la proteína soluble durante el almacenamiento a -18°C, no presenta cambios importantes con respecto a su control. Inicialmente como se observa en la gráfica 3, las Altas presiones tienen un impacto sobre las proteínas, observándose valores más bajos de proteína soluble que con el control, pero ya durante el monitoreo, el decremento de este valor se va asemejando al control. Para el caso de la presión de 50kpsi durante 1 minuto de exposición, la concentración de proteína soluble es similar a la concentración de la muestra control correspondiente a este lote, lo que indica que el decremento de la proteína soluble en ambas muestras es similar durante el almacenamiento, ya que al tiempo inicial, tal como ocurrió con las muestras de 45kpsi, la aplicación de la alta presión genera una desnaturalización inicial de proteínas, lo que da valores más bajos de este parámetro, comparándolas con sus controles, pero en el almacenamiento el efecto desnaturalizante se debe a la congelación, no así a la Alta presión.

Estudios señalan que para lograr la desnaturalización de las proteínas es necesario someter las muestras a presiones superiores a los 300MPa (aproximadamente 43.55kpsi) manejándose tiempos de exposiciones cercanos a los 10min. El tratamiento que se realizó en el presente estudio maneja rangos de presión y tiempo bajos, lo que permite explicar el por qué las muestras presurizadas tienen un comportamiento del decremento de la proteína soluble muy parecido con sus controles.

4.5.2. Pesos moleculares de las proteínas

Para el estudio de la desnaturalización de proteínas, se utilizan técnicas de electroforesis en dos dimensiones que producen un mapa que permite monitorear

los cambios bioquímicos. Con esta técnica se identifican los pesos moleculares de las manchas proteicas que aparecen en los geles.

Con el fin de determinar la influencia de la Alta presión Hidrostática sobre la desnaturalización y formación de agregados, se realizaron geles al 7.5% de acrilamida para separar preferentemente proteínas de mediano y alto peso molecular. Para el análisis de las proteínas se decidió separar los pesos moleculares en tres grupos, para de esta forma enfocarnos a la formación de aglomerados de alto peso molecular, ya que en general las proteínas de carne son de pesos moleculares altos. En la Tabla 8 se observa que a tiempo cero, el perfil de pesos moleculares de las proteínas correspondientes a las muestras presurizadas son muy similares a los controles.

Tabla 8. Pesos moleculares de las muestras en el tiempo inicial. Electroforesis en gel de Acrilamida.

Pesos moleculares	45kpsi (1min)	45kpsi (6min)	Control 1	50kpsi (1min)	Control 2
Mayor que 100kDa	122kDa	-	182kDa 109kDa*	127kDa	125kDa
De 100kDa a 45KDa.	81kDa 72kDa* 59kDa* 49kDa 46kDa*	84kDa 74kDa* 61kDa* 51kDa* 47kDa	74kDa 66kDa* 53kDa* 46kDa	74kDa 60kDa 50kDa	84kDa 74kDa 60kDa 55kDa 50kDa
Menor que 45kDa	42kDa 37kDa	43kDa 38kDa	43kDa* 40kDa* 35kDa	37 kDa	42kDa 32kDa

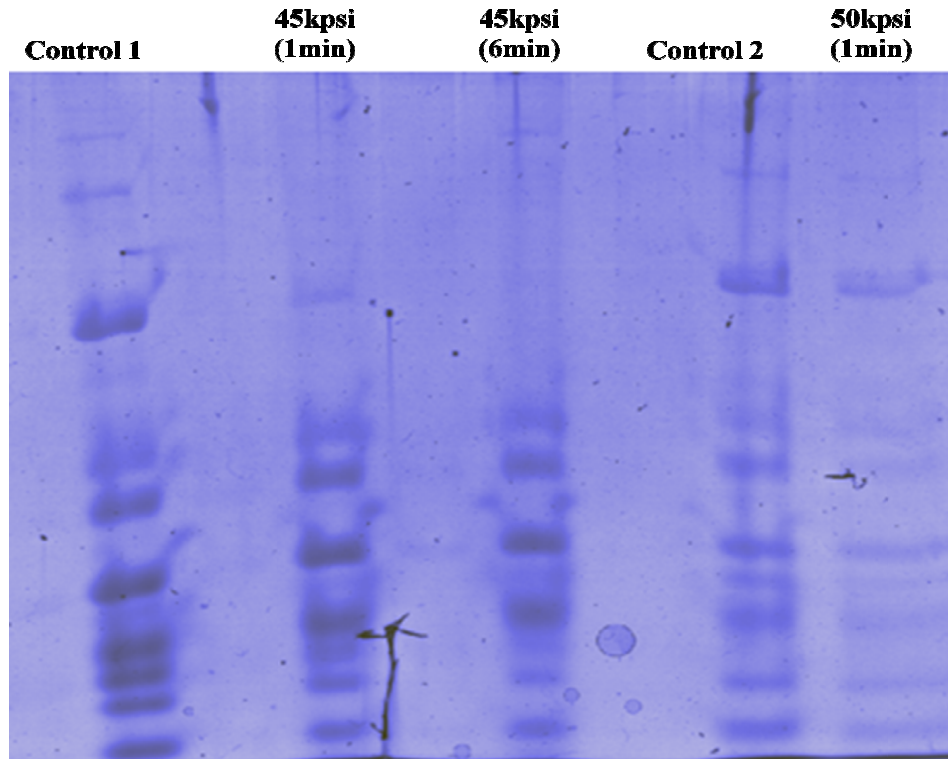


Figura 9. Gel electroforético de Acrilamida. Tiempo inicial.

La aplicación de presiones superiores a 100-200MPa (aproximadamente 14.56kpsi-28.98kpsi) a temperatura ambiente, provoca la disociación de macroestructuras en subunidades, así como, el despliegue y desnaturalización de estructuras monoméricas, debido probablemente al debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas y la separación de los puentes salinos inter o intramoleculares⁴⁹. Como se puede observar, en la figura 9, hay una menor cantidad de bandas, al igual que la intensidad de éstas es menor en las muestras presurizadas, en comparación de los controles. Analizando la cantidad de bandas, presentes en la tabla 8, las muestras de 45kpsi 1min, 45kpsi 6min y su control, se observa que cada una de las muestras presenta 8 bandas, 7 bandas y 9 bandas respectivamente, presentando una intensidad superior las bandas localizadas en el carril de la muestra control, con lo que se podría explicar que la presión ejercida fue suficiente para permitir la formación de las subunidades de las proteínas (menor peso molecular) y desnaturalización de las proteínas, por lo que se

generaron estructuras de bajo peso molecular, menores a 36kpsi, saliéndose del gel con mayor rapidez que las proteínas del marcador. Este caso se repite con la muestra de 50kpsi y su control, obteniéndose 5 bandas para la muestra de 50kpsi 1 min y 9 para su respectivo control, pero lo característico es la intensidad de las bandas, explicándose esa diferencia de concentración de proteínas de la misma forma como se explico para las muestras de 45kpsi 1min y 45kpsi 6min, es decir, la diferencia de bandas y de intensidad es debida a la salida de proteínas de bajo peso molecular.

Tabla 9. Pesos moleculares de las proteínas de carne. Tiempo final.

Pesos moleculares	45kpsi (1min)	45kpsi (6min)	Control 1	50kpsi (1min)	Control 2
Mayor que 100kDa	210kDa** 179kDa 143kDa	211kDa 144kDa	211kDa 144kDa 138kDa*	210kDa 145kDa 140kDa*	210kDa 140kDa*
De 100kDa a 45kDa	99kDa* 85kDa* 81kDa* 79kDa* 66kDa 56kDa	98kDa* 83kDa 81kDa** 66kDa 55kDa	98kDa* 84kDa 81kDa** 79kDa* 64kDa 59kDa 57kDa*	84kDa* 82kDa** 78kDa* 62kDa*	84kDa* 82kDa* 79kDa* 61kDa*
Menor que 45kDa	36kDa	34kDa	36kDa	33kDa**	32kDa**

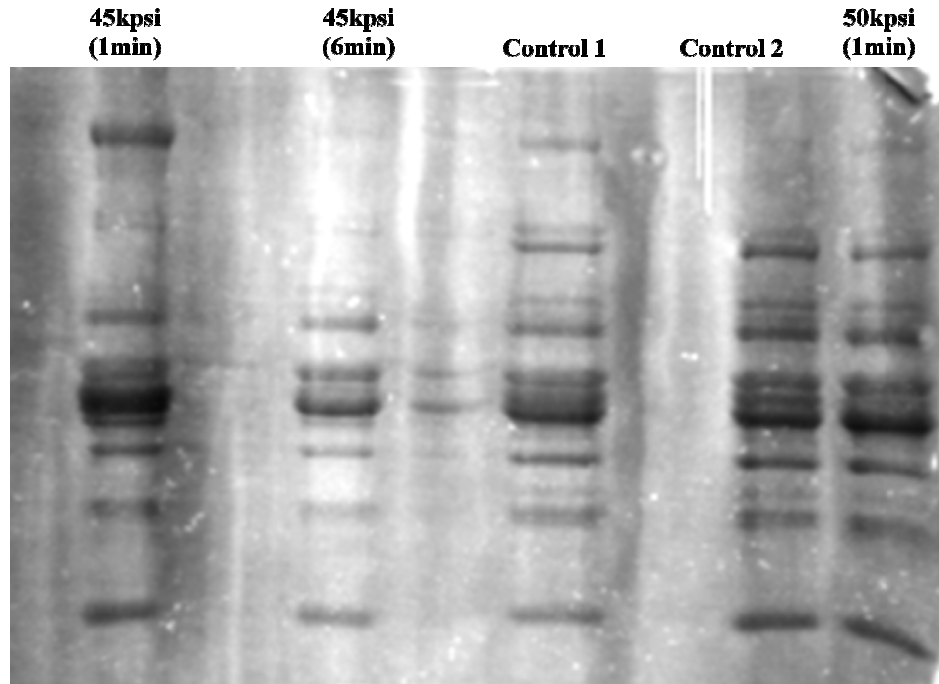


Figura 10. Gel electroforético de Acrilamida. Tiempo final.

En la Tabla 9 se observa que a tiempo final, el perfil de pesos moleculares de las proteínas de todas las muestras se encuentra distribuido en los pesos moleculares de mediano y alto rango. Comparando los pesos moleculares del tiempo inicial con el tiempo final se observa que hay una mayor concentración de proteínas en las áreas de pesos moleculares más altos, implicando estas diferencias a un proceso de desnaturalización que sufren las proteínas en el almacenamiento bajo congelación, formándose estructuras de mayor peso molecular. Es por eso que las bandas menores a 45kDa casi desaparecieron en el gel del tiempo final.

Además la muestra de 45kpsi 1minuto presentó un incremento en las bandas de pesos moleculares altos, con mayor intensidad que su control, lo que está indicando que durante su almacenamiento la formación de aglomerados de pesos moleculares altos se vio más favorecida, que en el caso de la que fue sometida a 45kpsi 6minutos y su respectivo control. La muestra de 45kpsi 6 minutos, presenta al igual que en el tiempo inicial (figura 9 y 10) una menor

cantidad de bandas en el gel, con respecto al control, indicando que aunque durante el almacenamiento si se generaron estructuras de mayor peso molecular, siguen habiendo algunas que se salieron del gel por su bajo peso molecular, las cuales no lograron integrarse a otras estructuras y así formar otras de mayor peso molecular.

Para el caso de la muestra de 50kpsi sometida a un minuto de presión, presentó el mismo comportamiento que el control de su lote, por lo que el proceso de congelación generó el mismo efecto desnaturalizante en ambas muestras. En el gel a tiempo cero, se apreció una diferencia de concentración de proteínas entre la muestra de 50kpsi y su control, pero durante el almacenamiento las proteínas que se habían salido durante la corrida, se integraron con otras estructuras formando pesos moleculares mayores.

4.6. Evaluación del efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la carga microbiana presente en la carne.

La sensibilidad de las bacterias a los procesos de presurización, dependerá de la presión y tiempos empleados, indicando que esa inactivación se debe primordialmente a los daños que sufre la membrana, además de los cambios morfológicos y bioquímicos, inducidos por la presión sobre la célula^{35,36}.

En el gráfico 4 se puede observar que la APH tiene un impacto importante en la inactivación de los microorganismos. Las muestras de 45kpsi 1min, 45kpsi 6minutos y 50kpsi 1minuto, presentaron un menor número de Unidades formadoras de colonias por gramo de muestra, se habla de un 61.14%, 71.16% y un 51.61% respectivamente. Se observa una mayor inactivación de microorganismos cuando se manejan tiempo de exposición más prolongados, que mediante la aplicación de presiones más elevadas.

El crecimiento microbiano es muy lento debido a que el proceso de congelación inmoviliza a los microorganismos, así como sus nutrientes, por lo que durante la congelación, éstos quedarán en forma inactiva, hasta volver a tener las condiciones aptas para su crecimiento. El poco crecimiento se da principalmente en la etapa de descongelación de la muestra, la cual duraba en promedio para cada determinación 30 minutos, además la realización de la primera etapa de la prueba requería 30 minutos más, para posteriormente ser incubadas las muestras y generar así el formazan que sería cuantificado.

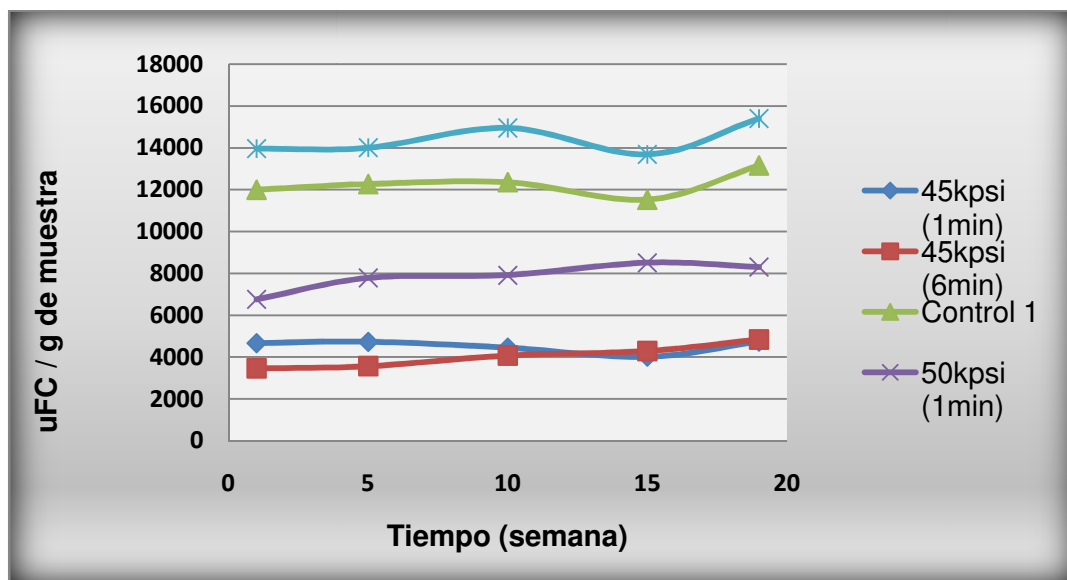


Gráfico 4. Evaluación del crecimiento de los microorganismos durante el almacenamiento a -18°C.

El límite máximo aceptado de mesófilos aerobios de carne según la NOM-034-SSA1-1993, es de 5 000 000 UFC/g de carne, por lo que las muestras presentan una carga microbiana muy baja, como es el caso de la muestra control 2, que presentó mayor carga en comparación con las demás muestras tratadas al tiempo final, no sobrepasando los 15000 UFC/g de muestra. La carne se considera aceptable aún para consumo.

CONCLUSIONES

El color de la carne que se obtiene después de someter las muestras a la presión de 45kpsi 1min, 45kpsi 6min y 50kpsi, es aceptable, siendo muy similar a muestras frescas. Presiones del orden de 70kpsi durante 1minuto, generan cambios notables en la coloración de la carne, con tonalidades amarillas, siendo desagradable para el consumidor, el cual demanda productos similares a los frescos.

De los resultados obtenidos, se puede concluir que el comportamiento de la formación de peróxidos, compuestos carbonílicos y la liberación de ácidos grasos libres, es similar entre muestras presurizadas y muestras sometidas únicamente a un proceso de congelación, empacadas a vacío, en donde no se afecta de manera significativa la oxidación de los lípidos. Las Altas Presiones Hidrostáticas del orden de 45kpsi y 50kpsi a tiempos menores de 6 minutos, no generan algún efecto sobre la oxidación de los lípidos en muestras que después de ser presurizadas se almacenan a -18°C durante un monitoreo de 19 semanas, en un empaque a vacío.

Las altas presiones hidrostáticas provocan la disociación de macroestructuras en subunidades de menor peso molecular. El almacenamiento de las muestras bajo un proceso de congelación a -18°C , favorece la formación de estructuras de alto peso molecular.

La disminución de la proteína soluble durante el monitoreo fue baja, siendo relativamente similar entre las muestras presurizadas y sus controles. Para ver un mayor efecto de las APH, sobre la disminución de la proteína soluble, es estudios posteriores se podrían manejar presiones más elevadas (>70 kpsi) por tiempos más prolongados.

Los microorganismos sufren inactivación por las APH. Presiones de 45kpsi 1min, 45kpsi 6 minutos y 50kpsi 1 minuto, son capaces de desactivar

microorganismos, reduciendo su carga de un 50 a un 70%. Se observó un efecto más agresivo sobre los microorganismos cuando se elevó el tiempo de exposición en comparación con la aplicación de mayor presión.

La principal ventaja que presentan las APH-Congelación, en comparación con el proceso tradicional de Congelación, es el de inactivar a los microorganismos presentes en la matriz cárnica, lo cual garantiza una mayor vida de anaquel, retrasando el deterioro de los alimentos.

SUGERENCIAS

Para esclarecer el efecto de la APH sobre los macrocomponentes de la carne es indispensable para estudios posteriores, manejar tiempos más prolongados de almacenamiento, permitiendo ver cuál de los dos procesos, si alta Presión-Congelación vs Congelación, permitirá brindar mayor calidad al alimento y una mayor vida de anaquel.

Se recomienda en estudios posteriores evaluar tiempos más elevados de exposición bajo la alta presión (no mayor a 70Kpsi, por el daño en apariencia de la carne bajo esta condición), para determinar si efectivamente el tiempo de exposición genera mayor daño a los microorganismos, que manejar una presión más elevada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ramírez Orejel Juan Carlos 2009, *Estudio para evaluar el efecto de la congelación sobre la reactividad y conformación de las fracciones proteínicas de diferentes músculos de bovino a través de calorimetría de barrido diferencial*. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM.
2. Diaz Argomedo Gabriela 1999, *Evaluación del deterioro químico de lípidos de carne de res conservada en congelación*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
3. Prandl O., Fischer A., Hands-Jurden T. (1999), *Tecnología e higiene de la carne*, ed. Acribia, Zaragoza.
4. Fennema Owen R. (1993), *Química de los alimentos*, segunda edición, Editorial Acribia S.A de C.V, Zaragoza España.
5. Labuza T.P., Tsuyuki H., Karel M. (1971), *Kinetics o linoleate oxidation in model systems*, J. Am. Oil. Chem. Soc. 46, 409-416.
6. Price J.F., Schweigert B.S. (2001) *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*, 2ª edición, ed. Acribia, Zaragoza España.
7. Soto López Ana (2008), *Efecto de la interacción de transglutaminasa y diferentes tipos de carrageninas sobre las características de productos reestructurados de res*, Universidad Nacional Autónoma de México, pp 14-20. Tesis de maestría.
8. Wheatley A. (2000). *Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation*. Trends in Analytical Chemistry. 19,18.
9. Madhavi D., Deshpande S. and Salunkhe (1996) *Food antioxidants, technological, toxicological, and health perspectives*. Marcel Dekker, Inc.
10. Khayat A. y Schwall D. (1983). *Lipid Oxidation in Seafood*. Food Technol. 130-140.
11. Balazero (1998), *Deterioro químico de los lípidos en carne de cerdo y pollo en congelación*. Fac. Química. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis de maestría.

12. Graciani Constante E. (2006), *Aceites y Grasas: Composición y propiedades*, Ed. Amv/mundi-prensa, 1ª edición.
13. Labuza T (1980), *The effect of water activity on reactions kinetics of food deterioration*. Food Technol. 34, 36-41.
14. Alasnier C Meynier A., Viau M. and Gandemer G. (2000), *Hydrolytic and oxidative changes in the lipids of chicken breast and muscles during refrigerated storage*, J. Food Sci. 65, 9-14.
15. Decker A.E. and Hultin O.H. (1990), *Display, Packaging, and Meat Block location Effects on Color and Lipid Oxidation of Frozen Lean Ground Beef*. J. Food Sci. 58, 1219-1223.
16. Pearson. D (1993), *Técnicas de Laboratorio para el análisis de alimentos*, ed. Acribia, Zaragoza España.
17. Marc E. G. Hendrickx, Dietrich Knorr, *Ultra High Pressure Treatments of Foods*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
18. AOAC (1990), *Official Methods of Analysis*, 15th. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, V.A. U.S.A. sec 965.33.
19. Mehlenbacher V.C. (1960), *The Analisis of Fats and Oils*. Garrad Press, Champaing, IL.
20. Gray J. I. (1978), *Measurement of Lipid Oxidation: A Review*. J.A.O.C.S. 55,539-546.
21. Ernesto Moreno M. (1984), *Análisis físico y biológico de semillas agrícolas*, Instituto de Biología UNAM, 169.
22. Imagen obtenida del sitio de la red www.anatomiahumana.ucv.cl/efi/modulo11.html
23. Ledward D.A., Johnston D.E., Earnshaw R.G., Hasting A.P.M. (1995), *High Pressure Procesing of Foods*, Nottingham University Press, Britain.
24. Kirk R.S., Sawyer, R y Egan H (1996). *Composición y análisis de Alimentos de Pearson*, Compañía editorial Continental S.A de C.V, segunda edición, México.
25. Bligh E. and Dyer W. (1959), *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J. Biochem and Physiol.

26. Nielsen S.; *Food Analysis* (1998), Second Edition, An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland.
27. Hawley S. A. (1979), *Reversible Pressure-Temperature Denaturation of Chymotrypsinogen*, Jefferson Physical Laboratories, Harvard University, Cambridge, Massachusetts.
28. Cheah P.B. & Ledward D. A. (1995), *High-pressure effects on lipid oxidation*, JAOCS, 72(9), 1059-1063.
29. Herrero A.M. y Romero de Avila M.D. (1996), *Innovaciones en el proceso de alimentos: Tecnologías no térmicas*, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. Madrid.
30. Madrigal Galan, Berenice (2001), *Influencia de la piel de pollo en el deterioro químico de los lípidos*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
31. Fernández Silva Ana Elisa (2007), *Evaluación de los cambios físicos de carne de bovino congelada-descongelada y almacenada en refrigeración*, Facultad de estudios superiores Cuautitlán, UNAM.
32. Téllez Luis S.J., Ramírez J.A., Pérez Lamela C., Vázquez M., Simal Gándara J. (2001), *Aplicación de la Alta Presión Hidrostática en la conservación de los alimentos*, Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos, México.
33. Cheftel J.C. (1992), *Effect of high hydrostatic pressure on food constituents: An overview High Pressure and Biotechnology*, C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans , & P. Masson (ed), 195-209. Editions John Libbey Eurotext, Montrouge.
34. Cheftel J.C.& Cullioli J. (1995), *Effect of high pressure on meat: a review*. Meat Science, 3: 211-236.
35. Cheftel J.C. (1995), *Review: High pressure, microbial inactivation and food preservation*, Food Science and Technology international, 1: 75-90.

36. Sangronis E., Pothakamury U., Ramos A.M. & Barbosa-Cánovas G.V. (1997), *La presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de alimento*, Alimentaria, 35: 33-43.
37. Gekko K. (1992), *Effects of pressure on sol-gel transition of food macromolecule*, High Pressure and Biotechnology, Colloque INSERM Vol.244, p-15-113 (eds) C. Blany, R. Hayashi, K. Heremans & P. Masson, John Libbey Eurotex/Les editions ISERM, Montrouge, Francia.
38. Hite B. H. (1899) *The effect of pressure on the preservation of milk*. W. Va Agric. Exp. Sta. Builedin, 58, 15-35.
39. Hoover D.C. (1993) *Pressure effects on biological systems*. Food Technology, 47, 150-155.
40. Susuki A., Kim K., Honma N., Ikeuchi Y. and Saito M. (1992) *Accceleration of meat conditioning by hight presssure treatment*. In High Pressure and Biotecnology, pp 219-227 Edited by C. Balny R. Hayashi K. Heremans and P. Masson Montrouge: INSERM/ John Libbey Eurotext Ltd.
41. Hayashi R. and Hayashinda A (1989) *Increased amylase digestibility of pressure treated stach*. Agric. Biot. Chem. 53, 2543-2544.
42. Edgan H., Kirk R. y Sawyer R. (1998), *Análisis químico de los alimentos de Pearson*, ed. Continental, México.
43. Bridgman P.W. (1914) *The coagulation of albumen by pressure*. Journal Biological Chemistry, 19, 511-512.
44. Bridgman P.W. (1940) *Compression of 46 Substances to 50000 kg/cm²*. Proc. Am. Acad. Arts.
45. Bridgman P.W. (1958) *The Physics of High Pressure*. London: G. Bell. And Son Ltd.
46. Bridgman P.W. (1964) *Studies in Large Plastics Flow and Fracture*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
47. McFarland I. (1973) *A New Fabrication Method for Large High Pressure Vessels*. Proc 2nd International Conference on Pressure Vessel Technology, 1151-1158.
48. Poulter T. C. (1951) *High Pressure Apparatus*. US. Patent No. 2554499.

49. Mozhaev V. V., Heremans K., Frank J., Masson P. & Balny C. (1996) *High pressure effect on protein structure and function*. Proteins: Struct. Funct. Genet. 24, 81-91.
50. Horie Y., Kimura K., Ida M., Yoshida Y. & Ohki K. (1992). *Identification and pressure sterilization of candida strain resistant to high pressure*. Nippon Nogeikagaku Kaishi.
51. Kimura K. Ida M., Yoshida Y., Ohki K. Fukumoto T. & Sakui N. (1994) *Comparison of keeping quality between pressure-processed jam and heat-processed jam: changes in flavour component, hue, and nutrients during storage*. Biosci, Biotechnol, Biochem.
52. Hayashi R. (1990) *Application of high pressure to food processing and preservation: Philosophie and developpment*. Engineering and Food. W.E.L. Spiess, H. Schubert (eds.), Elsevier Applied Science, London.
53. Ohmiya K., Kajino T., Shimizu S. & Gekko K. (1989) Effect of pressure on the association states of enzymes treated caseins. Agricultural Biology and Chemistry, 53: 1-7.
54. Lamy Daoudi (2004) *Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre el Gazpacho y zumo de uva*. Tesis de Licenciatura. Univerdidad Autónoma de Barcelona.
55. Wely B. Floriano, Marco A.C. Nascimento, Gilberto B. Domont & William A. Goodard. *Effects of pressure on the structure of metmyoglobin: Molecular dynamics predictions for pressure unfolding through a molten globule intermediate*. Universidad Federal de Rio de Janeiro, California Institute of Technology, 1998.
56. AOCS Cd 8-53 (97) y AOCS Cd 8b-90 (97) *Índice máximo de peróxidos*.
57. Mercè Raventòs Santamaria. *Industria alimentaria Tecnologías emergentes*. Ediciones UPC. Barcelona, 2005.
58. A. Cromer, *Física para las Ciencias de la Vida*, Ed. Reverté, Barcelona, 1996.

59. (21 de Septiembre de 2010), Recuperado el 24 de Mayo de 2011, de <http://wonalixia-bittersweet.blogspot.com/2010/09/carnes-composicion-quimica-fibras.html>.

ANEXO

➤ Tablas de resultados

Extracción de grasa: Bligh y Dyer

Lote	Repeticiones	g grasa /100 g de muestra
1	1	4.52
	2	4.35
	3	4.21
	Promedio	4.36
	D.S.	0.16
2	1	1.87
	2	2.02
	3	1.98
	Promedio	1.96
	D.S.	0.08

Índice de Peróxidos: Método colorimétrico

Tiempo de almacenamiento (semanas)							
Tratamiento	mEq. Peróxidos / kg de grasa						
	Repetición	1	4	7	11	15	19
45kpsi (1min)	1	0.0023	0.004	0.0016	0.0017	0.0042	0.0043
	2	0.0034	0.0039	0.0016	0.002	0.004	0.0045
	3	0.0023	0.0041	0.0017	0.0018	0.0039	0.0047
	Promedio	0.0027	0.004	0.0016	0.0019	0.004	0.0045
	D.S.	0.0005	0.0001	0	0.0001	0.0002	0.0002
45kpsi (6min)	1	0.0029	0.0035	0.002	0.0019	0.0046	0.0049
	2	0.0024	0.0039	0.002	0.0018	0.0049	0.0048
	3	0.0012	0.0039	0.0021	0.0018	0.0045	0.0047
	Promedio	0.0022	0.0037	0.0001	0.0018	0.0047	0.0048
	D.S.	0.0007	0.0002	0.0031	0	0.0002	0.0001
Control 1	1	0.0031	0.0038	0.003	0.0031	0.0043	0.0044
	2	0.0029	0.0038	0.003	0.003	0.0042	0.0044
	3	0.003	0.0041	0.003	0.0029	0.0045	0.0047
	Promedio	0.003	0.0039	0.003	0.003	0.0043	0.0045
	D.S.	0.0001	0.0001	0	0.0001	0.0001	0.0002
50kpsi (1min)	1	0.0025	0.0055	0.0034	0.0033	0.0051	0.0049
	2	0.0024	0.0048	0.0035	0.0035	0.0046	0.0049
	3	0.0026	0.0056	0.0036	0.0036	0.0047	0.0051
	Promedio	0.0025	0.0053	0.0035	0.0034	0.0048	0.005
	D.S.	0.0001	0.0003	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001
Control 2	1	0.0028	0.0053	0.0022	0.0022	0.0044	0.0048
	2	0.0028	0.0058	0.0022	0.0023	0.0045	0.0047
	3	0.0028	0.0062	0.0022	0.0022	0.0046	0.0045
	Promedio	0.0028	0.0058	0.0023	0.0023	0.0045	0.0047
	D.S.	0	0.0003	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002

Índice de Kreis

Tiempo de almacenamiento en congelación a -18 °C (semanas)							
Tratamiento	Abs /g de muestra						
	Repetición	1	3	8	11	15	19
45kpsi (1min)	1	0.2701	0.2532	0.201	0.2379	0.2321	0.272
	2	0.261	0.239	0.2079	0.2159	0.2349	0.2766
	3	0.265	0.26	0.1963	0.2395	0.2346	0.2789
	Promedio	0.2654	0.2507	0.2017	0.2311	0.2339	0.272
	D.S.	0.0046	0.0107	0.0058	0.0132	0.0015	0.01
45kpsi (6min)	1	0.1792	0.2709	0.1537	0.1611	0.1861	0.1946
	2	0.2011	0.2895	0.1476	0.1514	0.1948	0.2167
	3	0.1927	0.3001	0.1524	0.1511	0.1816	0.2069
	Promedio	0.191	0.2868	0.1512	0.1545	0.1875	0.2061
	D.S.	0.011	0.0148	0.0032	0.0057	0.0067	0.0111
Control 1	1	0.1965	0.3681	0.2489	0.0772	0.1025	0.1041
	2	0.1961	0.3744	0.2638	0.0764	0.0947	0.1022
	3	0.1885	0.3925	0.2637	0.0763	0.0953	0.1123
	Promedio	0.1937	0.3783	0.2588	0.0767	0.0975	0.1062
	D.S.	0.0045	0.0126	0.0086	0.0005	0.0043	0.0054
50kpsi (1min)	1	0.0508	0.1656	0.107	0.1219	0.107	0.1276
	2	0.0582	0.1658	0.1105	0.112	0.1184	0.1234
	3	0.0582	0.1627	0.1099	0.1155	0.1099	0.1163
	Promedio	0.0557	0.1656	0.1091	0.1165	0.1118	0.1224
	D.S.	0.0043	0.0029	0.0019	0.005	0.0059	0.0057
Control 2	1	0.0595	0.0373	0.0416	0.0907	0.0637	0.0844
	2	0.0632	0.0403	0.0447	0.0956	0.0621	0.0761
	3	0.0623	0.0371	0.0403	0.1011	0.0683	0.0796
	Promedio	0.0617	0.0382	0.0422	0.0958	0.0647	0.08
	D.S.	0.0019	0.0018	0.0022	0.0052	0.0032	0.0042

Acidez titulable

Tiempo de almacenamiento en congelación a -18 °C (semanas)					
Tratamiento	mEq. / 100g de grasa				
	Repetición	3	8	11	19
45kpsi (1min)	1	8.9024	8.4399	5.6962	4.4126
	2	9.2893	9.2576	5.4167	4.3968
	3	9.1036	8.9358	5.9317	4.4811
	Promedio	9.0984	8.8778	5.6816	4.4302
	D.S.	0.1935	0.4119	0.2578	0.0448
45kpsi (6min)	1	8.1091	7.3776	4.1563	3.8186
	2	8.1787	7.2394	4.1702	3.8249
	3	8.205	7.3162	4.1183	3.8558
	Promedio	8.1642	7.3111	4.1483	3.8331
	D.S.	0.0495	0.0692	0.0269	0.0199
Control 1	1	10.5495	9.9143	6.8359	6.2262
	2	10.8321	10.1947	6.7958	6.3429
	3	10.5501	10.2757	6.7686	6.3632
	Promedio	10.6439	10.1282	6.8001	6.3108
	D.S.	0.163	0.1897	0.0338	0.0739
50kpsi (1min)	1	3.0671	3.546	2.6563	2.1269
	2	2.856	3.4547	2.6113	2.2986
	3	2.8319	3.3906	2.5797	2.0893
	Promedio	2.9183	3.4638	2.6158	2.1716
	D.S.	0.1294	0.0781	0.0385	0.1116
Control 2	1	3.2221	3.8099	2.94	2.3621
	2	3.2495	3.6768	2.9033	2.1403
	3	3.3463	3.9681	2.9552	2.4645
	Promedio	3.2726	3.8183	2.9328	2.3223
	D.S.	0.0652	0.1459	0.0267	0.1657

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento en congelación a -18 °C (semanas)								
	mg de proteína / g de muestra								
		1	3	6	8	10	13	16	19
45kpsi (1min)	1	4.2453	4.0176	3.6537	3.7153	3.423	3.5133	3.3368	3.2292
	2	3.8291	4.0471	3.7453	3.6046	3.7693	3.282	3.3503	3.25
	3	4.162	3.9	3.9863	3.8038	3.4681	3.1535	3.3695	3.3333
	promedio	4.0788	3.9882	3.7951	3.7079	3.5535	3.3163	3.3522	3.2708
	D.S.	0.2202	0.0778	0.1718	0.0998	0.1883	0.1823	0.0165	0.0551
45kpsi (6min)	1	4.7758	3.75	3.765	3.6985	3.3754	3.3898	3.0662	3.2079
	2	4.5137	3.6934	3.994	3.3685	3.3149	3.187	3.1502	3.0684
	3	4.2516	3.6086	3.8108	3.3195	3.4771	3.0348	3.2342	3.1083
	promedio	4.5137	3.684	3.8566	3.4507	3.3891	3.2039	3.1502	3.1282
	D.S.	0.2621	0.0712	0.1212	0.2071	0.0819	0.1781	0.084	0.0718
Control 1	1	5.0622	4.5039	4.2331	3.951	4.126	3.9987	3.9036	2.95
	2	4.4118	4.5336	4.3921	4.1981	4.1551	4.2507	3.9663	3.0721
	3	5.345	4.6227	4.5737	4.4227	3.7986	4.0995	4.0289	3.1738
	promedio	4.9397	4.5534	4.3996	4.1906	4.0265	4.1163	3.9663	3.0653
	D.S.	0.4785	0.0618	0.1704	0.2359	0.198	0.1268	0.0626	0.1121
50kpsi (1min)	1	5.2348	5.3369	4.9755	4.8508	4.6531	4.0423	3.3116	3.442
	2	5.4236	4.9091	4.6738	4.6685	4.4625	3.6748	3.056	3.6913
	3	5.4506	4.8556	4.9523	4.6001	4.8168	4.1115	3.1693	3.5427
	promedio	5.3697	5.0339	4.8672	4.7065	4.6441	3.9429	3.179	3.5587
	D.S.	0.1176	0.2638	0.1679	0.1296	0.1773	0.2347	0.128	0.3356
Control 2	1	5.1753	5.1357	4.9879	5.2168	4.8927	4.3177	4.1996	0.1254
	2	4.7794	4.9378	4.8108	4.8243	4.7357	4.2194	4.0569	3.8873
	3	4.8077	5.0509	4.6908	4.755	4.9097	4.6053	4.0331	3.6038
	promedio	4.9208	5.0415	4.8268	4.932	4.846	4.3808	4.0965	3.8468
	D.S.	0.2209	0.0993	0.1447	0.2491	0.0959	0.2005	0.09	0.2255

➤ **Definiciones**

PRESIÓN HIDROSTÁTICA

Se le llama presión hidrostática a la presión que ejerce un líquido sobre un cuerpo que se encuentra en el seno del líquido; se debe al peso de la columna de ese líquido sobre el cuerpo. El cálculo de esta presión corresponde a una presión manométrica, ya que en realidad la que se ejerce, es la suma de la Presión Atmosférica que actúa sobre la superficie del líquido más la Presión Hidrostática.

En la fórmula de esta presión, **P_o** es la presión atmosférica, **ρ** es la densidad del líquido; **g** la gravedad y **h** la profundidad del punto considerado bajo la superficie libre:

$$P = P_o + \rho g h$$

PRINCIPIO DE PASCAL

Este principio establece que la presión que se ejerce en un líquido contenido en un recipiente, se transmite con la misma intensidad en todas direcciones y sentidos.

$$P_h = P_o + (F_g / A)$$

➤ **Técnicas de evaluación del proceso de oxidación lipídica**

Con la finalidad de evaluar el avance del deterioro de los lípidos, se han desarrollado técnicas tanto físicas como químicas, siendo necesario tomar en cuenta las diferentes etapas en las que se puede encontrar el proceso oxidativo, así como la gran diversidad de compuestos formados. La mayoría de ellas se basan en en la cuantificación de los productos primarios o secundarios de la oxidación, pero también se pueden hacer otras determinaciones como son la composición de los ácidos grasos o consumo de oxígeno.

Ninguna prueba individual puede medir todas las reacciones de oxidación de una sola vez, por lo que es importante llevar a cabo diferentes técnicas a la par para poder determinar el avance de la rancidez oxidativa.

Indice de Peróxidos

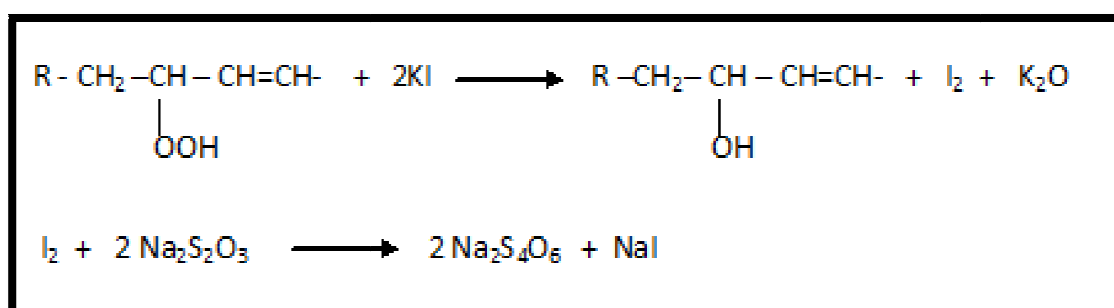
Los productos primarios de la oxidación lipídica son los peróxidos, por lo que resulta importante llevar a cabo la medición de la concentración de éstos. Sin embargo, hay que recordar que estos compuestos se descomponen muy fácilmente para dar lugar a productos secundarios. Por lo que es necesario tomar en cuenta que durante el almacenamiento la formación de peróxidos es lenta, en la etapa de inducción la formación de éstos puede variar desde semanas hasta meses dependiendo de la composición de la grasa y de las condiciones de almacenamiento, hasta llegar a alcanzar un valor máximo, con la posterior caída de concentración de los peróxidos por la descomposición de éstos.

El método más común y recomendado por la AOAC es el método volumétrico.

Método volumétrico

El más común de los métodos para medir el contenido de hidroperóxidos es el de "valor peróxido". Este es el método emitido por la American Oil Chemist's Society y la Association for Official Analytical Chemists.¹⁸ El resultado de este método se expresa como miliequivalentes de peróxido por kilogramo de grasa.

Este está basado en la medición de yodo liberado por la reacción de yoduro de potasio con los peróxidos. El yodo es titulado con una solución de tiosulfato de sodio. El esquema de las reacciones se presenta a continuación.



Debido a que se ha encontrado que una concentración alta de ácidos favorece la oxidación de lípidos, se sugiere que este ensayo se haga en un medio con concentración ácida baja.

Se ha estudiado que las dos principales fuentes de error en este método son:

- La absorción de yodo en los enlaces insaturados presentes en los ácidos grasos.
- La liberación de yodo del yoduro de potasio por la presencia de oxígeno en la solución a ser titulada. Esto provoca un aumento en el valor de peróxidos encontrados.¹⁹

Este método se puede utilizar para determinar grados de oxidación en las grasas y aceites más comunes. Sin embargo, este método es altamente empírico y cualquier variación en el procedimiento ocasionará una variación importante en los resultados. Otro problema que ha encontrado este método es que no es posible la medición de bajos valores de peróxidos debido a la titulación del yodo. Por medio de este método se pueden determinar valores de peróxidos entre 0.06 y 20 miliequivalentes de peróxidos por kilogramo de grasa de manera confiable.²⁰

Método colorimétrico

Lips sugirió (1943) para la cuantificación de hidroperóxidos un método colorimétrico basado en la oxidación del ion ferroso a ion férrico. Este se determina como Tiocianato Férrico. Los valores de peróxidos calculados por este método son considerablemente mayores que los calculados por el método volumétrico.²⁰

El método colorimétrico presenta una reproducibilidad excelente, requiriendo además una menor cantidad de muestra. Estas ventajas hacen suponer que el potencial de este método para la microescala es por mucho mayor que el del método de la AOAC.

Este método se basa en la reacción de los peróxidos con el hierro provocando la oxidación de este último y que ya oxidado reacciona con el tiocianato de amonio para formar un complejo colorido. La intensidad de la coloración, medida en un espectrofotómetro uv-visible, es proporcional a la concentración del complejo colorido, y así mismo a la concentración de peróxidos.

La Reacción que se lleva a cabo se presenta a continuación.



Productos secundarios

Para completar el estudio de la oxidación, se requiere un método complementario, que determine alguno de los productos de reacción secundarias en la autooxidación.

Indice de Kreis

El índice de Kreis es uno de los primeros utilizados comercialmente para determinar la oxidación de las grasas. Se fundamenta en la reacción de la floroglucina reacciona en medio ácido con las grasas oxidadas, dando una coloración roja, cuya intensidad aumenta con el deterioro, debido probablemente a la presencia de el aldehído malónico o del aldehído epidrínico.

Liberación de ácidos grasos. Ácidez titulable

La acidez titulable es una medida del contenido de ácidos grasos o una mezcla de ácidos grasos. Normalmente se mide por titulación directa en la disolución y con indicador visual.

Solubilidad de Proteínas

La solubilidad de proteínas se ve afectada por la formación de complejos de proteínas desnaturizados de alto peso molecular, los cuales se unen por puentes y sitios específicos en toda la molécula.

Disminución de la proteína soluble. Lowry

La técnica se fundamenta en que los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos tienen un color azul claro y además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los

residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción.

El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

La reducción en medio básico del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, ocurre gracias a que el cobre actúa como catalizador. El reactivo de Folin-Ciocalteu de color amarillo al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

Electroforesis en gel de acrilamida

Esta técnica es útil para conocer el perfil de las proteínas presentes. En esta técnica se desnaturalizan las proteínas y se separan de acuerdo con su masa molecular. Es posible conocer el peso molecular de las proteínas presentes.

Carga microbiana. Prueba de Tetrazolio

Esta prueba se basa en la reacción bioquímica de ciertas enzimas de las células vivas con la sal del tetrazolio, la cual consiste en la reducción del tetrazolio, formándose un compuesto rojo llamado formazan. Una coloración roja intensa es indicadora de la presencia de microorganismo vivos, una coloración rosa pálida es indicativa de la poca viabilidad de los microorganismo presentes.²¹
