



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS CICLOS DE
CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN EN CARNE DE
RES MEDIANTE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS Y
ELECTROFORÉTICAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA EN ALIMENTOS

Presenta:

IDALIA GUTIÉRREZ FLORES

ASESORES: DRA. ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS

I.A. JONATHAN CORIA HERNÁNDEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO.

2014



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación de los efectos de los ciclos de congelación-descongelación en carne de res mediante técnicas histológicas y electroforéticas

Que presenta la pasante: Idalia Gutiérrez Flores
Con número de cuenta: 407077443 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Octubre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Adriana Llorente Bousquets	
VOCAL	M. en C. Rosalía Meléndez Pérez	
SECRETARIO	Dra. Carolina Moreno Ramos	
1er. SUPLENTE	M. en C. Crisoforo Mercado Márquez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Juana Gutiérrez Bautista	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/mmgm



Esta tesis forma parte de las cátedras impartidas en el Taller Multidisciplinario de Ingeniería en Alimentos: Procesos Tecnológicos de Productos Cárnicos, del plan de estudios 2004.

El trabajo fue realizado en el Laboratorio 7 de Bioconservación, ubicado en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la F.E.S. Cuautitlán.

Agradezco al proyecto PAPIIT-DGAPA IT201312-3

“Aplicación de alternativas de bioconservación y conservación para mejorar la calidad de la carne y los productos cárnicos”.



AGRADECIMIENTOS

“Si consigo ver más lejos es porque he conseguido auparme a hombros de gigantes”

Isaac Newton

A la máxima casa de estudios, mi casa, **Universidad Nacional Autónoma de México**, por medio de la F.E.S Cuautitlán, por haber abierto sus puertas para guiarme, formarme como una profesional y orgullosa Ingeniera en Alimentos.

A la **Dra. Adriana Llorente Bousquets**, por el apoyo brindado, tiempo y paciencia, por depositar en mí la semilla del amor a la investigación y la ciencia, por convertir este sueño en realidad y poder ver materializados tantos de mis anhelos y esperanzas.

A la **Profesora Ana María de la Cruz**, por sus consejos, su apoyo, sus críticas constructivas y sus preguntas que empujaron a un excelente desarrollo de proyecto, usted siempre tiene una sonrisa y los mejores deseos para mi persona, se lo agradezco de todo corazón.

Al **Ingeniero en Alimentos Jonathan Coria Hernández**, más que mi asesor un gran amigo, gracias por tu tiempo, paciencia, esfuerzo y dedicación para hacer de este proyecto el mejor, te admiro, eres un ser humano maravilloso lleno de virtudes hermosas, y espero que algún día te veas como yo te veo, un gran ser lleno de sabiduría y alegría, gracias por tu apoyo y tus consejos, te quiero.

Al **M. en C. German Garrido Fariña**, por permitir el acceso al laboratorio de histología, por el material prestado y apoyo.

Al jurado de esta tesis, por sus aportaciones y atenciones.

M. en C. Rosalía Meléndez Pérez

Dra. Carolina Moreno Ramos

M. en C. Crisóforo Mercado Márquez

M. en C. Juana Gutiérrez Bautista

A todos los profesores que forjaron el camino para mi desarrollo como profesionista, gracias por todo el conocimiento compartido; **M. en A. Jorge López Pérez, I. A. Laura Cortázar Figueroa, I. A. Frida Cornejo, IBQ. Saturnino Maya, I. A. Zaira Guadarrama, Dra. María Eugenia Ramírez, José Luis Buenrostro, M. en C. Leticia Zúñiga Gómez.**

Por mi raza hablará el espíritu



DEDICATORIAS

“Voy con las riendas tensas y refrenando el vuelo, porque no es lo que importa llegar pronto ni solo, sino llegar con todos y a tiempo”

León Felipe

A mis abuelos **Catalina García†** y **Tranquilino Gutiérrez †**, gracias por regalarme la mejor infancia, gracias por brindarme su tiempo, aprendí muchísimas cosas a su lado, gracias por enseñarme que no se necesita oro para ser feliz y que no vale aferrarse a lo innecesario.

A mi padre **Fernando Gutiérrez**, no tengo manera de pagarte todo lo que has hecho por mí, gracias por tu apoyo incondicional en mis infinitas locuras de querer devorar el mundo, eres el mejor padre que pude haber tenido y que tengo, gracias por tu confianza, me has enseñado tantas cosas, pero lo que más te agradezco es haberme enseñado con el ejemplo que tengo que luchar por lo que quiero, que solo con trabajo duro se consiguen las cosas importantes de la vida y que no vale rendirse nunca, si caemos una vez nos levantamos dos, te amo.

A mi madre **Ma. Guadalupe Flores**, mi compañera incondicional, eres la mejor madre que cualquier persona podría tener, gracias por tu apoyo, tus consejos, tus palabras de aliento, por tus jalones de orejas siempre a tiempo, por tu infinita paciencia, gracias por ser mi amiga y por apoyarme en este sueño maravilloso, no tengo como pagarte todo lo que haces por mí y todo lo que me has enseñado, principalmente que la familia es lo más importante y tenemos que hacer lo imposible para mantenernos siempre unidos, te amo.

A mis hermanos **Perla Ivonne** y **Fernando Gutiérrez**, gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, por su apoyo, por brindarme algo de lo que han aprendido, por sus consejos, me han dado lecciones de vida invaluable. Los amo.

A mis padrinos **Hugo Gutiérrez** y **Claudia Rosales**, gracias por estar siempre con nosotros, por su apoyo, por estar ahí cuando más los necesite, por sus consejos, por todos los momentos compartidos, son excelentes personas y un ejemplo a seguir, mil gracias.

A mis ángeles guardianes y hermanos nacidos en otra familia, **Noe Arenas**, **Angeles Escobar** y **Yadira Zamora**, saben hoy estoy aquí por ustedes, no tengo como pagarles todo lo que han hecho por mí, gracias por los consejos, por las risas y ocurrencias, por su apoyo, por los regaños, por todo lo aprendido, por no dejarme abandonar el terreno de juego, por estar siempre conmigo en las buenas, malas y en las peores, por todas las aventuras vividas y las que nos faltan, por abrirme las puertas de su casa y de su corazón, por su confianza, pero sobre todo gracias por creer en mí, no tengo como agradecerles su infinito cariño, son lo mejor que me ha pasado, le doy gracias a Dios por haberme regalado la dicha de conocerlos, este triunfo es por ustedes, espero algún día poder recompensarlos y nunca defraudarlos. ¡Los amo!



A **Ricardo Cerón**, “werito” consentido, sabes no sé cómo agradecerle al universo que conspiró para encontrarnos aquel día en histología, te admiro muchísimo, gracias por compartir conmigo toda tu sabiduría, gracias por todas las veces que me ayudaste y no solo en lo profesional, eres el mejor de los amigos, gracias por tus consejos, tus jalones de orejas, tus comentarios tan atinados, por todos los momentos en que no paramos de reír, por tu confianza, pero sobre todo gracias por convertirte en otro ángel, eres un joven maravilloso lleno de muchísimas virtudes y talentos, en pocas palabras una gran persona, sabes que te quiero y te adoro muchísimo, harto pa’ que me entiendas, mi “werito” hermoso.

A mis queridísimas amigas e inseparables compañeras de laboratorio, siempre formando los mejores equipos, **Adriana Castro, Monserrat Morlán, Claudia García y Mariana Torres**, gracias por las atenciones y por la paciencia, disculpen si alguna vez las hice sentir mal por mi mal carácter, gracias por las desveladas, por el sí podemos hacerlo y si no sabemos ahorita lo investigamos, por todas las carreras para entregar los trabajos a tiempo, por él no te pongas nerviosa solo es un seminario más, pero sobre todo gracias por su confianza y cariño, por abrirme las puertas de su casa, aprendí mucho de ustedes y no solo académicamente, son unas personitas increíbles siempre las llevó en el corazón porque sin ustedes no habría logrado llegar hasta donde estoy, las quiero y admiro son unas guerreras imparables, y claro porque no, gracias por todas las fiestas y porque las risas no faltaron.

A **Jazmín López, Patricia Galván, Dulce Parrales y Gabriela Peralta**, gracias por su amistad, por su cariño, por sus palabras, por estar conmigo, por sonsacarme a las fiestas, por las carcajadas, me divertí tanto en esta etapa de mi vida y en gran parte se lo debo a ustedes, su amistad y su cariño siempre serán importantes para mí, las quiero.

A **Tania Ríos, Ivonne García y Adriana Díaz**, por su apoyo y su cariño, aunque tengo poco tiempo de conocerlas las admiro y las quiero, gracias por los convivios y por los ricos postres, por las comidas y porque no, por tanta alegría y risas que hemos compartido.

A **Carla Marín, Elba Ruíz, Luis Roberto, Rodolfo Beristáin**, por tener la confianza de formar equipos de trabajo inolvidables, por tantas desveladas, por las risas, pero sobre todo gracias por enseñarme a ser más tolerante y por brindarme la oportunidad de convivir un poco con ustedes, gracias por todo su conocimiento compartido.

A **Patxi Machín y Aura Alvarado**, gracias por su apoyo y por brindarme su conocimiento.

A mis compañeros y amigos de generación y de otras generaciones, gracias por tantas clases compartidas y por su ayuda, **Dalia, Mariela, Diana, Laura Endoqui, Laura Cruz, Omar, Iliana (Yuli), Cipactli, Carolina, Lina, Elian, Bianca, Camilo, Anne, Edson, Elia, Susan, Karen, Antonio, Rulo**.

Dicen que los últimos serán los primeros, a **Guadalupe Bárcenas, Alma Rodríguez y Jorge Mingüer**, gracias por brindarme su apoyo, su confianza y su sincera amistad, por abrirme su corazón, son personas increíbles que la fortuna me dio oportunidad de conocer, gracias por compartir conmigo su tiempo, experiencia y vida.

”La constancia es la virtud por las que todas las cosas dan su fruto”



PARA MÍ NO HAY EMOCIÓN O SATISFACCIÓN
COMPARABLE A LA QUE PRODUCE LA ACTIVIDAD
CREADORA, TANTO EN CIENCIA COMO EN EL
ARTE, LITERATURA U OTRAS OCUPACIONES DEL
INTELECTO HUMANO.

MI MENSAJE, DIRIGIDO SOBRE TODO A LA
JUVENTUD, ES QUE SI SIENTEN LA INCLINACIÓN
POR LA CIENCIA, LA SIGAN, PUES NO DEJARÁ DE
PROPORCIONALES SATISFACCIONES
INIGUALABLES.

SEVERO OCHOA



ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN.....	VIII
CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 CARNE	2
1.1.1 <i>Producción y Consumo</i>	2
1.1.2 <i>Estructura y Composición</i>	4
1.1.2.1 Fascículos	4
1.1.2.2 Fibras	5
1.1.2.3 Miofibrillas y miofilamentos	5
1.1.2.4 Composición química	6
1.1.3 <i>Proteínas musculares</i>	6
1.1.3.1 Proteínas miofibrilares	7
1.1.3.2 Proteínas sarcoplásmicas	9
1.1.3.3 Proteínas de tejido conectivo	10
1.1.4 <i>Clasificación de las proteínas</i>	10
1.1.4.1 Tipos de unión química.....	11
1.1.4.2 <i>Cuantificación de proteínas</i>	12
1.1.4.3 Peso molecular.....	14
1.1.4.4 Efecto de soluciones de extracción	14
1.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE)	15
1.2.1 <i>Tipos de electroforesis</i>	18
1.2.1.1 Nativa	18
1.2.1.2 Desnaturalizante	18
1.2.1.3 Reductora.....	19
1.3 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A BAJAS TEMPERATURAS.....	19
1.3.1 <i>Congelación</i>	20
1.3.1.1 Fundamentos.....	20
1.3.1.2 Descripción del proceso de congelación.....	22
1.3.1.3 Influencia de la velocidad de congelación y tamaño de los cristales de hielo.....	23
1.3.1.4 Daños mecánicos	26
1.3.1.5 Desnaturalización proteica por aplicación de frío.....	27
1.3.2 <i>Descongelación</i>	28
1.3.3 <i>Calidad</i>	29
1.3.3.1 Conservación de la cadena de frío	30
1.4 FUNDAMENTOS HISTOLÓGICOS PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS CÁRNICAS	31
1.4.1 <i>Preparación de cortes histológicos</i>	32
1.4.1.1 Fijación de muestras para microscopía	32
1.4.1.2 Montaje de la muestra por infiltración en parafina	33



JUSTIFICACIÓN.....	36
OBJETIVOS	37
HIPÓTESIS.....	37
CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	38
2.1 DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA	40
2.1.1 Corte de carne.....	40
2.1.2 Extracción de proteínas.....	41
2.1.2.1 Proteínas sarcoplásmicas	41
2.1.2.2 Proteínas miofibrilares.....	42
2.1.3 Cuantificación de proteínas método de Bradford	42
2.1.4 SDS-PAGE	44
2.1.4.1 Polimerización de geles de poliacrilamida.....	44
2.1.4.2 Preparación muestras de proteínas	47
2.1.4.3 Corrimiento de electroforesis SDS-PAGE.....	48
2.1.4 Protocolo de preparaciones histológicas para su observación al microscopio de campo claro.....	53
2.1.4.1 Toma de muestras	53
2.1.4.2 Preparación de laminillas histológicas	53
CAPÍTULO 3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
3.1 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	59
3.1.1 Proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas.....	59
3.2 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	60
3.3 PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES	64
3.3.1 Efecto de la congelación- descongelación en Cadenas Pesada y Ligera de Miosina.....	64
3.3.2 Efecto de la congelación-descongelación en Actina	71
3.4 PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS SARCOPLÁSMICAS.....	74
3.4.1 Efecto de la congelación-descongelación en mioglobina	74
3.5 OBSERVACIÓN DE CAMBIOS EN LA MICROESTRUCTURA DE LA CARNE	77
3.5.1 Cambios en carne refrigerada.....	77
3.5.2 CARNE CONGELADA.....	79
3.5.3 CARNE RECONGELADA.....	82
3.5.4 ANÁLISIS COMPARATIVOS DE LOS CAMBIOS MICRO ESTRUCTURALES DE CARNE DE RES SOMETIDA A CICLOS DE CONGELACIÓN.	87
CONCLUSIONES	90
REFERENCIAS	92
ANEXOS	96
I. PREPARACION DE SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN.....	96
a. Proteínas sarcoplásmicas.....	96
b. Proteínas miofibrilares.....	96
II. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS	97
a. Solución stock.....	97
b. Soluciones de teñido y desteñido	98



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Composición química de la carne	6
Cuadro 2. Fuerzas de unión encontradas en las proteínas	12
Cuadro 3. Métodos más empleados en la determinación de proteínas	13
Cuadro 4. Métodos de congelación: velocidades y tiempos de congelación.....	24
Cuadro 5. Datos para curva patrón para la determinación de proteínas	43
Cuadro 6. Formulación de geles	44
Cuadro 7. Concentración de proteínas miofibrilares	59
Cuadro 8. Concentración de proteínas sarcoplásmicas	59
Cuadro 9. Peso molecular (kDa) cadena pesada de Miosina en condiciones desnaturalizantes	64
Cuadro 10. Peso molecular (kDa) cadena pesada de Miosina en condiciones reductoras	64
Cuadro 11. Peso molecular (kDa) cadena ligera de Miosina en condiciones desnaturalizantes	65
Cuadro 12. Peso molecular (kDa) cadena ligera de Miosina en condiciones reductoras	65
Cuadro 13 Peso molecular (kDa) Actina en condiciones desnaturalizantes	71
Cuadro 14 Peso molecular (kDa) Actina en condiciones reductoras	71
Cuadro 15. Peso molecular (kDa) Mioglobina en condiciones desnaturalizantes	74
Cuadro 16. Peso molecular (kDa) Mioglobina en condiciones reductoras	74



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción nacional de carne anual en México.....	2
Figura 2. Producción mensual de carne de res	3
Figura 3. Estructura de un músculo, fibra muscular.....	4
Figura 4. Microfotografías a) corte transversal de carne b) Fascículos.....	5
Figura 5. Estructura de la Miosina	7
Figura 6. Estructura de Actina.....	8
Figura 7. Estructura molecular de Mioglobina (izquierda) Hemoglobina (derecha)	9
Figura 8. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	16
Figura 9. Partes de un gel de SDS-PAGE	17
Figura 10. Curvas de congelación a) Curva típica de congelación del agua, b) Curvas de congelación de alimentos.....	21
Figura 11. Tejidos básicos	31
Figura 12. Cuadro Metodológico	39
Figura 13. Corte de carne de res del músculo longissimus dorsi	40
Figura 14. Extracción de proteínas sarcoplásmicas.....	41
Figura 15. Recolección de proteínas.....	42
Figura 16. Protocolo para construcción de curva patrón de proteínas.....	43
Figura 17. Curva patrón Bradford	44
Figura 18. Partes de soporte para geles	45
Figura 19. Ensamble del soporte y placas.	46
Figura 20. Preparación de geles para electroforesis	47
Figura 21. Preparación de las proteínas cárnicas extraídas	47
Figura 22. Montaje de celdas para electroforesis	48
Figura 23. Marcadores de Peso Molecular	49
Figura 24. Inyección de la muestra de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas en condiciones desnaturalizantes y reductoras	50
Figura 25. Corrimiento del gel de electroforesis	50
Figura 26. Revelado de bandas proteicas	51
Figura 27. Analizador de Imágenes de Electroforesis.....	52
Figura 28. Analizador de bandas proteicas.....	52
Figura 29. Fijación de muestras para histología.....	53
Figura 30. Deshidratación de muestras.....	54
Figura 31. Infiltración en parafina.....	55
Figura 32. Elaboración de laminillas histológicas.....	56
Figura 33. Tren de tinción de muestras histológicas	56
Figura 34. Patrones electroforéticos proteínas miofibrilares carril 1,3 y 5, proteínas sarcoplásmicas carril 2, 4 y 6 proteínas en condiciones desnaturalizantes (izquierda). Vista 3D (derecha).	60
Figura 35. Efecto de agentes reductores sobre la extracción de proteínas	61



Figura 36. Patrones electroforéticos de proteínas miofibrilares carril 1, 3 y 5, proteínas sarcoplásmicas carril 2, 4 y 6, en condiciones reductoras (izquierda). Vista 3D (derecha).	61
Figura 37. Análisis estadístico de los protocolos de extracción para Miosina, actina y mioglobina.	63
Figura 38. Valores medios para PM de cadena pesada de Miosina en condiciones desnaturalizantes.	66
Figura 39. Valores medios para PM de cadena pesada de Miosina en condiciones reductoras	66
Figura 40. Valores medios para PM de cadena ligera de Miosina en condiciones desnaturalizantes.	67
Figura 41. Valores medios para PM de cadena ligera de Miosina en condiciones reductoras..	67
Figura 42. Patrones electroforéticos de proteína miofibrilar de la cadena ligera de Miosina (CL) en condiciones reductoras carril 2, 5 y 8 (izquierda). Vista 3D (derecha).	70
Figura 43. Valores medios para PM de Actina en condiciones desnaturalizantes	72
Figura 44. Valores medios para PM de Actina en condiciones reductoras	72
Figura 45. Patrones electroforéticos de Actina carril 2,5 y 8 en condiciones reductoras (izquierda). Vista 3D derecha.	73
Figura 46. Valores medios para PM de Mioglobina en condiciones desnaturalizantes	75
Figura 47. Valores medios para PM de Mioglobina en condiciones reductoras	75
Figura 48. Cortes de carne refrigerada microscopio de campo claro (40x)	78
Figura 49. Cortes de carne refrigerada microscopio óptico (100x).....	79
Figura 50. Corte de carne congelada, (a) daño mecánico a las fibras musculares, (b) separación y ruptura de algunas fibras (100x).....	80
Figura 51. Cortes de carne congelada espacios formados por cristales de hielo (40x).	80
Figura 52. Corte de carne Recongelada, (a) compresión y separación de las fibras 40x, (b) ruptura de las fibras (100x).....	82
Figura 53. (a) Unión interrumpida de las fibras por cristales 40x, (b) fisuras de las fibras en carne Recongelada 100x.....	83
Figura 54. Ruptura interna entre las fibras de la carne recongelada (100x).	84
Figura 55. Mayor espacio de las fibras microscopio óptico (40x)	84
Figura 56. Ampliación 100x muestras de carne recongelada, ruptura interna, desprendimiento y fisura de las fibras musculares.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 57. Formación de cristales de hielo entre las fibras (40x).....	86
Figura 58. Micrografías de (a) Carne refrigerada, (b) Carne Congelada, (c) Carne Recongelada (40x)	87
Figura 59. Micrografías 100x de carne sometida a ciclos de congelación-descongelación	88
Figura 60. Daños mecánicos a las fibras musculares provocados por aplicación de bajas temperaturas.....	88

**ABREVIATURAS**

ANOVA	Análisis de varianza
NOM	Norma Oficial Mexicana
TIF	Tipo Inspección Federal
CNA	Consumo Nacional Aparente
HM	Cadena pesada de Miosina
HL	Cadena ligera de Miosina
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
MPM	Marcador de Peso Molecular
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
β ME	2-Mercaptoetanol
PMa	Peso Molecular Aparente
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
nm	nanómetros
μ g	microgramos
mm	milímetro
μ L	microlitro
mL	mililitro
mA	miliampere
$^{\circ}$ C	Grado centígrado
%	porcentaje
h	horas
min	minutos
rpm	revoluciones por minuto
R	Carne Refrigerada
C	Carne Congelada
RC	Carne Recongelada



RESUMEN

En el momento de su obtención en el rastro, la carne puede contener microorganismos, presentar lesiones, alteraciones, anomalías y defectos que la hagan inadecuada para el consumo público. Además, durante su conservación, transporte y distribución hasta llegar al consumidor, la carne que fue considerada apta para el consumo puede sufrir alteraciones o modificaciones que la transformen en no apta para su consumo. La práctica de la congelación de la carne para prolongar su vida útil, ha sido utilizada desde hace miles de años, este proceso juega un papel esencial en la industria cárnica para asegurar que los productos se suministren a todas las regiones del mundo evitando su deterioro. Sin embargo, la pérdida de la cadena de frío tiene consecuencias significativas en la calidad de la carne. Numerosos estudios han demostrado que los ciclos de congelación-descongelación aceleran las reacciones de degradación de la carne debido a la formación de cristales de hielo con geometrías irregulares y escarcha en la superficie, este abuso en los cambios de temperatura contribuye a modificaciones físicas, químicas, fisicoquímicas y microbiológicas del sistema. La fluctuación de la temperatura ocurre generalmente durante el transporte y/o almacenamiento especialmente en los centros donde se comercializa, a nivel doméstico o en los servicios de alimentación. Los ciclos de congelación principalmente influyen en la fracción de agua que puede congelarse en la carne, puesto que está contenida dentro y entre las fibras musculares, lo que implica consecuencias debidas al proceso aplicado. Como el agua libre se congela, la concentración de solutos (proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales) aumenta, alterando de esta manera la autorregulación en las propiedades y composición de la carne. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento de la carne de res sometida a congelación, descongelación y recongelación sobre las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas, mediante el uso de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), en condiciones desnaturalizantes y reductoras, presentando cambios de peso molecular por efecto de los tratamientos a los que fue sometida la carne. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA). Asimismo se realizaron preparaciones histológicas que permitieron observar y analizar el daño producido por efectos de los ciclos térmicos los cuales mostraron los cambios en las fibras musculares tales como ruptura, desprendimiento y separación por efecto de ciclos de congelación y descongelación en la carne.



INTRODUCCIÓN

La carne está compuesta aproximadamente por un 75% de agua, de la cual en cuanto a su estado físico solo el 12% está firmemente ligado a las proteínas musculares (agua monomolecular), estando el resto inmovilizada por una red de membranas y filamentos de las proteínas estructurales unidas por fuerzas electrostáticas entre cadenas peptídicas. Del total de proteínas las miofibrilares constituyen el 56% y las sarcoplásmicas de un 30 a 40%, estas fracciones son las responsables de propiedades funcionales de la carne estrechamente asociadas con la integridad estructural. Entre los factores que influyen en dicha integridad y funcionalidad se incluyen los métodos de conservación de la carne, siendo la congelación el ideal para tiempos prolongados.

Durante la congelación de carne; el agua libre es la que se congela, formando cristales de hielo cuya conformación puede afectar algunas propiedades de la carne, dependiendo del tipo de congelación, localización y tamaño de los cristales; y principalmente de la velocidad de congelación. Si este proceso ocurre de manera lenta se tienen, fenómenos de sublimación que dan lugar a la desecación superficial, y en algunos casos, por ejemplo, los cristales de hielo formados pueden seguir creciendo durante el almacenamiento (recristalización), siendo responsable de la pérdida de propiedades funcionales, ya que dan lugar a un aumento en la concentración de iones contribuyendo en la desnaturalización de proteínas viéndose reflejado en el aumento de líquido exudado durante la descongelación, por ello lo más recomendable es congelar rápidamente puesto que la cristalización se produce casi simultáneamente dentro (*intra*) y entre (*inter*) las fibras musculares.

En diferentes investigaciones se ha evaluado el alcance de los ciclos de congelación-descongelación haciendo hincapié en el deterioro de la calidad de la carne ante dichos procesos, estos estudios presentan resultados contradictorios, que sugieren investigación adicional para establecer los mecanismos que intervienen en este cambio, existen diferentes técnicas para su evaluación, entre ellas la electroforesis y el análisis histológico.



CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO



1.1 Carne

La carne se define como “la parte muscular comestible de los animales de abasto, sacrificados y faenados en condiciones higiénicas. Se incluyen en este concepto las porciones de grasa, hueso, cartílago, piel, tendones, aponeurosis, nervios, vasos linfáticos y sanguíneos que normalmente acompañan al tejido muscular y que no se separan de éste en los procesos de manipulación, preparación y transformación de la carne” (Madrid, 1992).

La carne se encuentra definida en la NOM-009-ZOO-1994 de la siguiente manera:

“Estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conectivo elástico, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos, de las especies animales autorizadas para el consumo humano”

1.1.1 Producción y Consumo

En la actualidad la producción de ganado en México ha ido incrementado en un 3.9% desde 2003 (Figura 1), con una práctica estabilización de la producción en el orden de 1, 160, 677 toneladas anuales, todo esto bajo controles zoonosanitarios en el proceso productivo para el abastecimiento del mercado nacional, procesados en plantas TIF (Tipo Inspección Federal), que cuentan con altos niveles de equipamiento y tecnificación, con estrictos niveles de higiene y calidad, que van desde la recepción de animales, hasta empaquetado y conservación de canales y piezas obtenidas.

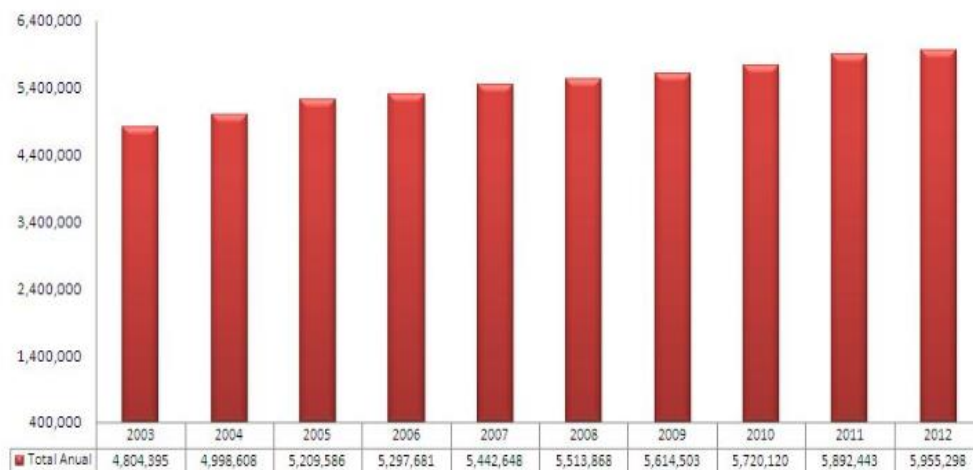


Figura 1. Producción nacional de carne anual en México

Fuente: AMEG, SIAP-SAGARPA, 2013.



SAGARPA reporta que desde 2010 la producción mensual se ha mantenido estable con un crecimiento aproximado de 3,000 a 5,000 toneladas por mes como se muestra en la Figura 2.



Figura 2. Producción mensual de carne de res

Fuente: AMEG, con datos de SIAP-SAGARPA, 2013.

En materia de comercio exterior SAGARPA reporto en el 2010 un crecimiento del 13.4%, situando el componente externo del abasto del mercado mexicano en el 37.5% en si 649, 100 toneladas. Por su parte, las exportaciones de carne mexicana, mantienen una importante tendencia de crecimiento situación debida a la especificidad del mercado que atienden Corea, Japón y los EUA. Las ventas de carne y productos cárnicos mexicanos en 2010 fueron del orden de las 67, 800 toneladas.

El consumo nacional aparente (CNA) de carne y productos cárnicos en México fue de 1, 730, 200 toneladas en 2010, manteniéndose desde entonces una participación del 26.5% dentro del consumo general de carne en el país. Así mismo, es importante resaltar que el conjunto de preferencias del consumidor, el precio y la calidad del producto es el factor fundamental que determina la demanda en la mayor parte de la población.



1.1.2 Estructura y Composición

El músculo estriado esquelético es un tejido altamente organizado, compuesto por células individuales, que están estructurados por tejido conectivo, la organización de este tipo de músculo se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** El orden de los componentes desglosados es 1) el músculo 2) fascículo muscular 3) de las fibras musculares / célula muscular 4) miofibrillas y 5) miofilamentos.

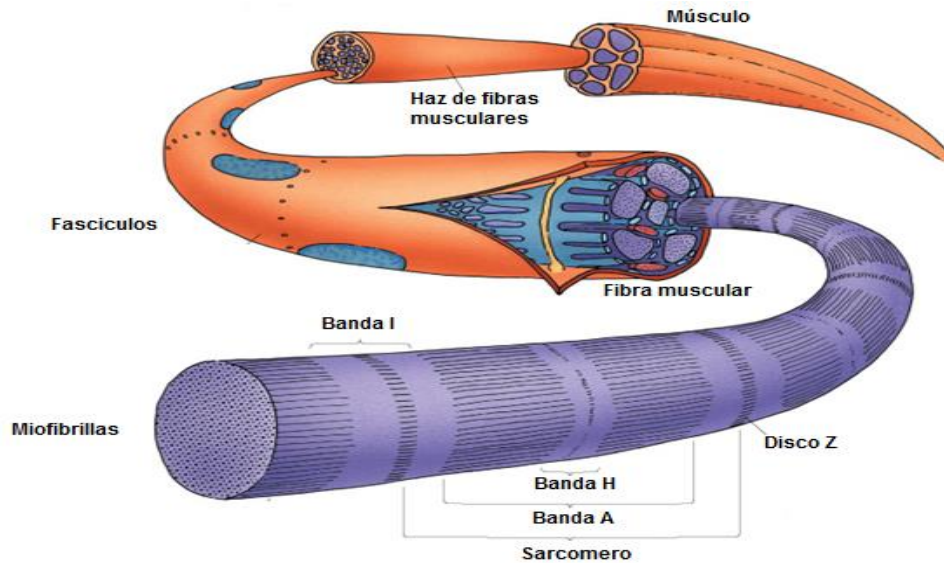


Figura 3. Estructura de un músculo, fibra muscular

Fuente: Pearce *et al.*, 2011.

1.1.2.1 Fascículos

La estructura fascicular de la carne está mantenida por tejido conectivo. Las fibras de colágeno finas, a menudo ramificadas, forman una trama de endomisio alrededor de cada fibra muscular, como se observa en la Figura 4a cuando se realiza un corte transversal a la carne las fibras del tejido conectivo se sitúan en la superficie de las fibras musculares.

Los tubos del endomisio se unen entre sí formando fascículos mediante las fibras de colágeno más gruesas del perimisio, de un modo parecido al tabique (Figura 4b), finalmente en la superficie del músculo, las láminas del perimisio situadas más al exterior se van transformando en una capa de tejido muy gruesa denominada epimisio.



A veces el epimisio se encuentra más engrosado dando lugar a un tendón, extendiéndose más allá del músculo como una lámina plana de tejido conectivo o fascia.

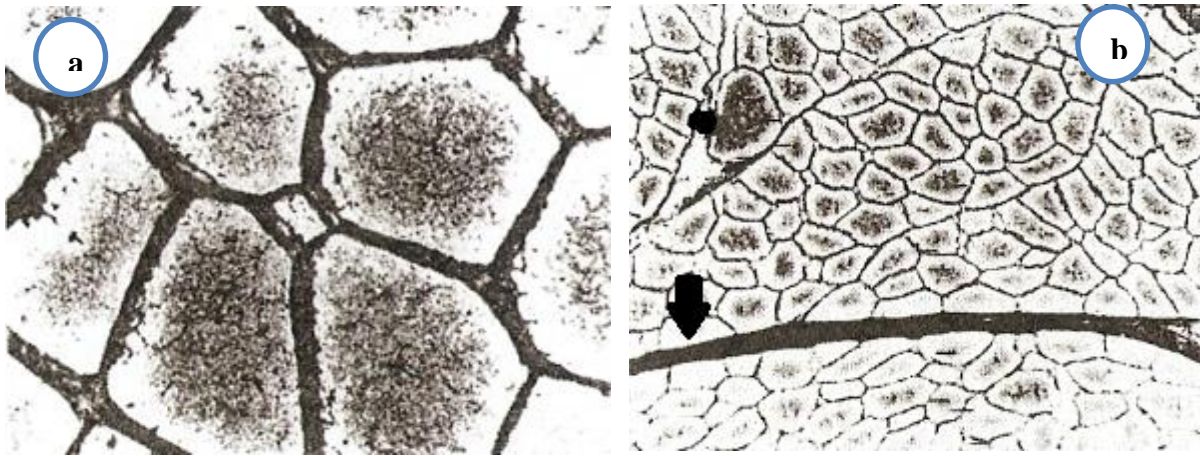


Figura 4. Microfotografías a) corte transversal de carne b) Fascículos

Fuente: Swatland, 1995.

1.1.2.2 Fibras

Si se coloca una pequeña cantidad de carne debajo de un microscopio de disección y se desmenuza con unas agujas, los fascículos más pequeños que son visibles están compuestos de manojos de fibras musculares. Las fibras musculares son las unidades celulares básicas del músculo vivo y de la carne. Son células poco habituales porque son multinucleadas y extremadamente largas (normalmente varios centímetros). Las fibras musculares encontradas en la mayoría de los cortes comerciales de carne rara vez recorren por completo la longitud del músculo en el que se encuentra. Las fibras individuales dentro de un fascículo pueden terminar en un punto en algún lugar a lo largo de la longitud del fascículo, asociándose en un final que se encuentra anclado al tejido conectivo en la superficie de una fibra muscular adyacente (Swatland, 1995).

1.1.2.3 Miofibrillas y miofilamentos

Los aspectos principales de la estructura de las fibras musculares pueden verse con un microscopio óptico, básicamente las fibras musculares tienen una forma cilíndrica y, a lo largo de su longitud presentan muchas estriaciones transversas.



A nivel ultraestructural, las estriaciones transversas de las miofibrillas tienen su origen en la disposición longitudinal regular de los grupos de filamentos gruesos (10 a 12 nm de diámetro) y los finos (de 5 a 7 nm de diámetro). En una sección transversal a lo largo de la zona en la que se superponen los filamentos gruesos y los delgados del sarcómero, cada filamento grueso está rodeado por seis filamentos finos. Para que ocurra la contracción muscular el deslizamiento entre los filamentos tienen origen en los cambios conformacionales de un número muy grande de moléculas (Swatland, 1995).

1.1.2.4 Composición química

Dependiendo de la especie y de la nutrición, el músculo forma del 45 al 60% del peso total del organismo y del cual el 75% es agua. Las proteínas del músculo sirven como maquinaria de movimiento y como reserva utilizable de aminoácidos. La carne no tiene una composición uniforme en cada animal. En general, las de inferior categoría contienen más agua y menos proteínas. De forma general la carne, está compuesta por agua, grasa, proteína, cenizas y una pequeña proporción de carbohidratos. Esta composición puede cambiar dependiendo de varios factores como: edad del animal, alimentación, raza, etc. En el Cuadro 1 se presenta la composición química promedio de la carne de res (Ramírez, 2006).

Cuadro 1 Composición química de la carne

Componente	%
Agua	71-75
Proteínas	19-24
Carbohidratos	2.5-4.5
Cenizas	1.2-1.7
Lípidos	2-5

Fuente: Ramírez, 2006.

1.1.3 Proteínas musculares

Las proteínas del músculo son trascendentales en los cambios post mortem involucrados en la transformación del músculo en carne, además de ser la mayor fuente de proteína de alta calidad en la dieta humana (Ramírez, 2006). Constituyen el componente mayoritario de la materia seca del músculo estriado. En la carne las proteínas musculares se clasifican en tres grupos: miofibrilares, sarcoplásmicas y de tejido conectivo.



1.1.3.1 Proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares constituyen del 55 al 60 % del total de la proteína del músculo. Basadas en sus funciones biológicas, las más importantes son la Miosina (Figura 5) y Actina (Figura 6) las cuales están directamente relacionadas con el ciclo de contracción-relajación del músculo. La Miosina es la proteína miofibrilar más abundante, constituye más de una tercera parte del total, es una molécula alargada de unos 160 nm de longitud, está formada por dos cadenas enrolladas entre sí, que presentan varias zonas α -hélice hacia uno de sus extremos, y hacia el otro varios grupos sulfhidrilo, con un peso molecular de aproximadamente 460 kDa y está formada por seis subunidades, dos unidades idénticas de Miosina pesada (HM) con un peso molecular de 200 kDa y cuatro cadenas de Miosina ligera (LM) con un peso molecular de 16 a 21 kDa aproximadamente.

Las cadenas pesadas de la Miosina tienen regiones de cabeza y cola que refleja las porciones globular y de bastón, respectivamente de las moléculas. Las fracciones helicoidales de las dos cadenas de HM se enrollan helicoidalmente entre sí formando una súper hélice que corresponde a la fracción de cola de la Miosina, mientras que los dominios globulares generan una doble cabeza.

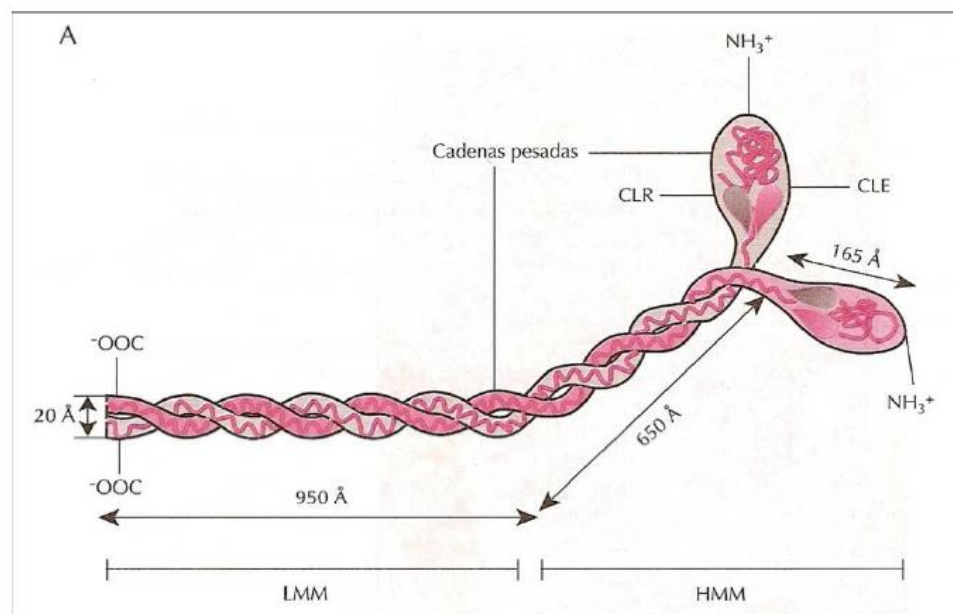


Figura 5. Estructura de la Miosina

Fuente: Hiu, Guerrero y Rosmini, 2006.



La Miosina tiene seis cadenas polipeptídicas, las cuales están ensambladas en una estructura cuaternaria que se asemeja a un bastón (cola) con dos cabezas en forma de pera. Las cadenas son de dos tipos: alcalinas (LM1 o LM3) y DTNB (LM2 y LM4), las primeras dos se disocian en condiciones alcalinas y son esenciales para la actividad de ATPasa de la Miosina. Con cada una de las secciones de la cabeza existen dos cadenas ligeras asociadas, de tal modo que cuatro cadenas ligeras están unidas con cada molécula de Miosina.

Las cadenas ligeras son de dos clases químicamente diferentes. Una está formada por cadenas ligeras DTNB (5,5' ditiobid-2nitrobenzoico), llamadas así porque el tratamiento de la Miosina con el reactivo tiólico produce su separación. La segunda está formada por cadenas ligeras alcalinas, llamadas así porque se liberan en condiciones alcalinas (Hiu, Guerrero y Rosmini, 2006).

La actina es la proteína principal de los miofilamentos delgados y compone 20% de la proteína miofibrilar del músculo. En la Figura 6 se observan los monómeros de actina llamados globulares, se ensamblan en una estructura helicoidal denominada actina fibrilar que constituye la porción principal del filamento delgado. La actina globular se compone de 374-375 aminoácidos y tiene un peso molecular de 42 a 48 kDa, es estable en agua donde puede existir también como dímero (Carballo y López de torre, 1991).

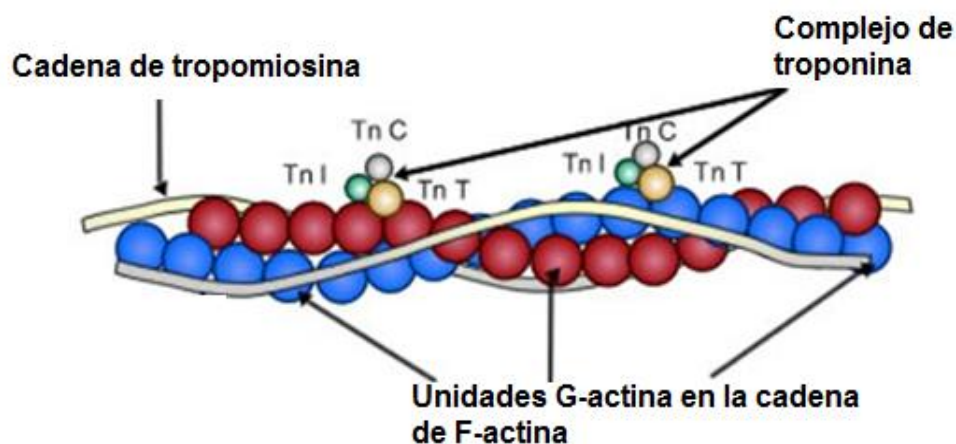


Figura 6. Estructura de Actina

Fuente: Carballo y López de torre, 1991.



También se encuentran englobadas dentro del grupo de las miofibrilares las denominadas proteínas reguladoras de la contracción-relajación, entre ellas tropomiosina y Troponina (Figura 6), proteína M, proteína C, entre otras (Cheftel y Besancon, 1980).

1.1.3.2 Proteínas sarcoplásmicas

Las proteínas sarcoplásmicas son aquellas que se encuentran en el citoplasma de las células musculares (sarcolema), constituyen la masa fluida que rodea a las miofibrillas, proporcionándoles de energía.

Dentro de esta categoría se encuentran proteínas con pocas propiedades funcionales para la contracción, pero son importantes por su actividad enzimática, de transporte y almacenamiento de oxígeno; desde el punto de vista de calidad de carne como alimento, las más importantes son Hemoglobina y Mioglobina (

Figura 7) con un peso molecular de 68 y 18 kDa respectivamente, presentes en un 30-40% (Ranken, 2000).

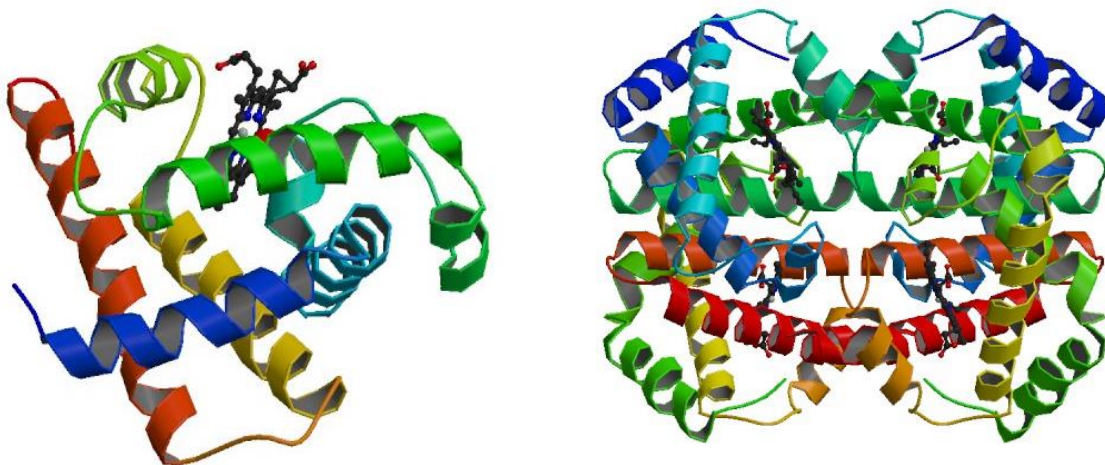


Figura 7. Estructura molecular de Mioglobina (izquierda) Hemoglobina (derecha)

Fuente: www.rcsb.org/pdb/explore/structure (1MBN, 2DHB).

La mioglobina es la principal proteína responsable del color de la carne y sirve como depósito o transportador de oxígeno en el músculo vivo. La molécula de mioglobina consta de un grupo proteico, la globina, y de un grupo prostético hemo, con un átomo de hierro dicho átomo de



presenta seis enlaces de coordinación, el quinto enlace se une a la histidina de la cadena polipeptídica. El sexto enlace de coordinación queda libre para unirse al oxígeno o a otras moléculas, determinando las propiedades y el color del complejo (Bodwell y Womack, 1978).

1.1.3.3 Proteínas de tejido conectivo

Las proteínas del tejido conectivos son: colágeno, elastina y reticulina. A pesar de que las proteínas del tejido conectivo juegan un papel importante en la dureza de la carne son pocas las observaciones indicadoras de que se alteren durante la maduración. El tejido conectivo tiene tres funciones principales: proporcionar fuerza mecánica a los órganos, mejorar la estructura del movimiento, y promover el crecimiento y proliferación celular, sus propiedades físicas están determinadas principalmente por su composición y organización macromolecular. El colágeno es la proteína de tejido conectivo más abundante de los mamíferos, en el músculo estriado esquelético constituyen el epimisio, endomisio y perimisio, cuya función es agrupar y dar sostén a las fibras musculares (miofibrillas) (Carballo y López de torre, 1991).

1.1.4 Clasificación de las proteínas

Las proteínas son biomoléculas complejas formadas por carbono (C) hidrogeno (H), oxígeno (O₂) y nitrógeno (N₂). Su estructura fundamental son los aminoácidos. Las proteínas pueden clasificarse en función de su forma, solubilidad y estructura.

- a) De acuerdo a su estructura. Las proteínas están caracterizadas por su secuencia de aminoácidos y su conformación o estructura tridimensional:
 - Estructura primaria: la posición que ocupa cada aminoácido dentro de la cadena va a condicionar el resto de los niveles estructurales y en último término la función que desempeña la proteína (hidrofobicidad total, capacidad de formar gel, emulsión o espuma).
 - Estructura secundaria y terciaria: ordenación tridimensional de la cadena polipeptídica. En la estructura secundaria el polipéptido resultante puede plegarse en forma de α -hélice y β -laminar, y en la estructura terciaria el plegamiento ocurre por la formación de puentes disulfuro.



- Estructura cuaternaria: proteína multimérica (hemoglobina), se basa en la colocación de varias cadenas polipeptídicas juntas.

b) De acuerdo a su forma:

- Proteínas fibrosas: las proteínas fibrosas tienen una estructura alargada, formada por largos filamentos de proteínas, de forma cilíndrica. No son solubles en agua. Un ejemplo de proteína fibrosa es el colágeno.
- Proteínas globulares: estas proteínas tienen una naturaleza más o menos esférica. Debido a su distribución de aminoácidos (hidrófobo en su interior e hidrófilo en su exterior) que son muy solubles en las soluciones acuosas. La mioglobina es un claro ejemplo de las proteínas globulares.

c) De acuerdo a su solubilidad:

- Sarcoplásmicas (son solubles en agua y funcionalmente son enzimas)
- Miofibrilares (forman el 50-60 % de todas las proteínas cárnicas, son insolubles en agua y solubles en solución salina 1M; por ejemplo, miosina y actina)
- Conectivas (insolubles en agua y soluciones salinas; Por ejemplo, colágeno y elastina).

1.1.4.1 Tipos de unión química

Las estructuras y enlaces de las proteínas están estabilizadas por los diferentes tipos de uniones químicas que se muestran en el cuadro 2; las covalentes son las responsables del enlace peptídico y se producen como resultado de un reparto de electrones entre dos o más átomos; son de menor longitud y las de mayor energía; los puentes salinos o iónicos se crean por atracción coulombica entre grupos cargados con signo opuesto, y son las uniones polares más fuertes que existen; los puentes de hidrogeno aun siendo más débiles, desempeñan un papel muy importante, las fuerzas activas atractivas de Van Der Waals se establecen por la inducción de un momento dipolar entre grupos eléctricamente apolares.



En el cuadro 2 se puede observar que de todas las uniones covalentes el enlace peptídico C-N es el más fuerte, y que el enlace disulfuro S-S es el más débil ya que requiere de menor energía para su hidrólisis y además es el único que puede romperse sin causar una pérdida de la conformación del polímero, y por lo tanto, de su funcionalidad.

En general, las proteínas tienden a adquirir la estructura más estable que se encuentra en los niveles más bajos de energía libre; se produce debido a las diferentes uniones que intervienen y que, a su vez, se relacionan directamente con la polaridad, la hidrofobicidad, los impedimentos estéricos de los R, etc.

Cuadro 2. Fuerzas de unión encontradas en las proteínas

Tipo	Mecanismo	Energía (Kcal/mol)	Distancia de interacción (Å)	Grupos que interaccionan
Covalente	Reparto de electrones	30-100	1-2	C-C, C-N, C=O, C-H, S-S, C-N-C
Puente iónico	Atracción entre grupos cargados opuestamente	10-20	2-3	NH ₃ ⁺ , -COO ⁻ , NH ⁺
Puente de hidrogeno	El hidrogeno es repartido entre dos átomos electronegativos	2-10	2-3	N-H-O=C OH ⁻
Fuerzas atractivas de Van der Waals	Inducción mutua de monómeros dipolares en grupos apolares	1-3	3-5	Grupos apolares

Fuente: Badui, 2006.

1.1.4.2 Cuantificación de proteínas

Existen diversos métodos para la cuantificación de las proteínas, pero la mayoría tiene como principio alguna reacción química de los grupos alquilo o arilo de los diferentes aminoácidos, y todos ellos se basan en algunas de sus propiedades típicas, como pueden ser los patrones de adsorción de las radiaciones electromagnéticas de los grupos aromáticos, la reactividad del enlace peptídico, su contenido de nitrógeno, etc. En el cuadro 3 se presenta un resumen de los más conocidos, con sus respectivas ventajas y limitaciones, de acuerdo con el alimento del que se trate, la exactitud requerida y la disponibilidad de equipo (Herrera, Bolaños, y Lutz, 2003).



Cuadro 3. Métodos más empleados en la determinación de proteínas

Principio	Ventajas	Limitaciones
<p><u>Absorción en ultravioleta (280nm)</u> La mayoría de las proteínas absorben en el UV a 280nm, debido básicamente a grupos cromóforos de tirosina y triptófano. Si se considera que la cantidad de aminoácidos es siempre constante, la absorbancia debe ser proporcional a la concentración de proteína.</p>	<p>Rápido Requiere de poca cantidad de proteína. El sulfato de amonio no interfiere, mientras que en otros métodos si existe. La muestra no se destruye.</p>	<p>Corrección por interferencia de ácidos nucleicos. Varía la cantidad de aromáticos entre proteínas.</p>
<p><u>Biuret</u> Las sustancias que contienen dos o más enlaces peptídicos forman un complejo purpura-violeta con sales de cobre en soluciones alcalinas.</p>	<p>Método simple. Pocas interferencias de otros compuestos en el desarrollo del color.</p>	<p>Se requiere de 20 a 40 mg de muestra. Interferencia de pigmentos que tienen la misma absorbancia. El desarrollo de color es diferente para cada proteína Interfieren lípidos e hidratos de carbono.</p>
<p><u>Lowry</u> Se basa en el desarrollo de un color azul debido a la reacción de Biuret y la reducción del reactivo de fosfomolibdeno-volfrato. La absorbancia se mide a 750nm (alta sensibilidad) o a 500nm (baja sensibilidad), la sensibilidad es de 0.2-300µg.</p>	<p>Es mucho más sensible que el método de Biuret. Relativamente rápido (1 hora).</p>	<p>Requiere de muchos cuidados en la estandarización. El color no es siempre proporcional. Interferencias de sacarosa, lípidos, amortiguadores de pH, fosfatos y monosacáridos.</p>
<p><u>Kjendahl</u> Determina nitrógeno total tanto orgánico (amido y amino) como nitrógeno no proteico (urea, aminoácidos, etc.). Consiste en la digestión de la muestra con H₂SO₄ y la formación de NH₃OH que es recibido en ácido para finalmente titularlo con álcali de una concentración conocida.</p>	<p>Determina todo el contenido de nitrógeno del alimento.</p>	<p>Puede haber pérdidas de nitrógeno debido a las altas temperaturas. Proceso largo. El nitrógeno no proteico se debe tomar en cuenta ya que este se mide junto con el proteico.</p>
<p><u>Bradford</u> Formación de un compuesto de absorción de coloración azul entre los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y en el color azul de Coomassie, se absorbe a 595nm.</p>	<p>Muy sensible.</p>	<p>Interferencias con algunos detergentes.</p>

Fuente: Badui, 2006.



1.1.4.3 Peso molecular

El peso molecular de las proteínas es muy variable, pero se puede considerar que va de un mínimo de aproximadamente 3550 Da, como es el caso del glucagón, hasta varios cientos de miles o incluso millones en algunas fracciones de la soya o de las gluteninas del trigo. Para su determinación se puede emplear el método de Svedberg, que está basado en que al someter a los polímeros a una fuerza centrífuga presentan un valor y una velocidad de sedimentación que dependen directamente del peso molecular, la forma, la densidad, la velocidad aplicada, y la viscosidad del disolvente empleado. Al efectuar este análisis es preciso considerar que existen muchas proteínas con estructuras cuaternarias cuyo peso molecular varía de acuerdo con su estado de asociación; por ello, hay que seleccionar cuidadosamente el disolvente, ya que este disocia los dímeros, trímeros, etc., en monómeros sencillos. Existen otros métodos para el estudio del peso molecular que incluyen la electroforesis, la presión osmótica, la viscosidad y la cromatografía de filtración en gel (Badui, 2006).

1.1.4.4 Efecto de soluciones de extracción

El efecto del pH y la concentración de las diferentes soluciones de extracción de proteínas en carne han sido estudiados por muchos autores, Helander (1957) inicio estos estudios utilizando fosfatos, sin embargo, pocos trabajos han tratado de explicar los problemas asociados con la extracción de proteínas, debido a la solubilidad de las mismas y a los cambios bioquímicos que pueden ocurrir (Toldrá *et al.*, 1991).

La solubilidad de una proteína depende del tipo de aminoácidos que contenga, de tal manera que aquella que posea muchos residuos hidrofóbico será menos soluble en agua que la constituida por un elevado número de grupos hidrofílicos (Badui, 2006). Las proteínas se fraccionan y se clasifican de acuerdo a su solubilidad en diferentes solventes; designándolas como: albuminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), glutaminas (solubles en álcalis diluidos), y protaminas (solubles el alcohol). Las proteínas presentes en las distintas fracciones solubilizadas pueden ser aisladas por precipitación isoeléctrica.

El pH del medio donde está inmersa la proteína influye marcadamente en su solubilidad. Para la mayoría de las proteínas la solubilidad es mínima a valores de pH correspondientes a su punto isoeléctrico y aumenta al alejarse de él. Esto se debe a que en el punto isoeléctrico se igualan las cargas eléctricas positivas y negativas de los polímeros, lo cual favorece la



interacción proteína-proteína que induce a la agregación. Disminuyendo por consiguiente la solubilidad (Casserly *et al.*, 2000).

El punto isoeléctrico se refiere al valor de pH donde, por lo general, las proteínas tienen su mínima solubilidad, debido a que a ese pH la carga eléctrica neta de los polímeros es cero y en ese caso las interacciones proteína- proteína se favorecen en mayor grado que las proteínas solvante, lo cual induce a que ocurra la máxima precipitación proteica. Los puntos isoeléctricos de las proteínas cárnicas oscilan entre valores de 4.5 a 5.7; dependiendo del solvente en el cual la proteína es extraída.

La solubilización es el resultado del balance entre fuerzas subyacentes proteína- proteína e interacciones proteína – solvente; lo cual implica que se establezca una fuerte interacción proteína- solvente para que el material proteico se solubilice en alto grado, de lo contrario se favorecerá la asociación proteína-proteína que disminuye la solubilidad e incluso puede provocar la precipitación. Este balance es afectado por cambios en el pH del medio, en la concentración, temperatura, naturaleza del solvente, presencia de otros componentes, etc. (Chan, 1983).

1.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Las técnicas electroforéticas son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, sirviendo así un método de separación de mezclas complejas de proteínas y otras biomoléculas; creando patrones de bandeo diferenciándolas por peso molecular. Existen diferentes matrices para llevar a cabo esta técnica entre las más empleadas se encuentran la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio SDS-PAGE por sus siglas en inglés. Esta técnica fue descrita por Laemmli en 1970 (Liebler, 2002).

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. La movilidad es conocida como R_f es una medida convencional de la movilidad de la proteína relativa al frente



de migración y se define como la distancia desde el inicio del gel separador hasta el centro de cada banda dividida entre la distancia a la que ha migrado el ion líder.

El anión se une a las proteínas por absorción no específica (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos, con una relación SDS/proteína máximo de 1,4 g/g). El SDS desnaturaliza por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (Figura 8; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). Las proteínas reaccionan con SDS a relativamente alta concentración, pero se ha demostrado que 0,4 % de SDS es el nivel mínimo necesario para saturar los sitios de unión de la proteína, sin embargo, se emplea 1 % para lograr un margen de seguridad (Lomonte, 2009).

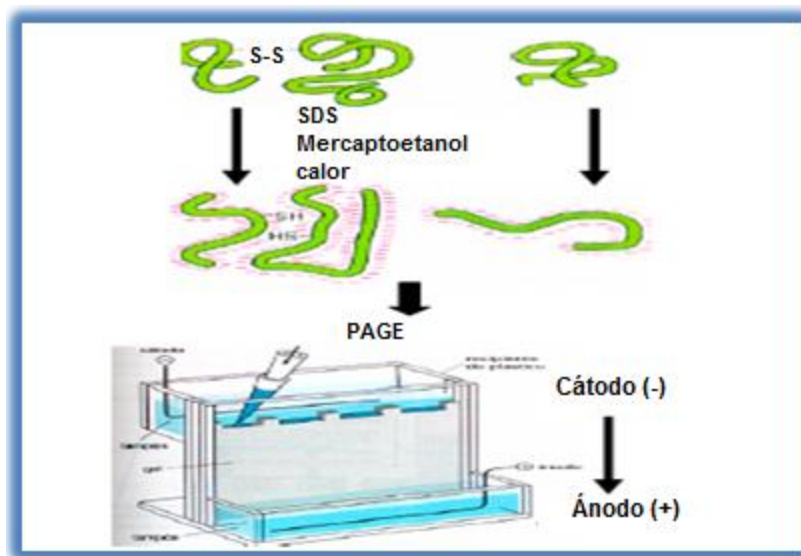


Figura 8. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Fuente: Lomonte, 2009.

La migración de los derivados proteína – SDS hacia al ánodo es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular ($\log PM$). La relación carga/masa es aproximadamente igual para todas las proteínas de la muestra por lo que la talla de esta deriva en el factor determinante de la separación.



El gel de poliacrilamida se constituye de dos porciones diferenciadas por su concentración, la porción superior de menor concentración (tamaño de poro no restrictivo) recibe el nombre de gel compactador “apilamiento”, y en él se localizan los pozos, el segundo de mayor concentración recibe el nombre de gel separador y en él se observa el corrimiento de las proteínas (Figura 9). Una vez preparado el gel se dispone entre dos receptáculos independientes que contienen solución tampón de electroforesis y los electrodos positivo y negativo, de forma que la conexión eléctrica entre ambos receptáculos sólo es posible a través del gel. Una vez que la electroforesis ha tenido lugar, el gel de poliacrilamida se puede teñir, documentar o incluso se puede purificar la molécula de interés cortando literalmente el fragmento del gel (Maldonado y Jorrín, 2001).

En el gel separador, la movilidad es restringida por el tamaño del poro, el cual depende de la concentración de monómeros del gel. Así, si se requiere resolver componentes de muy alto PM, se utilizan geles al 5% o al 7,5%, mientras que los geles de poro menor, ej. 15-20% son útiles en la separación de péptidos y proteínas pequeñas. Los geles de poro intermedio (10-12%) proveen una separación adecuada para proteínas de $\approx 10,000$ a $90,000$ Dalton (García L. L., 2003).

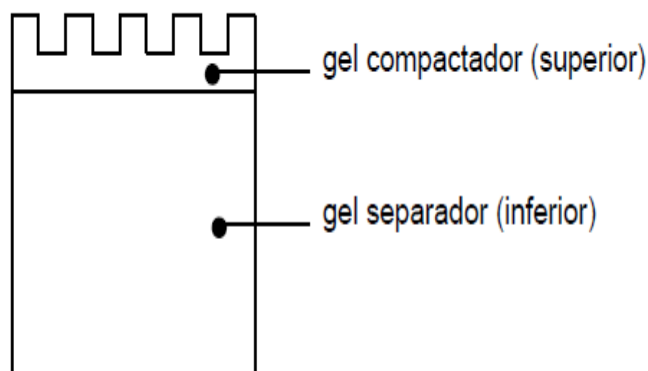


Figura 9. Partes de un gel de SDS-PAGE

Fuente: García, 2003.

Lo más recomendable antes de correr el gel es conocer las variables que intervienen, por ejemplo, la determinación del tiempo adecuado de la corrida es muy importante pues corridas cortas impiden que la muestra avance en el espacio necesario para su correcta migración, se



recomienda un tiempo de 30 a 40 minutos en un gel de 0.75mm, para geles de 1 a 1.5mm el tiempo recomendado es de 45 a 60 minutos (Lambin, Rochu, y Fine, 1976). Otra variable importante a considerar es el voltaje utilizado, Schmidt (1957) dedujo que se necesita un voltaje de 100 mA en un gel de 0.75mm y 120 mA en geles entre 1 y 1.5mm (Schmidt, 1957), sin embargo la mayoría de los investigadores de proteínas de carne han coincidido que estas migran en el espacio necesario entre 180 y 220 mA (Duncan y Hershey, 1984).

1.2.1 Tipos de electroforesis

1.2.1.1 Nativa

La electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturalización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos. Los sistemas tampón (buffer) empleados en estos caso son: tris-glicina (intervalo de pH 8.3 a 9.5), tris-borato (intervalo de pH 7.0 a 8.5) y tris-acetato (intervalo de pH 7.2 a 8.5).

La modalidad es más sencilla, la muestra se carga directamente en el gel en el cual se va a producir la separación, por lo tanto, la concentración del gel es uniforme y hay un único tampón. La PAGE se desarrolla en condiciones en las que no se altera la conformación nativa de las proteínas separadas, por lo que finalizada la electroforesis, pueden realizarse estudios de funcionalidad de dichas proteínas separadas (actividad enzimática, capacidad de unión de anticuerpos, unión a receptores, etc.) (Segal y Ortega, 2005).

1.2.1.2 Desnaturalizante

Una electroforesis desnaturalizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturalizante más empleado es dodecil sulfato de sodio o SDS, un detergente.



Este tipo de electroforesis permite el cálculo de parámetros moleculares (al contrario que el resto de los tipos de electroforesis), pues los complejos SDS proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular. El SDS interacciona con las proteínas formando complejos de características comunes independientemente de las de cada proteína. Las proteínas unen una molécula de SDS por cada dos aminoácidos, lo que implica que las cargas propias de las proteínas quedan enmascaradas o anuladas; asimismo, la molécula de SDS proporciona una carga negativa, por lo que los complejos SDS-proteína están cargados negativamente de forma uniforme (la carga por unidad de masa es prácticamente constante para todos los complejos) (Helander, 1957).

1.2.1.3 Reductora

En presencia de algunos compuestos químicos, las proteínas pierden su estructura nativa; tales compuestos, llamados agentes reductores o caotrópicos, producen el desplegamiento de la proteína que queda, así, sin la organización tridimensional característica de su funcionalidad biológica. En algunas proteínas hay puentes disulfuro entre los residuos de Cys (para formar cistinas) de una misma cadena polipeptídica (puentes intracatenarios) o de diferentes cadenas (puentes intercatenarios) de algunas proteínas con estructura cuaternaria. Estos puentes se pueden romper mediante tratamiento con determinados agentes, como por ejemplo, el β -mercaptoetanol (β -ME) o el ditioneitol (DTT).

Los agentes afectan a la estructura nativa de las proteínas y a las interacciones con otras moléculas (proteínas, lípidos, etc.), ya que las interacciones hidrofóbicas de las proteínas son sustituidas por interacciones agentes-proteínas (Claeys *et al.*, 2004).

1.3 Métodos de conservación a bajas temperaturas

Entre los procedimientos de conservación de los alimentos desempeñan importante papel los métodos basados en la acción de bajas temperaturas, es decir, la refrigeración y la conservación por congelación. Estas técnicas mejoran amplios campos de la comercialización de los alimentos cuando son aplicadas racionalmente, logrando así, un mejor abastecimiento del mercado, una calidad superior y una disminución de las pérdidas del producto (Gruda, 1986).



1.3.1 Congelación

Comercialmente se usa el término “congelación de carne” para designar el proceso mediante el cual la temperatura de la carne desciende hasta -18°C (NOM-008-ZOO-1994) y conservación en congelación, al proceso mediante el cual se dan condiciones de estabilidad térmica, minimizando la velocidad de los cambios deteriorativos que estén sucediendo en la carne.

La congelación es aquella operación unitaria en la que la temperatura del alimento se reduce por debajo de su punto de congelación, con lo que una porción elevada del agua que contiene cambia de estado formando cristales de hielo (Fellows, 1994). En estas condiciones, se inhibe el desarrollo de microorganismos deteriorativos y patógenos, asimismo, se disminuye considerablemente la velocidad de las reacciones tanto químicas como enzimáticas que alteran las características de los alimentos a consecuencia de la transformación del agua en hielo y de la reducción de la actividad acuosa del producto, disminuyendo así la cantidad de agua disponible para esos fenómenos. De esta manera, la congelación permite que los alimentos conserven en gran proporción sus propiedades organolépticas y valor nutricional, aunque el efecto de la congelación en las características del producto depende de la velocidad del proceso (Camacho, Ramirez, y Moreno, 2005).

1.3.1.1 Fundamentos

La congelación de los alimentos implica el retiro de cierta cantidad de calor, tanto sensible como latente. El retiro de calor sensible antes del punto inicial de congelación permite la disminución de temperatura del alimento hasta alcanzar dicho punto. Posteriormente, es retirado calor latente, provocando el cambio de estado del agua del alimento de líquido a sólido. Después del punto de congelación se continúa retirando calor sensible hasta alcanzar la temperatura deseada.

De esta forma, cuando se elimina calor de una masa de agua pura a una velocidad de enfriamiento constante, su temperatura desciende hasta alcanzar los 0°C , momento en que empieza a separarse cierta cantidad de hielo. La temperatura permanece constante hasta que toda el agua es transformada en hielo, debido a que el calor se elimina de la masa de agua en



forma de calor latente (Martínez, 1998). Después de la formación de la transformación total de hielo la temperatura desciende de nuevo, tal como se representa en la gráfica a de la figura 10.

La evolución de la temperatura con el tiempo durante el proceso de congelación es denominada curva de congelación. En el caso de la congelación de alimentos dicha curva varía de acuerdo con los siguientes factores:

- Tipo de congelación
- Tamaño y forma del alimento
- composición química y propiedades físicas del alimento

En la gráfica b de la Figura 10 se muestra el curso típico del proceso de congelación de un alimento, donde la presencia de solutos disueltos cambia la curva de congelación del agua en un alimento con respecto al agua pura como consecuencia del descenso del punto inicial de congelación, presentándose así, tres diferentes etapas que corresponden a las fases de la congelación. En la primera fase (A-B) se produce el enfriamiento del producto a congelar, desde la temperatura inicial hasta el punto inicial de congelación. El tramo B-C corresponde a la congelación propiamente dicha, donde la concentración del jugo celular aumenta al incrementarse la cantidad de agua congelada, disminuyendo a la vez constantemente el punto crioscópico. En el punto en que la curva comienza bruscamente a caer (C) se inicia una nueva fase, que es el post enfriamiento del producto congelado. En esta fase (C-D) disminuye la temperatura del alimento congelado, pudiendo finalizar aquí el proceso tecnológico (Martínez, 1998).

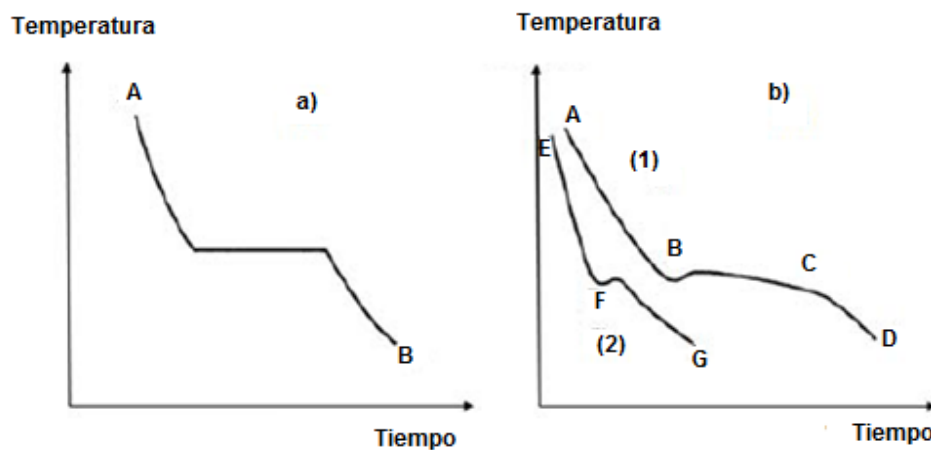


Figura 10. Curvas de congelación a) Curva típica de congelación del agua, b) Curvas de congelación de alimentos

Fuente: Martínez, 1998.



La mayor parte de los alimentos con fase líquida comienza a formarse hielo por debajo de -1°C y es frecuente además que se produzcan fenómenos de subenfriamiento, es decir, el descenso de la temperatura por debajo del punto de congelación sin que se formen los cristales de hielo correspondientes.

La curva (1) de la gráfica (b) representa el proceso de congelación típico de un alimento con velocidad de congelación lenta, mientras que la curva (2) pertenece al curso del proceso de congelación rápida de un alimento. Se muestra que el subenfriamiento va seguido de un ligero aumento de temperatura, asociado a la generación del correspondiente calor de formación de los primeros cristales de hielo. Por otra parte, la separación de hielo de la fase líquida implica un progresivo incremento en la concentración de solutos y por tanto un progresivo descenso de la temperatura de congelación. Por esta razón, la curva de congelación de un alimento (igual que la de una disolución) no presenta una meseta como la del agua pura, sino un tramo de menor pendiente que corresponde a la eliminación tanto de calor latente del hielo en formación como de calor sensible correspondiente al enfriamiento del agua residual necesario para la progresiva congelación.

1.3.1.2 Descripción del proceso de congelación

El agua es un componente fundamental de las materias primas y de los productos alimenticios, cuyo contenido está sometido a grandes oscilaciones.

En los alimentos, el agua nunca aparece en estado puro, sino en forma de soluciones; por añadidura una parte del agua se halla firmemente ligada en las estructuras proteicas y polisacáridos. Estos hechos influyen esencialmente sobre las propiedades físicas del agua y también sobre el propio proceso de congelación. El agua forma con estas sustancias una solución con dispersión de las moléculas. Esto motiva la modificación de las peculiares características físicas del agua, disminuyendo el punto inicial de congelación, aumentando la temperatura de ebullición y reduciendo la tensión de vapor de agua sobre la solución.

Por otra parte, el proceso de congelación de los sistemas biológicos (productos animales o vegetales) cursa de manera algo distinta a la congelación de soluciones físicas. La principal diferencia resulta en la constitución tisular de dichos productos.



Los jugos celulares están suspendidos e incluidos en el interior de una membrana celular que posee propiedades especiales en estos casos el proceso de congelación provoca la inhibición del desarrollo de los procesos biológicos, además de las manifestaciones normales que son específicas de las soluciones.

Al igual que en las soluciones, el punto inicial de congelación de los sistemas biológicos depende de la concentración del jugo celular. Esta temperatura no es constante, ni se mantiene en un punto determinado. A medida que progresa la congelación de una cantidad cada vez mayor de agua y aumenta la concentración de la solución residual, disminuye la temperatura crioscópica del sistema. De aquí que la temperatura en la que se inicia la cristalización sea más correcta y conveniente denominarla temperatura crioscópica inicial, o bien, punto inicial de congelación.

El punto inicial de congelación de carne es de -1°C , posteriormente oscila entre -3 y -6 , siendo la temperatura inicial de cristalización del hielo en las células aproximadamente -4°C inferior a la temperatura de cristalización de los jugos tisulares de los espacios intracelulares.

La disposición tisular de las materias primas y las suspensiones contenidas en el seno de las células favorecen la formación de numerosos núcleos de cristalización. Por consiguiente, en el curso de la congelación se depositan en la superficie de los productos cristales de escarcha que también constituyen núcleos de cristalización. A partir de la cristalización de las capas superficiales, las porciones profundas del alimento comienzan a cristalizar, por lo que la congelación de alimentos, sobre todo en aquellos de gran tamaño, debe entenderse como un crecimiento de cristales que se inicia en la capa superficial y luego prosigue hacia el interior (Gruda, 1986).

1.3.1.3 Influencia de la velocidad de congelación y tamaño de los cristales de hielo

En la tecnología de la congelación se pueden distinguir cuatro métodos de acuerdo a la velocidad de congelación. En el cuadro 4 se muestra el rango de velocidades y tiempos de congelación para cada uno de los métodos.



Cabe señalar que existe diferencia entre la velocidad de congelación expresada como el cociente de la diferencia entre la temperatura inicial de congelación y la temperatura final del producto, dividiendo entre el tiempo de congelación ($^{\circ}\text{C}/\text{h}$) y la velocidad del frente del hielo (cm/h), definida como la rapidez con la cual se desplaza a través del producto (Camacho, 2005).

Cuadro 4. Métodos de congelación: velocidades y tiempos de congelación

Método de congelación	Velocidad del frente de hielo (cm/h)	Velocidad de congelación	Tiempo de congelación
Muy lenta	<0.1	1-2 $^{\circ}\text{F}/\text{h}$	>24 h
Lenta	0.1 a 0.5	2-20 $^{\circ}\text{F}/\text{h}$	3-72 h
Rápida	0.5 a 5	1-100 $^{\circ}\text{F}/\text{min}$	<30 min.
Ultra rápida	>5	9-180 $^{\circ}\text{F}/\text{s}$	Segundos

Fuente: (Camacho, 2005).

La formación de cristales de hielo ocurre en dos etapas: la nucleación y el crecimiento de cristales. La nucleación es la iniciación de la congelación e implica la presencia o formación de pequeños núcleos que son los centros de los cristales que se forman. El crecimiento de cristales ocurre solo después que los núcleos se han formado y excedido un tamaño crítico.

La velocidad de crecimiento de cristales aumenta moderadamente a medida que disminuye la temperatura del producto. El desarrollo de cristales puede ocurrir a temperaturas muy próximas al punto de fusión y la velocidad de crecimiento aumenta moderadamente al aumentar la velocidad de remoción de calor hasta que las bajas temperaturas producen altas viscosidades y la velocidad de crecimiento de cristales disminuye.

El tamaño del cristal está directamente relacionado con el número de núcleos que se forman durante la congelación; la formación de pocos núcleos da como resultado pocos cristales grandes, mientras que el desarrollo de varios núcleos produce muchos cristales pequeños. Esto indica que el tamaño de los cristales en un producto está relacionado directamente con el proceso de nucleación, pero la nucleación depende del grado de subenfriamiento logrado y en consecuencia, el tamaño de los cristales obtenido se vuelve dependiente de la velocidad de congelación.



De este modo, el tamaño medio de los cristales en el producto variara inversamente con el número de núcleos; y el número de núcleos puede controlarse mediante la velocidad de remoción de calor. Así, la calidad de los alimentos congelados se encuentra influenciada por la velocidad con que se produce la congelación.

Diversas características de calidad están relacionadas con el tamaño de los cristales el cual es una consecuencia de la velocidad con que se produce la congelación. El principal efecto de la congelación sobre la calidad de los alimentos es el daño que ocasiona en las células el crecimiento de los cristales de hielo.

Si la congelación es lenta, los primeros cristales serán grandes y aparecerán esencialmente en el exterior de las células. Estos grandes cristales provocan compresión mecánica, tendiendo a aplastar las células. Cuando la congelación es rápida, aparece una multitud de pequeños cristales tanto en el interior como en el exterior de las células (Mafart, 1994). La congelación de los tejidos se inicia por la cristalización del agua en los espacios extracelulares puesto que la concentración de solutos es menor que en los espacios intracelulares.

Debido a las propiedades permeables de la membrana celular, en la congelación puede producirse la sustracción de agua de la célula. A partir de las células con jugo hipertónico se difunde el agua hasta los espacios intercelulares, donde se congela. Este efecto es conocido como crio concentración o crio ósmosis, se introduce por un desequilibrio osmótico y migración de agua hacia el exterior, como consecuencia de la diferencia de la presión de vapor de los cristales de hielo con respecto a la del interior de las células, lo que provoca la deshidratación progresiva de las células, la cual no es reversible al descongelar, debido a la semipermeabilidad de las paredes celulares (Brennan, 2008).

El curso de este proceso depende de la velocidad de congelación; cuando esta es lenta, la deshidratación progresa hasta la extracción de toda agua libre, quedando solo el agua ligada dentro de la célula; de esta forma, en un tejido congelado bajo estas condiciones, todo el hielo aparece fuera de las células (Gruda, 1986).



En esta situación se forman grandes cristales de hielo aumentando los espacios extracelulares, mientras que las células disminuyen considerablemente su volumen. Este desplazamiento del agua y la acción mecánica de los cristales de hielo sobre las paredes celulares provocan afectaciones en la textura y dan lugar a la aparición de exudados durante la descongelación.

En cambio, cuando la congelación es rápida la cristalización se produce casi simultáneamente en los espacios extracelulares e intracelulares. El desplazamiento de agua es pequeño, produciéndose un gran número de cristales pequeños, por lo que las afectaciones sobre el producto resultaran considerablemente menores en comparación con la congelación lenta. No obstante, las velocidades de congelación muy elevadas pueden provocar en algunos alimentos, tensiones internas que pueden causar el agrietamiento o rompimiento de sus tejidos (Gruda, 1986).

1.3.1.4 Daños mecánicos

El agua pura 0°C incrementa su volumen un 9% aproximadamente al congelarse a la misma temperatura. Por lo tanto, la formación de hielo ira siempre acompañada de un incremento en el volumen ocupado en la estructura del producto congelado, que producirá daños de mayor o menor magnitud de acuerdo con las características del tejido que se esté congelando. Los materiales con un elevado contenido de agua y pocos espacios intercelulares con aire son especialmente susceptibles a este tipo de daño, ya que no podrán acomodar en sus espacios intercelulares los cristales en crecimiento, minimizando los efectos del incremento de volumen.

La dilatación del agua que se produce varía considerablemente de acuerdo con los siguientes factores:

- Contenido de agua: a mayor contenido de agua, mayor aumento de volumen
- Disposición celular: los tejidos poseen espacios intercelulares, que absorben los incrementos internos de volumen sin que se aprecien cambios importantes en el volumen global.
- Concentración de solutos: las concentraciones elevadas de solutos disminuyen el punto de congelación (Fellows, 1994).



1.3.1.5 Desnaturalización proteica por aplicación de frío

El proceso de congelación puede provocar profundas alteraciones en las proteínas de la carne. Estos cambios comprenden tanto la desnaturalización propiamente dicha, es decir, el desdoblamiento de las moléculas, como las reacciones secundarias que se producen entre los grupos químicos con capacidad de reacción de diferentes proteínas y de otros componentes, lo que origina combinaciones diversas (enlaces cruzados) y la formación de agregados. Las proteínas pierden por lo menos parte de su solubilidad y pueden exhibir una actividad enzimática mucho más baja (Lewin, 1974). Las proteínas pueden desnaturalizarse por la acción catalítica del hielo y sales inorgánicas, por la fijación de ácidos grasos y productos de la oxidación de los lípidos, provocando enlaces cruzados y otras reacciones posibles que llevan a la formación de nuevos enlaces covalentes en las proteínas desnaturalizadas.

La cristalización del hielo puede alterar las estructuras acuosas que rodean las áreas de interacciones hidrofóbicas en las proteínas. También puede romper las interacciones hidrofóbicas-hidrofílicas intermediadas por el agua, que contribuyen a afianzar la conformación nativa de las moléculas de proteína. Aumentando la concentración de sales en los espacios acuosos sin congelar, puede disminuir la hidratación de las proteínas, ya que entonces los iones inorgánicos concentrados entran en competencia por las moléculas de agua. Los cationes divalentes son capaces de formar enlaces cruzados al reaccionar con cadenas laterales de ácidos ionizados en las proteínas. Estas interacciones se pueden favorecer por los ligeros desvíos que experimenta el pH en los productos congelados. Por adición, las sales inorgánicas pueden participar en la desnaturalización por congelación de las proteínas catalizando la hidrólisis y autooxidación de los lípidos (Leygonie *et al.*, 2012).

La desnaturalización provoca diversos efectos en la proteína:

- Una drástica disminución de su solubilidad, ya que los residuos hidrofóbicos (que normalmente se agrupan en el interior de la molécula) aparecen en la superficie y provocan la agregación y precipitación de moléculas proteicas.
- Cambios en las propiedades hidrodinámicas de la proteína: aumenta la viscosidad y disminuye el coeficiente de difusión.
- Pérdida de las propiedades biológicas: las proteínas desnaturalizadas ya no pueden llevar a cabo su función biológica (Berg, 2008).



Los cambios en la estructura de las proteínas mencionados anteriormente pueden deberse a los efectos explicados a continuación.

- a) Efecto de la fuerza iónica: Un aumento de la fuerza iónica del medio provoca una disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que los solutos compiten por el agua y rompen los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas, de forma que las moléculas proteicas se agregan y precipitan. En muchos casos, la precipitación provocada por el aumento de la fuerza iónica es reversible (Koolman y Röhm, 2004).
- b) Efecto del pH: Los iones H^+ y OH^- del agua provocan efectos parecidos, pero además de afectar a la envoltura acuosa de las proteínas también afectan a la carga eléctrica de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta alteración de la carga superficial de las proteínas elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria y a menudo provoca su precipitación. La solubilidad de una proteína es mínima en su punto isoeléctrico, ya que su carga neta es cero y desaparece cualquier fuerza de repulsión electrostática que pudiera dificultar la formación de agregados (Berg, 2008).

1.3.2 Descongelación

Los alimentos congelados deben tratarse antes de su empleo, con objeto de prepararlos para el consumo o para posteriores preparaciones, de acuerdo con la clase y finalidad de utilización y de la naturaleza del tratamiento tecnológico previo a la congelación. Estas operaciones, denominadas muchas veces en la tecnología frigorífica como restitución de los de los alimentos congelados, constituyen la última fase del tratamiento de congelación y tienen por objeto poner a los productos en un estado lo más cercano posible al que exhibían antes de ser congelados (Gruda, 1986). Fundamental importancia tiene a este respecto la descongelación, es decir, el proceso de elevación paulatina de la temperatura del producto congelado hasta una temperatura superior al punto inicial de congelación (Plank, 1978).



La finalidad de la descongelación es conseguir la fusión de los cristales de hielo mediante el suministro de cierto tipo de energía al producto, de tal forma que recupere al máximo sus características iniciales, con un mínimo de pérdida de su calidad.

Al ser la conductividad térmica del agua líquida menor que la del hielo, la transmisión de calor externo resulta más difícil a medida que progresa la descongelación del alimento.

- El proceso más largo que la congelación; como la conductividad térmica del producto es menor en estado descongelado que congelado, el calentamiento por el exterior es frenado y la resistencia térmica aumenta progresivamente a medida que se propaga la fusión.
- La descongelación es una parte importante en los procesos alimenticios; las temperaturas usadas no deben exceder valores críticos de sensibilidad. La descongelación es completa cuando la temperatura en el centro del producto es de 0°C y no queda más hielo en el producto. Los tipos de daños que pueden presentarse en alimentos durante la congelación rápida también ocurren en la congelación lenta; ciclos repetidos de congelación y descongelación determinan considerablemente la calidad del producto.

El proceso de descongelación consta de 3 etapas: 1) atemperado, 2) descongelación, 3) calentamiento al punto de temperatura final.

Si la descongelación es lenta, existe un gradiente de concentración que provoca migración del agua; llevando a la misma temperatura, las soluciones más concentradas (últimas en congelar) son las primeras en descongelar. Estas se llenan mezclas eutécticas, dichas mezclas son una solución de una determinada composición que congela (o descongela) y se concentra más debido a la separación del hielo puro. Si la descongelación es lenta, los constituyentes tienen más tiempo para estar en contacto con mezclas eutécticas concentradas y los daños por concentración se intensifican.

1.3.3 Calidad

Se ha hecho hincapié en la relación existente entre las técnicas de congelación y descongelación de productos alimenticios concretos. La calidad del producto descongelado viene determinada por su estado en el momento de la congelación y por los diversos procesos que acontecen en la congelación.



La estabilidad y las propiedades de las macromoléculas de las células de los alimentos dependen de la interacción de sus grupos reactivos con la fase acuosa que los rodea, la congelación altera dichas interacciones y los cristales de hielo modifican la textura en los alimentos. La rigidez de los tejidos está determinada por la presión hidrostática de las células, y es la membrana la que retiene el agua y por lo tanto la que mantiene la frescura. Los componentes de las membranas son lipoproteínas formadas por enlaces débiles (puentes de hidrogeno y uniones hidrófobas) muy dependientes de la temperatura, lo que conlleva a su fácil disociación y a la liberación de agua durante la descongelación; esto ocasiona que los tejidos de los alimentos pierdan su rigidez y frescura y, en ocasiones se eliminen nutrientes, como vitaminas hidrosolubles, en el agua de descongelamiento (Badui, 2006).

En el curso de la descongelación, las membranas de las células muertas se vuelven muy permeables, de manera que el contenido vacuolar (sales, enzimas, pigmentos, etc.). El exudado comienza a difundirse durante la descongelación, reduciendo el valor alimenticio. La cantidad exudada depende de la naturaleza del producto, de la rapidez de congelación y descongelación, y del estado fisiológico.

Es imposible desde el punto de vista teórico lograr una completa reversibilidad de los fenómenos biofísico-químicos que cursan en el producto, no obstante, se puede lograr un grado de reversibilidad en el cual resulten insignificantes las alteraciones originadas y el producto descongelado se diferencie muy poco del producto fresco. Así mismo, por lo general, no se consigue evitar durante la descongelación la condensación de humedad ambiental en la superficie del producto inclusive se recomiendan aquellos métodos de descongelación donde se humedece la superficie; si se opta por estos procedimientos, es preciso respetar las normas higiénicas (Fellows, 1994).

1.3.3.1 Conservación de la cadena de frío

El concepto de conservación por congelación de alimentos no solo comprende el proceso de congelación, sino el conjunto de actividades que deben realizarse para suministrar al consumidor un producto de calidad adecuada. Este conjunto de operaciones, que comienza en el momento de obtenerse la materia prima y concluye con la congelación del producto terminado antes del consumo, recibe el nombre de cadena de frío.



Los eslabones de esa cadena son los almacenes frigoríficos de producción, depósito y distribución, instalaciones frigoríficas de los comercios, así como vitrinas de congelación y los congeladores caseros; todos los eslabones tienen la misma importancia.

El elemento que une los eslabones de la cadena entre sí es el transporte frigorífico. La instauración de unas condiciones de temperatura constantes en grandes redes de distribución de productos congelados exige una gigantesca concentración de medios técnicos y financieros, así como la garantía de una eficaz colaboración e integración organizativa de todos los eslabones del sistema.

Una cadena frigorífica de funcionamiento racional debe ser ininterrumpida, compleja, extensa (tiempo y espacio), uniformemente desarrollada y adecuada a las especificaciones propias de cada rama en particular, la interrupción de este sistema en cualquier punto equivale a merma de calidad o a la descomposición del producto cuando este no se utiliza en un plazo determinado.

1.4 Fundamentos histológicos para el análisis de muestras cárnicas

En sentido estricto la histología es el estudio de los tejidos, es decir, de un sistema de organización celular que comprende diferentes tipos de células. En la actualidad se distinguen cuatro tejidos básicos (Figura 11) tejido epitelial, tejido conjuntivo, tejido muscular y tejido nervioso. Todos los órganos están compuestos por variantes específicas de los cuatro tejidos básicos (Welsch, 2006).



Figura 11. Tejidos básicos

Fuente: www.la-carne-y-productos-cárnicos-alimentos, 2009.



Dentro de los tejidos musculares existen dos variantes, la primera de ellas denominada músculo estriado que se subdivide en esquelético y cardíaco, la otra variante corresponde al músculo liso.

1.4.1 Preparación de cortes histológicos

1.4.1.1 Fijación de muestras para microscopía

La fijación es un método por el cual se preserva la muestra biológica lo más cercano a las condiciones del tejido vivo, para obtener preparados duraderos que conserven estructura y relaciones morfológicas, así como la composición química de células y tejidos, permitiendo la aplicación de los protocolos de coloración o identificación de las estructuras que los conforman. La fijación de tejidos y células se basa en la estabilización de las proteínas que los conforman, mediante la formación de puentes entre ellas, provocando un estado de gel muy estable. La fijación es el procedimiento más importante de toda la técnica histológica, ya que si no se realiza adecuadamente cualquier proceso aplicado posteriormente no tendrá el resultado esperado (Chávez y Angeles, 2010).

Para la adecuada fijación de un tejido se cuenta con diferentes mecanismos, la más empleada corresponde a la fijación química por medio de la acción de diferentes y variados reactivos clasificados arbitrariamente de la siguiente forma:

- Oxidantes, tetraóxido de osmio, bicromato de potasio bicloruro de mercurio, ácido pícrico y permanganato de potasio (coagulación).
- Reductores, aldehídos, alcoholes y acetona (precipitación)
- Aldehídos, paraformaldehído, formaldehído y glutaraldehído (coagulación)
- Desnaturalizantes de proteínas, ácido acético y alcoholes (precipitación)
- Promotores de puentes, carbodiimidas y microondas (coagulación)
- Mezclas, combinaciones que aprovechan características de sus componentes individuales

La correcta fijación de una muestra depende principalmente de lo que se desea observar, hacer aparente o demostrar; el tipo de fijador más adecuado para el objetivo que se persigue, tiempo de fijación y relación volumen/volumen fijador/muestra, contracción y endurecimiento. Para el



fijador: la temperatura más adecuada, osmolaridad, concentración de iones (pH), velocidad de penetración, variación de volumen y efecto mordente. La fijación permite:

- La protección del ataque bacteriano o putrefacción.
- Evitar la autólisis debida a enzimas propias.
- Insolubilizar la mayoría de los constituyentes celulares.
- Evitar artefactos como contracciones o retracciones.
- Servir como mordente para procesos posteriores de coloración o impregnación.
- Evitar la disolución y pérdida de algún constituyente particular de la célula o tejido.
- Conservar funciones y propiedades químicas.
- Mantener las características físicas de macromoléculas con actividad biológica.

Formaldehído: el formol es el fijador más utilizado, a causa de su bajo precio y la facilidad de su empleo. Es un fijador importante a causa de su poder coagulante y su notable capacidad de penetración. El formol forma parte de gran cantidad de mezclas fijadoras y es uno de los mejores fijadores para el sistema nervioso y para las mitocondrias.

El examen microscópico de material biológico requiere que la muestra en estudio sea tan delgada como para dejar pasar la luz o los electrones y, dado que los órganos son por lo general muy gruesos, necesitan ser reducidos a cortes finos. Para lograrlo se requiere que los tejidos u órganos sean sometidos a una serie de tratamientos que se describirán enseguida (Rangel, 2011).

1.4.1.2 Montaje de la muestra por infiltración en parafina

Con este método se obtienen preparados permanentes (laminillas o láminas) y es el más comúnmente empleado en los laboratorios de histología.

Con el fin de obtener cortes delgados para su observación al microscopio, los tejidos deben ser infiltrados e incluidos en una sustancia de consistencia firme que puede ser gelatina, celoidina, parafina o resinas de tipo epóxico. La más común para microscopía óptica es la parafina, mientras que para microscopía electrónica lo son las resinas epóxicas como el epon o la araldita.



Para que el tejido una vez fijado pueda ser infiltrado en parafina debe pasar antes por los siguientes tratamientos:

- a) Lavado. En agua corriente para eliminar el exceso de fijador y evitar la formación de cristales.
- b) Deshidratación. El agua que contienen los tejidos es extraída de manera gradual por medio de inmersiones en concentraciones crecientes de etanol, generalmente desde 60 ó 70% hasta el alcohol absoluto (100%).
- c) Aclaración. El etanol que está ahora presente en los tejidos debe ser sustituido por un líquido miscible tanto en el mismo alcohol como en la parafina; se realiza por medio de inmersiones de la muestra en alguno de estos reactivos xileno, benceno o tolueno. Cuando las muestras son embebidas en estas sustancias se vuelven traslúcidas, por lo que esta etapa recibe el nombre de aclaración o diafanización. La deshidratación y la aclaración se pueden lograr simultáneamente con inmersiones en dioxano.
- d) Infiltración. Las muestras son colocadas en recipientes que contienen parafina para uso histológico, a 55-60°C (su punto de fusión), por lo que, debido al calor y a la diferente concentración, el xileno o benceno se evaporan y los espacios ocupados por ellos lo son ahora por la parafina, que al solidificarse confiere al tejido consistencia suficiente para ser cortado. La deshidratación, aclaración e infiltración pueden realizarse de manera manual o mecánica en un aparato denominado histokinette o procesador automatizado de tejidos.
- e) Inclusión. Ya que la muestra está infiltrada, se coloca en un recipiente cúbico o rectangular (similar a los usados en la elaboración de cubitos de hielo) que contiene parafina fundida, dejándose solidificar a temperatura ambiente. Se obtiene de esta manera un bloque de parafina que sirve de protección y soporte a la muestra de tejido y facilita además su manejo. Esta etapa puede efectuarse de manera manual o con ayuda de un aparato que recibe el nombre de dispensador de parafina.
- f) Corte. Como la finalidad de todos estos pasos es poder observar los tejidos con el microscopio, es necesario reducir las piezas histológicas a delgadas secciones. Las secciones finas y parejas se obtienen con el micrótomo. Este aparato consiste básicamente en una base pesada que soporta una superficie por la que se desliza una cuchilla, un tornillo que acerque el material y lo ponga al alcance del filo de la navaja, de modo que



siempre su avance ofrezca la misma medida del material, ideales para la observación histológica.

- g) Montaje. Los cortes obtenidos con el micrótopo se extienden sobre agua caliente a 40°C que contiene grenetina diluida para que los cortes se adhieran al portaobjetos. Esta etapa se realiza con la ayuda de los aparatos llamados baño de flotación de tejidos y platina térmica. Una vez realizado lo anterior, la muestra queda lista para el siguiente proceso que es la coloración.
- h) Tinción: la más empleada en microscopia es la denominada hematoxilina-eosina. La hematoxilina colorea la mayoría de los componentes nucleares, como son la cromatina y los nucléolos en tono purpura mientras que la eosina tiñe el citoplasma en tonos rosas (Garrido, Salinas, & Cornejo, 2003).
- i) Conservación. Para la conservación de la muestra coloreada se utiliza una gota de resina sintética, posteriormente se pone encima un cubreobjetos, haciendo presión para lograr la distribución uniforme de la resina, evitando así la formación de burbujas; finalmente, se deja secar un mínimo de 48 horas antes de observar en el microscopio óptico de campo claro (Rangel, 2011).



JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones realizadas hasta ahora, se han centrado principalmente en las consecuencias que conllevan los repetidos ciclos de congelación-descongelación en la carne y han concluido que una congelación inadecuada influenciada principalmente por la velocidad, el método y las fluctuaciones de temperatura, pueden dar lugar a importantes deterioros, como daños mecánicos causados por la formación de grandes cristales de hielo entre las fibras musculares provocando rupturas y desprendimiento de las mismas. Tradicionalmente se ha pensado que la agregación y desnaturalización de las proteínas podría ser resultado de dicho procesamiento ya que debido a la eliminación osmótica de agua existe un incremento de la concentración de solutos debido al aumento de la fuerza iónica intracelular, ocasionando una severa disminución en las cualidades sensoriales como cambios en textura, jugosidad, color y sabor.

Es por esto, que el objetivo de este estudio fue evaluar estos cambios mediante el desarrollo de un análisis electroforético e histológico, que permitan dar una resolución precisa de los efectos de la congelación-descongelación-recongelación, y así establecer los mecanismos que intervienen en el deterioro de las cualidades de la carne.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los patrones electroforéticos de las proteínas de la carne refrigerada de res sometida a ciclos de congelación-descongelación por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida PAGE y pruebas histológicas para demostrar los cambios en la microestructura.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de dos soluciones de extracción y los patrones electroforéticos obtenidos por SDS-PAGE de las proteínas de la carne refrigerada de res y sometida a congelación, descongelación y recongelación.
2. Evaluar el efecto del manejo de la carne de res en refrigeración, congelación, descongelación y recongelación mediante la observación de preparaciones histológicas, al microscopio óptico de campo claro.

HIPÓTESIS

El ciclo de congelación-descongelación de la carne de res afecta a las proteínas propias del sistema, y los cambios podrán evaluarse mediante sus patrones electroforéticos y sus modificaciones histológicas.



CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

EXPERIMENTAL

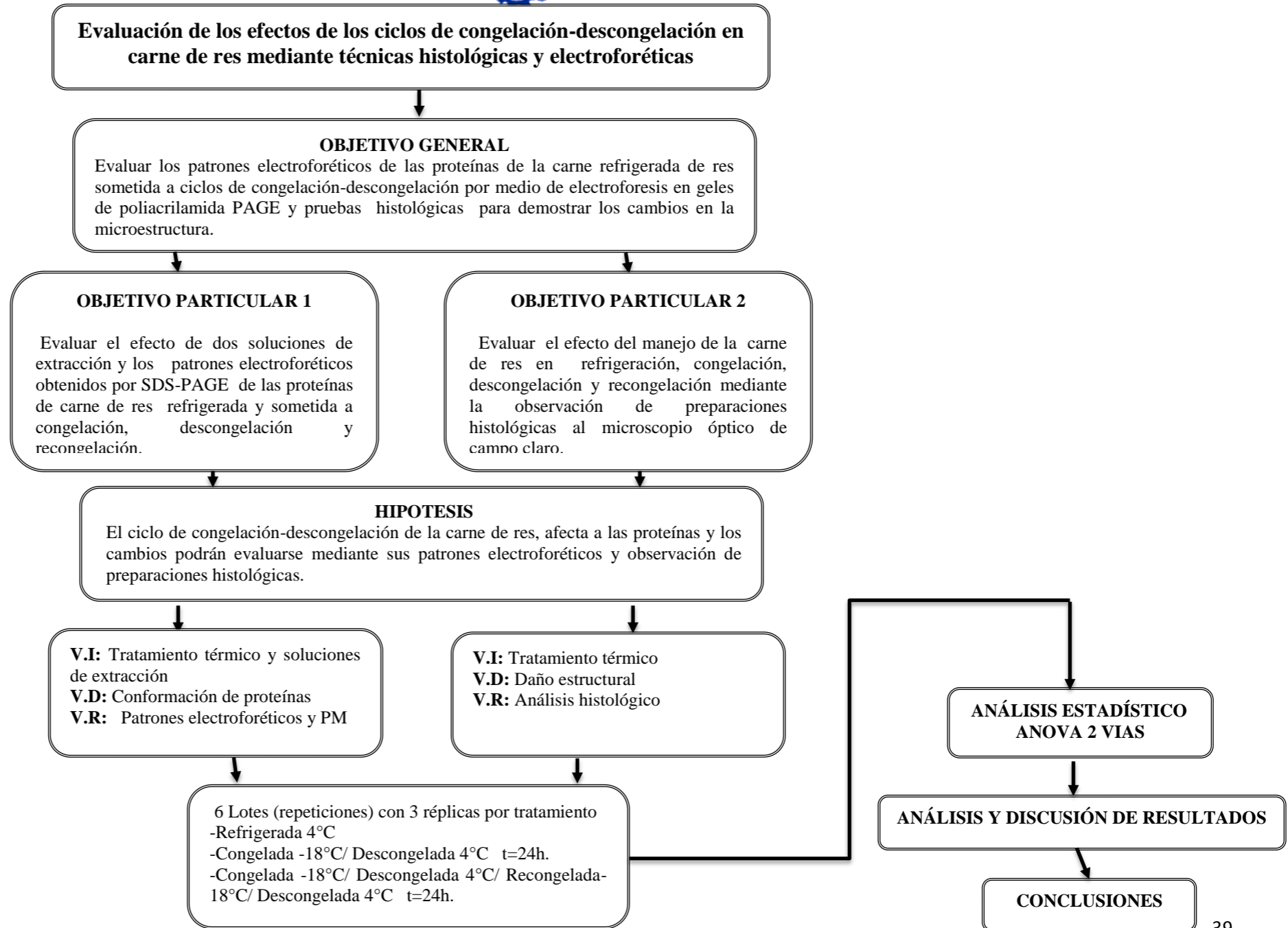


Figura 12. Cuadro Metodológico



2.1 Descripción metodológica

2.1.1 Corte de carne

Se trabajó con carne de res proveniente de bovinos (F1 Charoláis 50%, Angus 50%), de dos años de edad, alimentados con mezcla de semillas. Se recomendó al proveedor que las condiciones de sacrificio fueran constantes y bajo la NOM-008-Z00-1994; se utilizó el músculo *longissimus dorsi* entero, donde se llevó a cabo el corte de rebanadas de carne de 5 mm de espesor, en cortes transversales y longitudinales a las fibras musculares, mediante el uso de utensilios como cuchillo, bisturí, tabla de picar, las mediciones de las geometrías se llevaron a cabo con un vernier.



Figura 13. Corte de carne de res del músculo *longissimus dorsi*

Se utilizaron 6 lotes, por cada lote se cortaron un mínimo de 3 rebanadas, se envasaron individualmente en bolsas herméticas, y se sometieron a los siguientes tratamientos:

- Refrigerada dentro de 24-h desde el sacrificio, almacenada en cámara de refrigeración a 4°C
- Congelación a -18°C durante 24 h en cámara por convección forzada, descongelación en cámara de refrigeración a 4°C por 24 h.
- Congelación a -18°C durante 24 h en cámara por convección forzada, descongelación en cámara de refrigeración a 4°C por 24 h, recongelación a -18°C durante 24 h en cámara por convección forzada, descongelación en cámara de refrigeración a 4°C por 24 h.

La congelación y recongelación de la carne se llevó a cabo en cámara por convección forzada Marca Frigidaire modelo FFC0923D, el descongelamiento se realizó en cámara de refrigeración Marca Nieto Modelo REB-634.



Todos los ensayos específicos se llevaron a cabo por triplicado para probar los efectos de los ciclos de congelación-descongelación; llevando a cabo un análisis de varianza (ANOVA DE 2 VÍAS) para determinar la significancia de los efectos principales.

2.1.2 Extracción de proteínas

2.1.2.1 Proteínas sarcoplásmicas

Para la extracción de proteínas sarcoplásmicas, se pesaron 4g de carne por cada tratamiento, utilizando una solución extractora; se diluyeron en relación 1:10 p/v con fosfato de sodio 0.03M con un pH de 7.4 (Anexo 1), la carne se sometió a homogenización con 40 mL de solución extractora, durante 4 minutos como se muestra en la Figura 14a, posteriormente se distribuyó la muestra utilizando una micro pipeta Eppendorf. En tubos eppendorf de 2mL (Figura 14b), cada tubo es colocado en una centrifuga refrigerada marca Dupont Sorvall RMC 114, durante 20 minutos a 2°C con una velocidad de 10,000 rpm (Figura 14c).

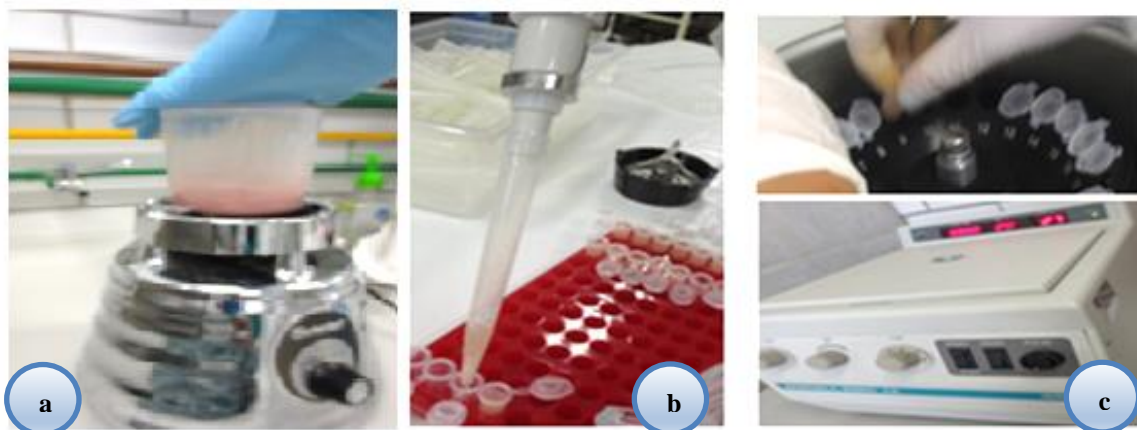


Figura 14. Extracción de proteínas sarcoplásmicas



El sobrenadante resultante de la centrifugación son las proteínas sarcoplásmicas y una vez terminada esta operación se retiró el sobrenadante como se muestra en la Figura 15 y se conservó en refrigeración a 4°C.

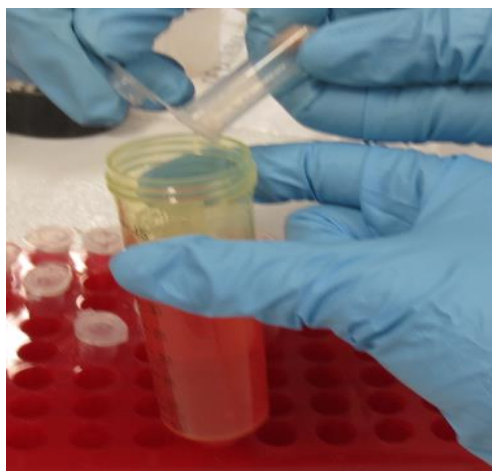


Figura 15. Recolección de proteínas

2.1.2.2 Proteínas miofibrilares

El sedimento resultante de la extracción de las proteínas sarcoplásmicas se homogeneizó a diferentes condiciones de extracción utilizando las siguientes soluciones:

- a) Condiciones reductoras: Urea 8M + β -mercaptoetanol 1% v/v pH=7
- b) Condiciones desnaturalizantes: Tris/HCl 1M + sodio dodecil sulfato 1% p/v pH=7

Los homogeneizados se centrifugaron bajo refrigeración a 2°C durante 20 minutos con una velocidad de 10,000 rpm, los sobrenadantes contienen proteínas miofibrilares, una vez terminado el proceso se conservan en refrigeración a 4°C.

2.1.3 Cuantificación de proteínas método de Bradford

Para la construcción de la curva patrón, se preparó una solución patrón de albumina sérica bovina (BSA) marca Bio Rad #500-0206, a partir de esta solución se tomaron las muestras para preparar los estándares de referencia, con dichos valores se construyó una curva patrón la cual se comparó con las muestras experimentales y se determinó la concentración de proteína total, siguiendo el protocolo que a continuación se describe:



Soluciones	Concentración de proteína (mg/mL)
Estándar BSA	1.40±2
Dilución estándar 1:1 con agua destilada	0.70

1. Tomar una alícuota de 178 μL de la dilución estándar y aforar a 10 mL con agua destilada. Stock BSA
2. En 9 tubos eppendorf de 2 μL (Figura 16a) diluir agua destilada y stock BSA como se muestra en el Cuadro 4
3. Una vez diluidos, agregar 200 μL reactivo de Bradford azul de commasie Bio Rad #500-0205 a 4°C y mezclar por inversión o vortex (Figura 16b)
4. De cada tubo eppendorf tomar alícuotas de 60 μL y colocarlas en celdas o cuvettes eppendorf (Figura 16c) de plástico transparente.
5. En un biofotómetro plus marca eppendorf (Figura 16d) tomar la lectura de absorbancia a λ 595 nm después de 2 minutos y antes de media hora.

Cuadro 5. Datos para curva patrón para la determinación de proteínas

Tubo #	Agua destilada	Stock BSA	$\mu\text{g/mL}$
0	800	0	0
1	650	150	1.875
2	600	200	2.5
3	500	300	3.75
4	400	400	5
5	300	500	6.25
6	200	600	7.5
7	100	700	8.75
8	0	800	10



Figura 16. Protocolo para construcción de curva patrón de proteínas



Una vez que se obtuvieron las lecturas se construyó una curva patrón (Figura 17) que sirvió para determinar la concentración de proteína de las muestras, por interpolación.

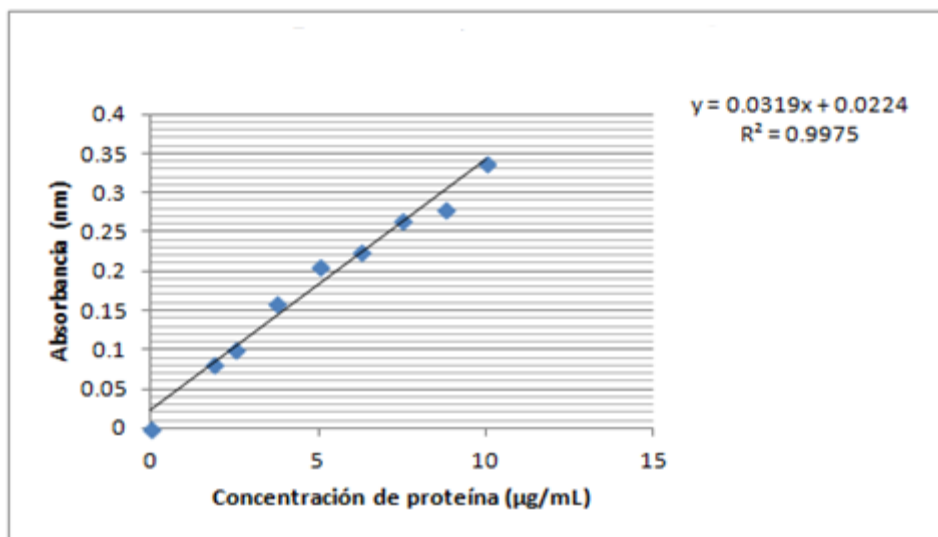


Figura 17. Curva patrón Bradford

2.1.4 SDS-PAGE

2.1.4.1 Polimerización de geles de poliacrilamida

Para la preparación del gel apilador se utilizó una concentración del 4% y para el gel de resolución una concentración del 10%, en el Cuadro 6 se observa el orden de adición y la cantidad necesaria de cada reactivo (Anexo 2) para cada gel, todo esto en base en el manual Mini-PROTEAN de Bio Rad.

Cuadro 6. Formulación de geles

Soluciones (mL)	Gel apilador 4%	Gel resolución 10%
*A	2.5	-
**B	-	2.5
DDI	6.1	4.1
SDS	0.1	0.1
Acrilamida	1.3	3.3
APS µL	50	50
TEMED µL	7	10



DDI: agua bidestilada, *Solución A 0.5M Tris- HCL 4 % Gel de apilador pH 6.8, **Solución B 1.5M Tris- HCL 10% Gel de resolución pH 8.8, TEMED Bio Rad #161-0300, APS Bio Rad #161-070

El procedimiento general para realizar los geles es el siguiente:

1. Revisión del material, es muy importante que las placas de vidrio estén limpias y secas.
2. Contar con todos los reactivos y a la concentración requerida.
3. Checar el pH de las soluciones.
4. Identificación de las partes del montaje (Figura 18).
5. Montar el soporte para el gel (Figura 19).



Figura 18. Partes de soporte para geles

6. Colocar en la parte inferior del soporte las almohadillas de soporte (color gris).
7. Colocar la placa espaciadora de 1 mm junto con una placa corta en la parte superior del mismo (Figura 19a), cuidar que las dos placas entren empalmados, en la misma posición y al mismo tiempo.
8. Deslizar las dos placas de vidrio en las cámaras de presión (Figura 19b), manteniendo la placa corta hacia la parte delantera.
9. Enganchar ambas placas de vidrio en la posición correcta a las cámaras de presión (Figura 19d), asegurarlas y se comprobar que ambas estén al ras en la parte inferior.
10. Verificar que no se presenten fugas, llenando el espacio entre ambas placas con agua destilada, y verterla después de comprobarlo y secar.



11. Colocar las cámaras de presión en el soporte, sobre las almohadillas grises, mientras que se aseguran con la palanca (Figura 19d).
12. Preparar la solución de gel de resolución (10%) (Cuadro 6) en un vaso de precipitado con todos los reactivos excepto APS y TEMED y mezclar muy bien.
13. Adicionar 50 μ L de APS y 10 μ L de TEMED mezclar bien.
14. Verter 2.5 mL de la mezcla al 10% con una micropipeta eppendorf, o hasta la marca a en la figura 20.
15. Verter 100 uL de agua destilada, con mucho cuidado, para favorecer la polimerización.
16. Dejar polimerizar el gel durante 30 minutos.

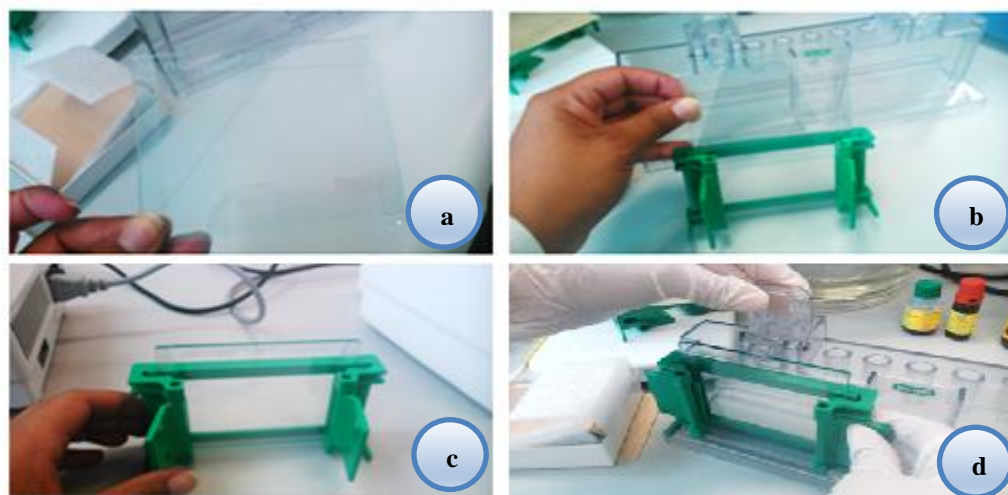


Figura 19. Ensamble del soporte y placas.

17. Retirar el agua adicionada del gel polimerizado.
18. Preparar la solución del gel de apilamiento al 4% (Cuadro 6), repitiendo los pasos 11 al 13.
19. Verter 1 mL de la solución 4% o hasta la segunda marca 2 de la figura 20. Una vez vertido, colocar los peines de 1mm entre los platos de vidrio.
20. Dejar polimerizar el gel aproximadamente 20 minutos.
21. Retirar los peines cuidadosamente y lavar con agua destilada, esto con el fin de retirar las burbujas formadas.

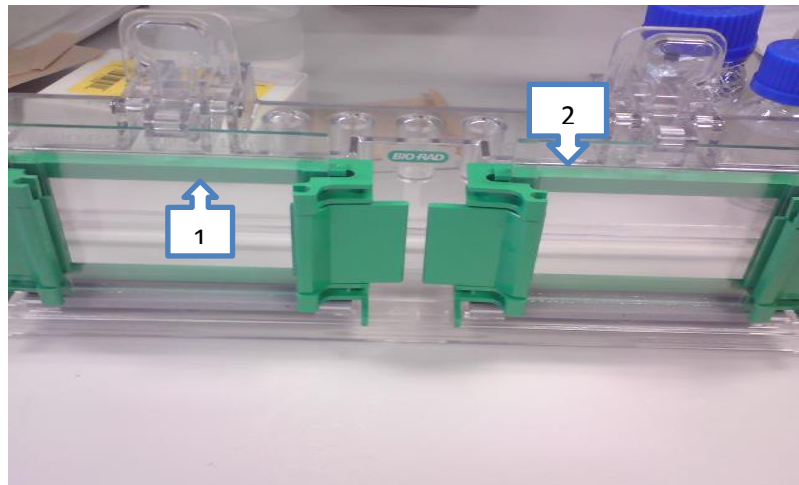


Figura 20. Preparación de geles para electroforesis

2.1.4.2 Preparación muestras de proteínas

En tubos eppendorf de 2 mL se colocan 50 μ L del extracto de proteína sarcoplásmicas o miofibrilar respectivamente, para ambas condiciones reductoras (a) o desnaturalizantes (b) se agrega el buffer de muestra (Laemmli marca Bio Rad #161-0737) cumpliendo la relación 1:1 de la siguiente manera:

- a) Reductoras: 50 μ L de proteína + 2.5 μ L β -mercaptoetanol + 47.5 μ L buffer
- b) Desnaturalizante: 50 μ L de proteína + 50 μ L buffer

Se colocaron los tubos en rejillas y se llevaron a un baño con agua caliente $\approx 85^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ durante 4 minutos como se muestra en la Figura 21.



Figura 21. Preparación de las proteínas cárnicas extraídas



2.1.4.3 Corrimiento de electroforesis SDS-PAGE

Para la electroforesis se utilizó el sistema Laemmli (1970) trabajando con geles de poliacrilamida en sistema discontinuo (4/10%), las condiciones de corrida fueron a un voltaje constante de 220 mA, durante 60 minutos.

Una vez que se tuvieron las muestras y los geles preparados, se procedió al montaje de las celdas de electroforesis para llevar a cabo la corrida (Figura 22), mediante el siguiente procedimiento:

1. Ensamblar los geles en la base de conjunto de electrodo como se muestra en la Figura 23a, con la máxima precaución de no tocar los electrodos.
2. Ya ensamblados, la base se coloca en el mini tanque con los electrodos en su color respectivo (Figura 22b).
3. Agregar aproximadamente 1L de electrodo de corrimiento (Figura 22c) a 4°C (ANEXO 2).

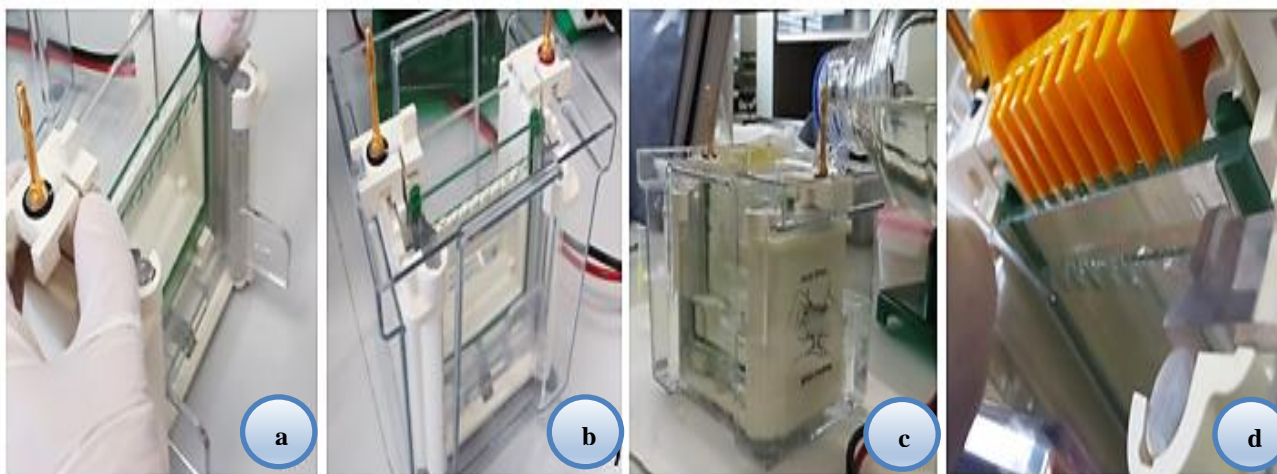


Figura 22. Montaje de celdas para electroforesis

4. Colocar la guía para poder cargar las muestras en los pozos (Figura 22d).

Se ocuparon 2 bases por tanque, en cada base se colocaron dos geles. Un gel fue utilizado para el extracto de proteínas *sarcoplásmicas* en condiciones reductoras, y otro gel para condiciones desnaturizantes, en la siguiente base se colocó un gel para proteínas *miofibrilares* en condiciones reductoras y otro en condiciones desnaturizantes. Una vez montadas las celdas, se agregaron 10 uL de las muestras que contenían 3-4 ug/uL de proteínas.



Se adicionaron 10 μ L de marcadores de peso molecular (Precision plus protein standards) Bio Rad #161-0373 (Figura 23) contienen 10 bandas de proteína de 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kDa; insulina, aprotinina, lisozima, inhibidor de tripsina, anhidrasa carbónica, ovoalbúmina, albúmina de suero bovina, fosforilasa, β -galactosidasa y Miosina respectivamente) con una precisión mayor al 95%, se eligió el pozo 1 para colocar el marcador de peso molecular (MPM) como se muestra en la Figura 24; después se colocaron las muestras de proteínas en los siguientes pozos.

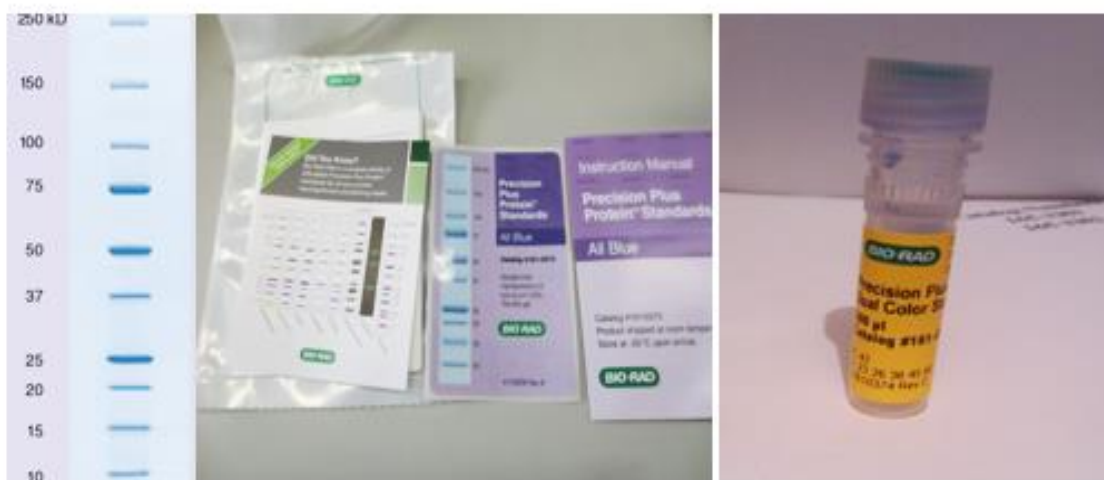


Figura 23. Marcadores de Peso Molecular

Una vez que las muestras fueron cargadas, se colocó la tapa al mini tanque y se conectó a la fuente de voltaje, la electroforesis se llevó a cabo en 60 minutos con un voltaje constante de 220 mA (Figura 25). Al término de la electroforesis se saca la base de electrodos y se procedió a desmontar los geles para su enjuague con agua destilada.

Posteriormente se desmontaron los geles de las placas de vidrio y realizó la tinción como se muestra en la Figura 26a, el gel es sumergido durante 30 minutos en una solución de tinción de azul de Coomassie Bio Rad #500-0205 (Anexo 2), posteriormente se retiró y se colocó en una solución de desteñido (Anexo 2) como se muestra en la Figura 26b, las bandas de proteínas se revelan después de 20 a 30 minutos aproximadamente. Para tener un mejor revelado, el gel se dejó en la solución en agitación durante 24 horas (Figura 26 c, d).

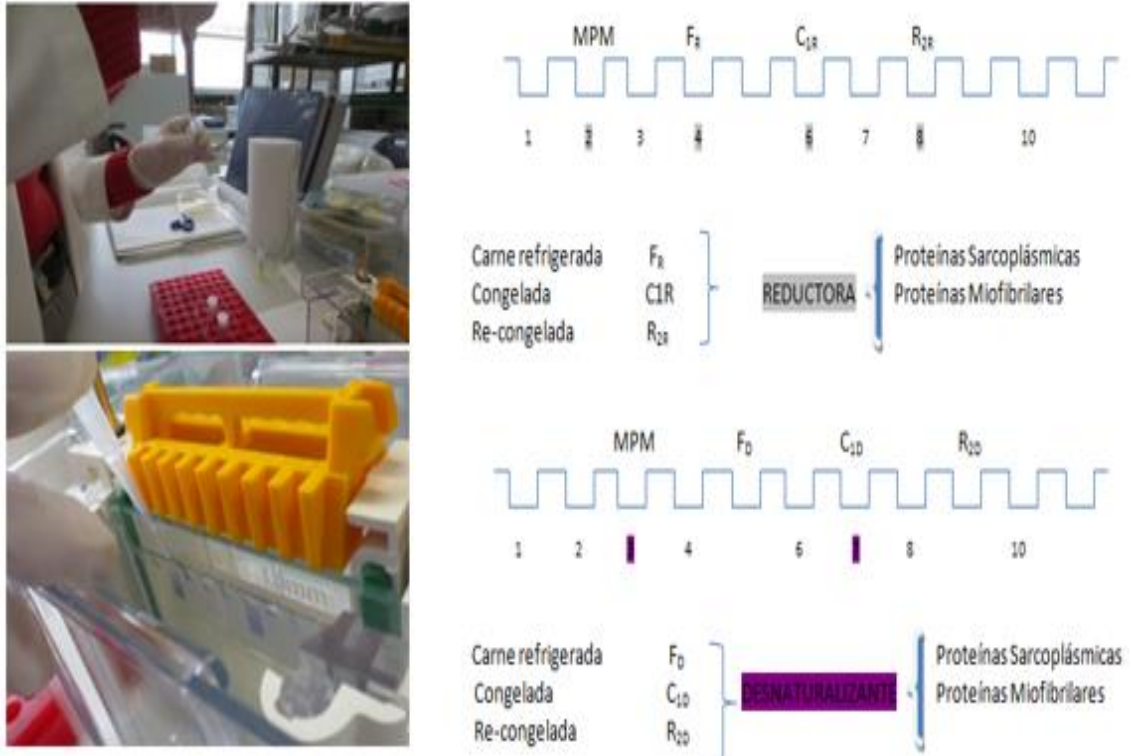


Figura 24. Inyección de la muestra de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas en condiciones desnaturizantes y reductoras

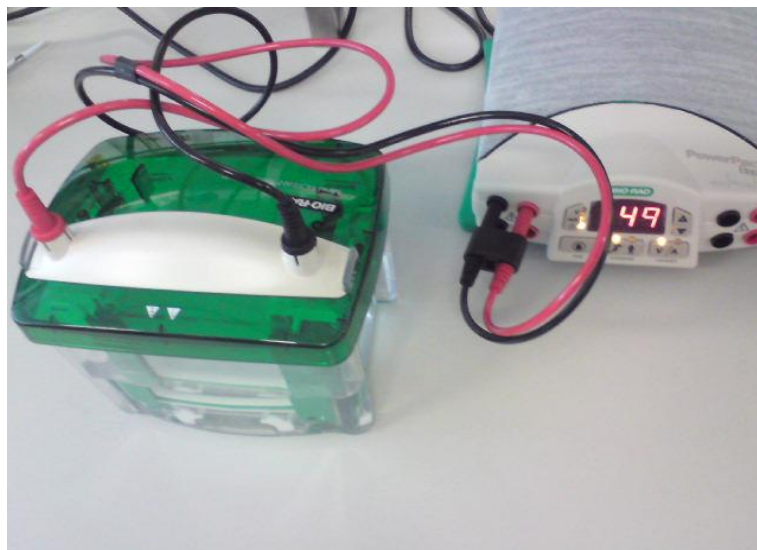


Figura 25. Corrimiento del gel de electroforesis

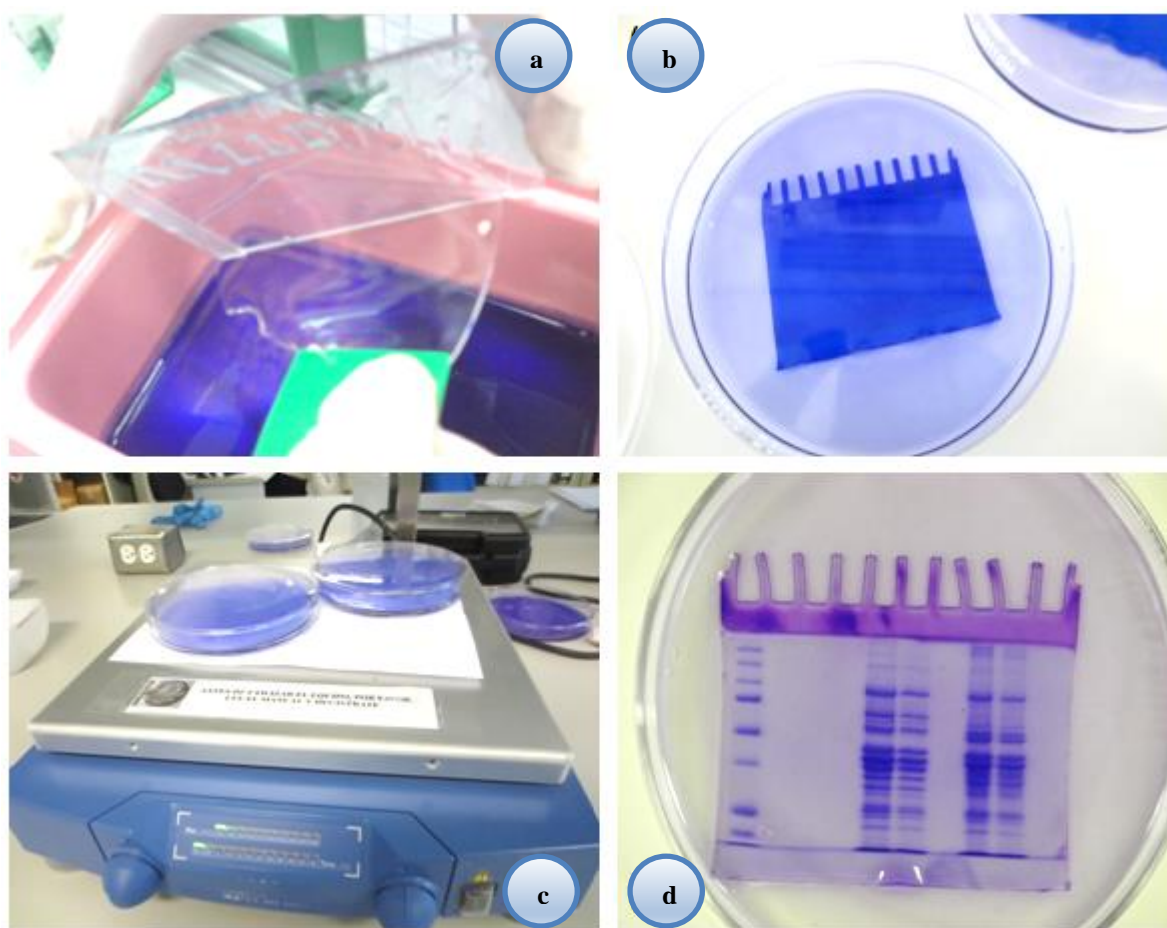


Figura 26. Revelado de bandas proteicas

Los perfiles electroforéticos y sus pesos moleculares se determinaron utilizando un analizador de imágenes marca Bio Rad modelo Gel DocTMX^{RT} como se muestra en la Figura 27, llevando a cabo el siguiente procedimiento:

1. Colocar y acomodar el gel en un acetato transparente como se muestra en la Figura 28a.
2. Introducir el acetato a la bandeja de entrada del analizador (Figura 28b).
3. Abrir en la computadora el programa Imagin System, desde el programa se centra y se ajusta la imagen.
4. Tomar fotografía una vez centrada la imagen y guardar.
5. Analizar la imagen, determinando los pesos moleculares de las bandas proteicas con el programa Molecular Image Lab.



Figura 27. Analizador de Imágenes de Electroforesis

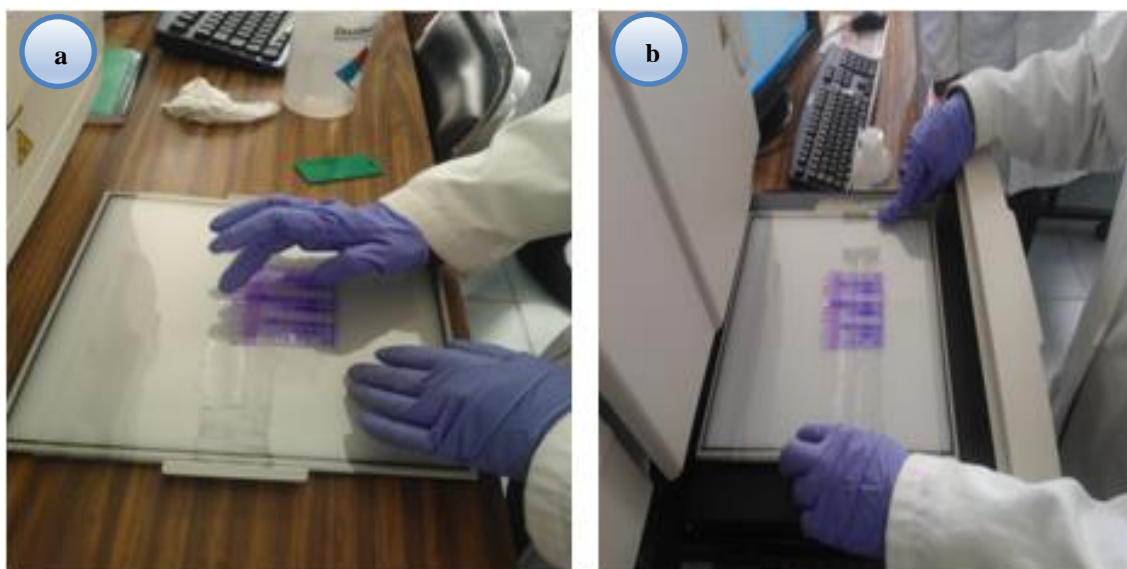


Figura 28. Analizador de bandas proteicas



2.1.4 Protocolo de preparaciones histológicas para su observación al microscopio de campo claro

2.1.4.1 Toma de muestras

Para realizar un examen microscópico de material biológico es necesario que la muestra en estudio sea tan delgada como para dejar pasar la luz y, por lo general, los órganos que son muy gruesos necesitan ser reducidos a cortes finos. Para lograrlo es necesario que los tejidos sean sometidos al siguiente procedimiento:

1. Cortar transversalmente cubos por cada rebanada de carne utilizando una navaja, aproximadamente de 1 cm^3 como se muestra en la Figura 29a.
2. Fijar en paraformaldehído 4% en PBS relación 1:60 durante 24 horas, a 4°C (Figura 29b).

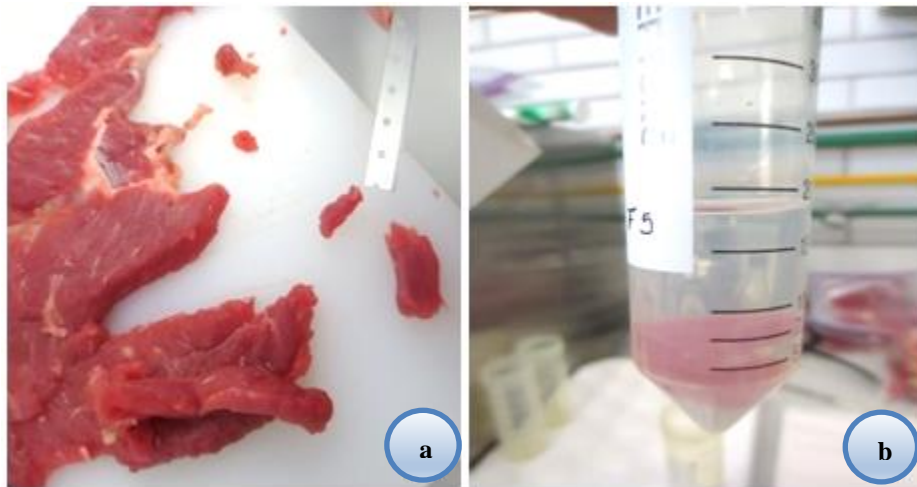


Figura 29. Fijación de muestras para histología

2.1.4.2 Preparación de laminillas histológicas

Para poder observar las lesiones a nivel histológico se tienen que tratar las muestras a través de una técnica llamada inclusión en parafina, para posteriormente cortarlas en el micrótopo y



hacer laminillas para su posterior análisis. Para ello se lleva a cabo una secuencia de pasos ordenados como se muestra a continuación:

1. Retirar el tejido de la solución fijadora lavar eliminando el exceso de fijador.
2. Colocar los cortes de muestra en cassettes, colocar un papel rotulado dentro como se muestra en la Figura 30a.
3. Sumergir los cassettes en agua para retirar residuos de fijador (Figura 30b).
4. Meter todos los cassettes en un tren de deshidratación, por medio de inmersiones en concentraciones crecientes de etanol, 60%,70%,80%,90%,96%,100%, exponiendo los cassettes 5 minutos dentro de un horno de microondas y reposando 3 minutos (Figura 30c).

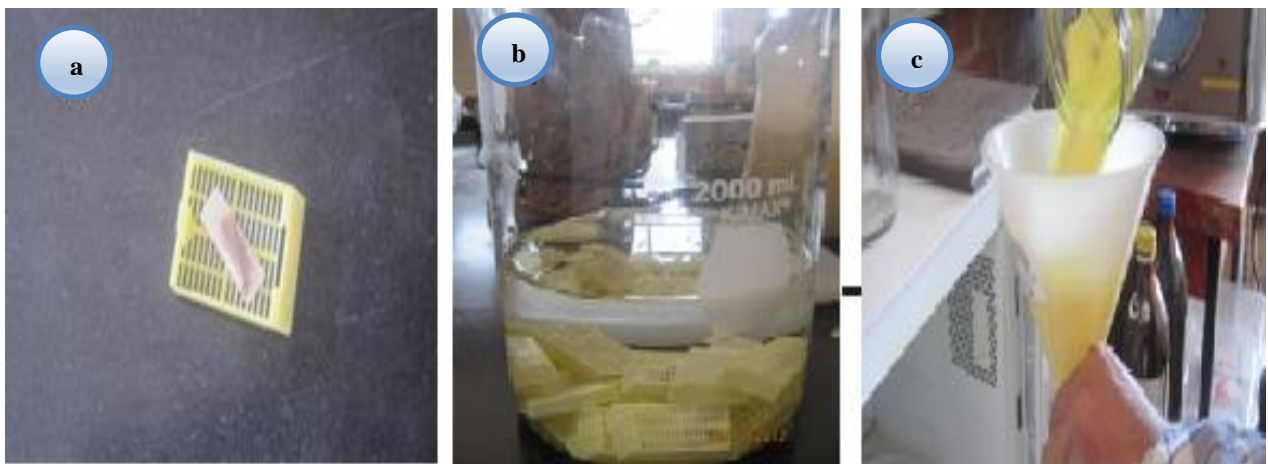


Figura 30. Deshidratación de muestras

5. Aclarar con monómero de estireno a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ haciendo dos cambios uno cada 20 minutos.
6. Realizar la técnica de inclusión en parafina; el primer paso es la infiltración.
7. Colocar la muestra en recipientes cúbicos (Figura 31a), colocando hacia abajo la parte más delgada de cada muestra, llenar el cubo de parafina a 60°C con un distribuidor de parafina marca Leica (Figura 31b); así, llenar todas las muestras (Figura 31c).
8. Dejar enfriar las piezas a 4°C hasta el momento de su corte (Figura 31 d, e).

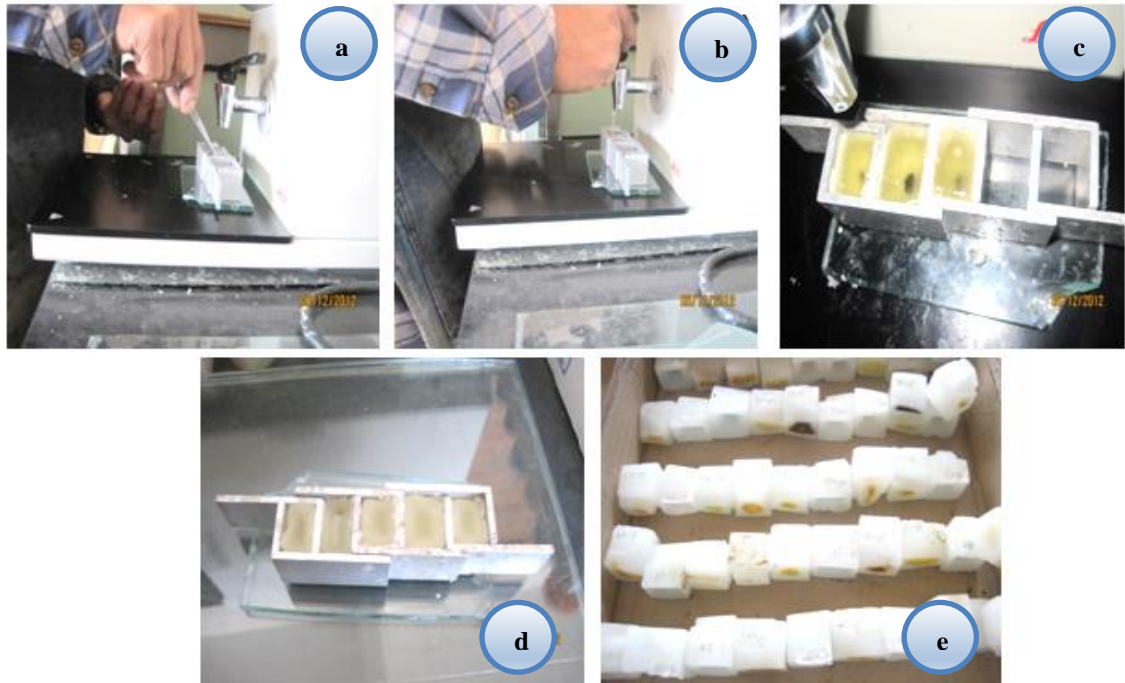


Figura 31. Infiltración en parafina

9. Cortar en micrótopo marca Leica RM2125RT, obteniendo cortes finos, el grosor debe ser aproximadamente de 4 μm como se muestra en la Figura 32a.
10. Colocar cada corte en un baño de flotación marca Barnstead Lab-Line (baño circular con control termostático de 25 cm de diámetro y 10 cm de profundidad) de agua limpia a 40°C (Figura 32b).
11. Retirar cada corte del agua con un portaobjetos, adhiriéndolos poco a poco (Figura 32c), y clocar unas gotas de etanol 70% para extender y deslizar el corte a lo largo del portaobjetos.
12. Secar cada portaobjeto sobre una platina térmica durante 48 horas a 40°C (Figura 32d).



Figura 32. Elaboración de laminillas histológicas

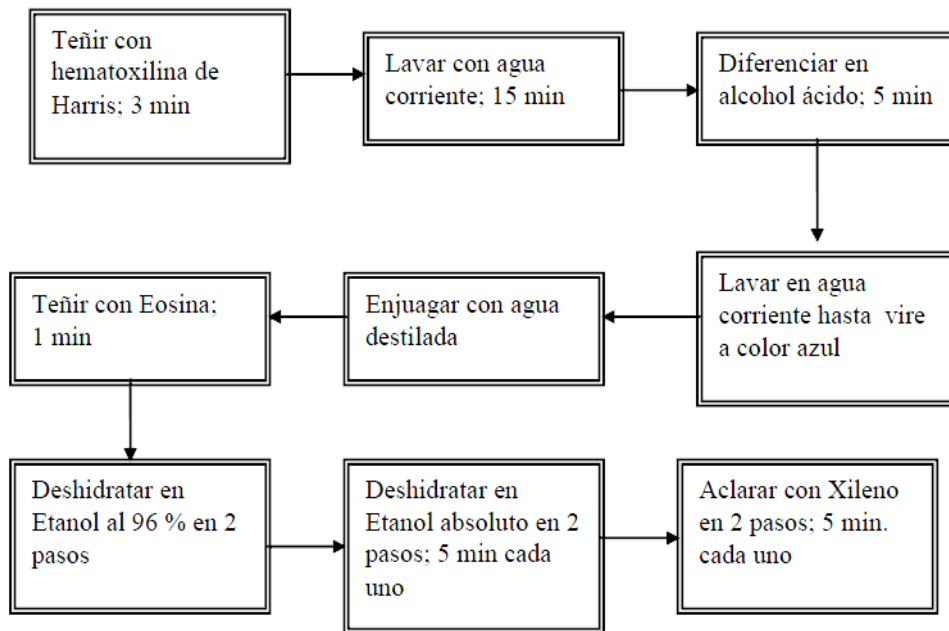


Figura 33. Tren de tinción de muestras histológicas

Fuente: Mercado, 2008.



Todos los portaobjetos pasan por un tren de tinción de rutina llamado hematoxilina-eosina (HE), como se muestra en la Figura 33.

Ya terminada la tinción se procede a realizar montajes permanentes con resinas; para esto, primero se limpian las laminillas de los extremos, después con un agitador de vidrio se colocan en el centro una pequeña cantidad de resina de poliéster con acelerador y catalizador, luego, la laminilla se coloca verticalmente sobre su lado y se inclina gradualmente con el corte hacia la parte baja, se colocó el cubreobjetos, eliminando las burbujas que se observen ejerciendo presión con unas pinzas.

Finalmente se observan las laminillas en un microscopio óptico marca Olympus CX31, a 40x y 100x, identificando las lesiones que se tienen en cada muestra.



CAPÍTULO 3

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE

RESULTADOS



3.1 Concentración de proteínas

Determinar la concentración de proteínas es básico cuando se aborda un esquema de extracción de una proteína concreta, en este caso, Miosina (cadena pesada y cadena ligera), Actina y Mioglobina. Para dicha determinación se utilizó la técnica de Bradford, técnica comúnmente usada por su alta sensibilidad y en el que pocas sustancias interfieren en su determinación.

3.1.1 Proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas

Los promedios de los resultados obtenidos para proteínas *miofibrilares* y *sarcoplásmicas* se encuentran en el Cuadro 7 y Cuadro 8, se muestra la concentración de cada proteína en condiciones desnaturalizantes y reductoras respectivamente. Los valores se obtuvieron interpolando en la curva patrón que se presenta en la Figura 17, cuya ecuación de regresión fue y (absorbancia)= 0.0319x (concentración)+0.0224 con una r igual a 0.9975.

Cuadro 7. Concentración de proteínas miofibrilares

# Lote	Concentración de proteína µg/mL					
	Condiciones desnaturalizantes			Condiciones reductoras		
	Carne Refrigerada	Carne Congelada	Carne Recongelada	Carne Refrigerada	Carne Congelada	Carne Recongelada
1	3.287	3.429	3.193	3.318	3.493	3.566
2	3.259	3.557	3.196	3.859	3.211	3.693
3	3.215	3.569	3.303	3.044	3.580	3.191
4	3.265	3.294	3.183	3.797	3.619	3.842
5	3.448	3.208	3.178	3.308	3.688	3.499
6	3.185	3.326	3.167	3.282	3.893	3.782

Cuadro 8. Concentración de proteínas sarcoplásmicas

# Lote	Concentración de proteína µg/mL					
	Condiciones desnaturalizantes			Condiciones reductoras		
	Carne Refrigerada	Carne Congelada	Carne Recongelada	Carne Refrigerada	Carne Congelada	Carne Recongelada
1	3.435	3.053	3.836	3.502	3.640	3.821
2	3.887	3.202	3.043	3.796	3.200	3.000
3	3.307	3.142	3.811	3.044	3.252	3.462
4	3.208	3.226	3.802	3.239	3.204	3.086
5	3.788	3.422	3.612	3.763	3.034	3.660
6	3.284	3.662	3.391	3.072	3.795	3.750



Se determinó la concentración de proteínas para lograr su mejor resolución en la electroforesis. Se puede observar que el contenido de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas totales al utilizar ambos protocolos, bajo condiciones reductoras o desnaturizantes, fueron similares, hecho importante en la extracción de proteínas en relación a su resolución electroforética.

3.2 Comparación de los métodos de extracción

La modificación introducida por Toldrá (1992) al incluir diferentes agentes desnaturizantes y caotrópicos, reduce drásticamente el tiempo total necesario para el procesamiento de la muestra, este método muestra un aumento importante en la extracción de proteínas. El SDS es un detergente que se emplea como agente desnaturizante, al producir una carga negativa neta en la molécula de la proteína, desestabiliza las estructuras por ruptura de los puentes de hidrógeno y regiones hidrofóbicas, mejora la recuperación de proteínas cárnicas *miofibrilares* y *sarcoplásmicas*, reflejadas en el número de fragmentos de proteínas (Figura 34).

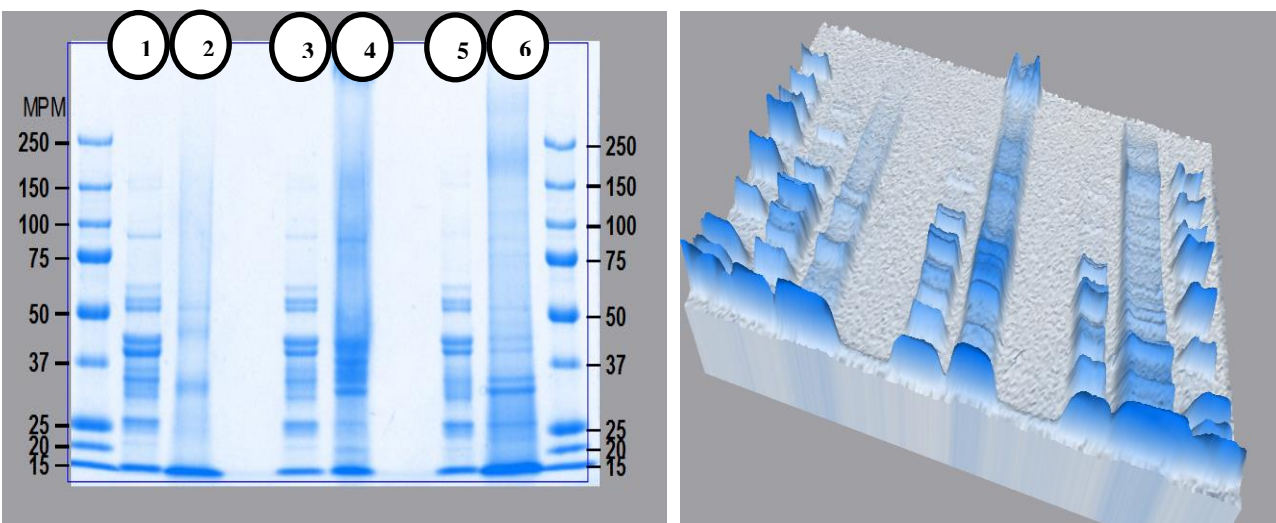


Figura 34. Patrones electroforéticos proteínas miofibrilares carril 1,3 y 5, proteínas sarcoplásmicas carril 2, 4 y 6 proteínas en condiciones desnaturizantes (izquierda). Vista 3D (derecha)

Por otro lado la urea (agente caotrópico) es utilizado para reducir interacciones hidrofóbicas, provoca cambios en la fuerza iónica, disminuye el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que estos solutos compiten por el agua rompen los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas de forma que las moléculas proteicas se agregan y



precipitan, viéndose reflejado en el número de fragmentos de proteínas como se muestra en la Figura 36.

Al utilizar una combinación de urea y β ME, estos agentes permiten la interacción con el interior hidrofóbico de las proteínas, desorganizan su estructura, ya que se realiza una escisión de los puentes disulfuro que se encuentran en las proteínas, como se muestra en la Figura 35.



Figura 35. Efecto de agentes reductores sobre la extracción de proteínas

Fuente: Biomodel.uah.es

Se encontró que dichos agentes son los más efectivos, haciendo hincapié únicamente en el aspecto en cuanto a despliegue de proteínas, presentada en los patrones electroforéticos (Figura 36), mostrando un perfil de numerosos fragmentos de proteína, también se puede observar que con este método se permite el despliegue de proteínas aún no identificadas con un peso molecular de 150 kDa.

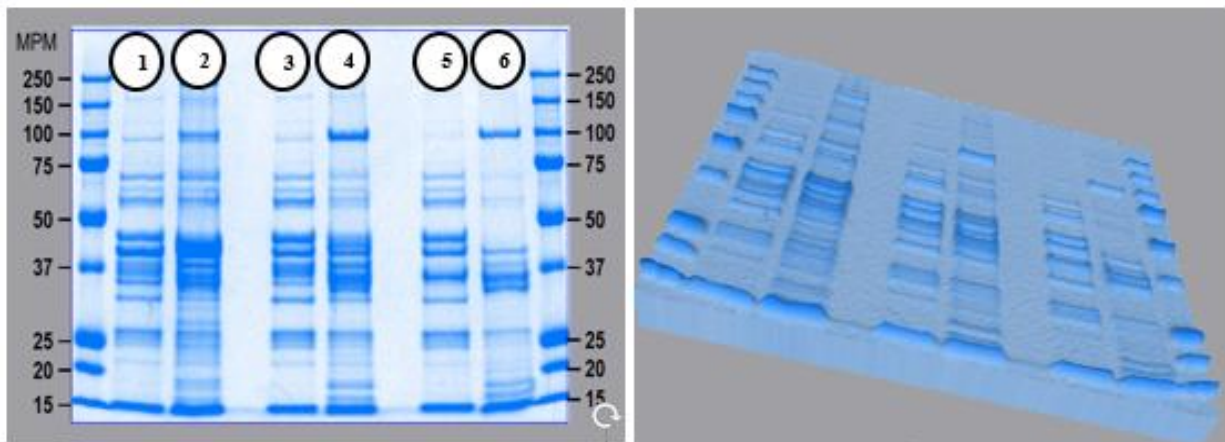


Figura 36. Patrones electroforéticos de proteínas miofibrilares carril 1, 3 y 5, proteínas sarcoplásmicas carril 2, 4 y 6, en condiciones reductoras (izquierda). Vista 3D (derecha).



El uso de distintos agentes (SDS, β ME y urea) en los protocolos de extracción de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas propuestos por Toldrá (1991) y Helander (1957), permiten la identificación de numerosos fragmentos de proteínas. Al usar la combinación de dichos agentes las fracciones proteicas tienden a subdividirse, según el caso, de este modo se explica que los agentes reductores rompen directamente los puentes disulfuro de las proteínas, con la formación de mayor número de subunidades, constituyendo un hecho muy interesante, ya que esta investigación corrobora lo encontrado por ambos autores en la extracción de las proteínas cárnicas en diferentes etapas, tanto de conservación como de proceso.

Estadísticamente los protocolos de las dos soluciones de extracción no mostraron cambios significativos entre una extracción y otra como se muestra en la Figura 37, se realizó una comparación de P_{Ma} (Peso Molecular aparente) de Miosina cadena ligera y cadena pesada (Figura 37a), Actina (Figura 37b) y Mioglobina (Figura 37c) en condiciones desnaturalizantes y reductoras sometida a refrigeración 4°C, congelación y recongelación -18°C durante 24h respectivamente, considerando un nivel de significancia del 10%, por lo tanto se acepta la hipótesis nula, donde se establece que todas las medias son iguales, esto nos indica que el protocolo de extracción aplicado a cada proteína por cada tratamiento, no es una variable crítica durante el proceso de extracción.

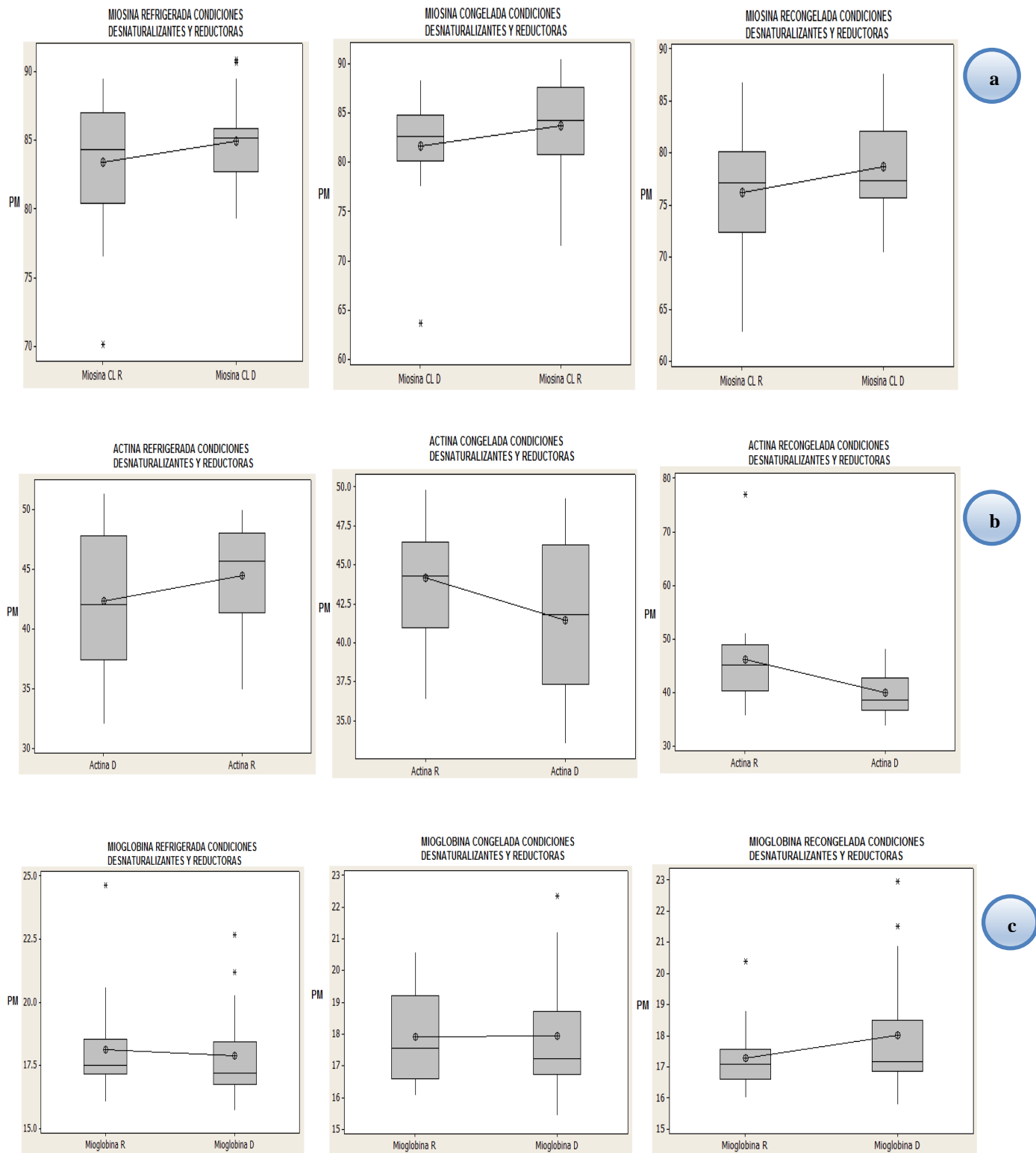


Figura 37. Análisis estadístico de los protocolos de extracción para Miosina, actina y mioglobina



3.3 Patrones electroforéticos de Proteínas Miofibrilares

3.3.1 Efecto de la congelación- descongelación en Cadenas Pesada y Ligera de Miosina

La Miosina es la principal proteína miofibrilar, consta de 2 grandes polipéptidos denominados cadenas pesadas cada una con un peso molecular entre 125 y 130 kDa, y 4 pequeñas subunidades llamadas cadenas ligeras con un peso de 80 kDa (RSCB). La Miosina nativa pesa alrededor de 480 kDa; en esta investigación se realizó un análisis de los perfiles electroforéticos de las cadenas pesadas y ligeras de la Miosina, extraídas bajo condiciones desnaturizantes y reductoras respectivamente. Los resultados para cadenas pesadas (Cuadros 9 y 10) se muestran a continuación:

Cuadro 9. Peso molecular (kDa) cadena pesada de Miosina en condiciones desnaturizantes

# Lote	Tratamiento térmico		
	Carne Refrigerada	Carne Congelada	Carne Recongelada
1	125.657	132.314	125.295
2	130.377	136.133	118.427
3	122.783	122.915	117.276
4	131.623	128.418	128.524
5	125.102	117.265	126.485
6	126.517	136.509	122.528

Cuadro 10. Peso molecular (kDa) cadena pesada de Miosina en condiciones reductoras

# Lote	Tratamiento térmico		
	Carne Refrigerada	Carne Congelada	Carne Recongelada
1	139.158	138.507	126.316
2	138.589	133.147	127.777
3	139.038	131.188	138.787
4	131.347	121.792	135.962
5	134.775	139.104	138.654
6	126.781	130.877	139.228

Para los pesos moleculares aparentes de cadena ligera de Miosina tanto en condiciones desnaturizantes como en reductoras, se muestran los resultados en los Cuadros 11 y 12.



Cuadro 11. Peso molecular (kDa) cadena ligera de Miosina en condiciones desnaturalizantes

# Lote	Tratamiento térmico		
	Carne Refrigerada	Carne Congelada	Carne Recongelada
1	86.738	83.113	87.112
2	85.442	85.283	86.425
3	85.849	86.522	88.103
4	86.607	87.437	84.349
5	86.989	80.484	86.376
6	87.125	85.228	88.017

Cuadro 12. Peso molecular (kDa) cadena ligera de Miosina en condiciones reductoras

# Lote	Tratamiento térmico		
	Carne Refrigerada	Carne Congelada	Carne Recongelada
1	82.798	81.618	83.119
2	82.282	83.129	77.668
3	82.715	84.313	88.114
4	81.257	84.430	88.667
5	85.291	81.788	88.696
6	84.600	85.903	82.305

Después de obtener los valores se procedió a realizar el análisis estadístico ANOVA de 2 vías, donde se consideró un nivel de significancia del 10% ($\alpha=0.10$) y donde se realizó una prueba de hipótesis que se considera de la siguiente forma:

Para los tratamientos:

$$H_0 = \mu_{PM \text{ refrigerada}} = \mu_{PM \text{ congelada}} = \mu_{PM \text{ recongelada}}$$

$$H_1 = \text{no se acepta } H_0$$

Para los bloques:

$$H_0 = \mu_{L1} = \mu_{L2} = \mu_{L3} = \mu_{L4} = \mu_{L5} = \mu_{L6}$$

$$H_1 = \text{no se acepta } H_0$$

De acuerdo a las Figuras 38 y 39 de cadena pesada de Miosina y Figuras 40 y 41 de cadena ligera de Miosina, existen diferencias altamente significativas, ya que el peso molecular aparente de Miosina se ve afectada directamente por el proceso térmico involucrado (refrigeración 4°C, congelación y recongelación -18°C), y de manera significativa por el tipo de lote, esto mencionando que el tipo de tratamiento durante la electroforesis es de carácter desnaturalizante y reductor respectivamente.

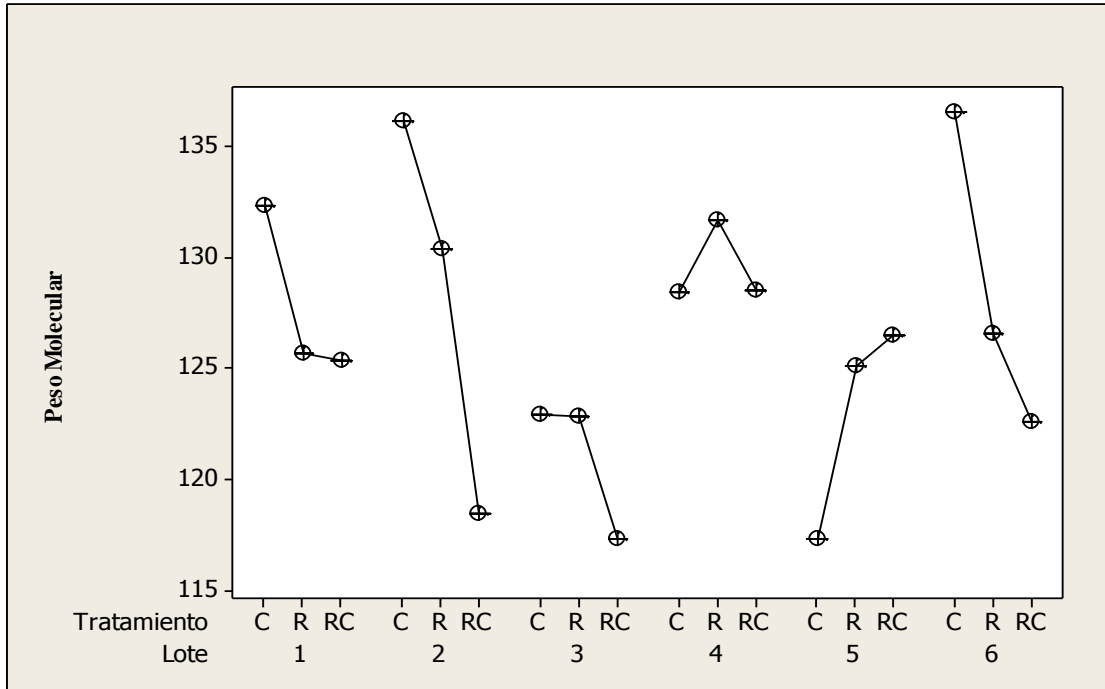


Figura 38. Valores medios para PM de cadena pesada de Miosina en condiciones desnaturalizantes

*R: carne refrigerada, C: carne congelada, RC: carne Recongelada

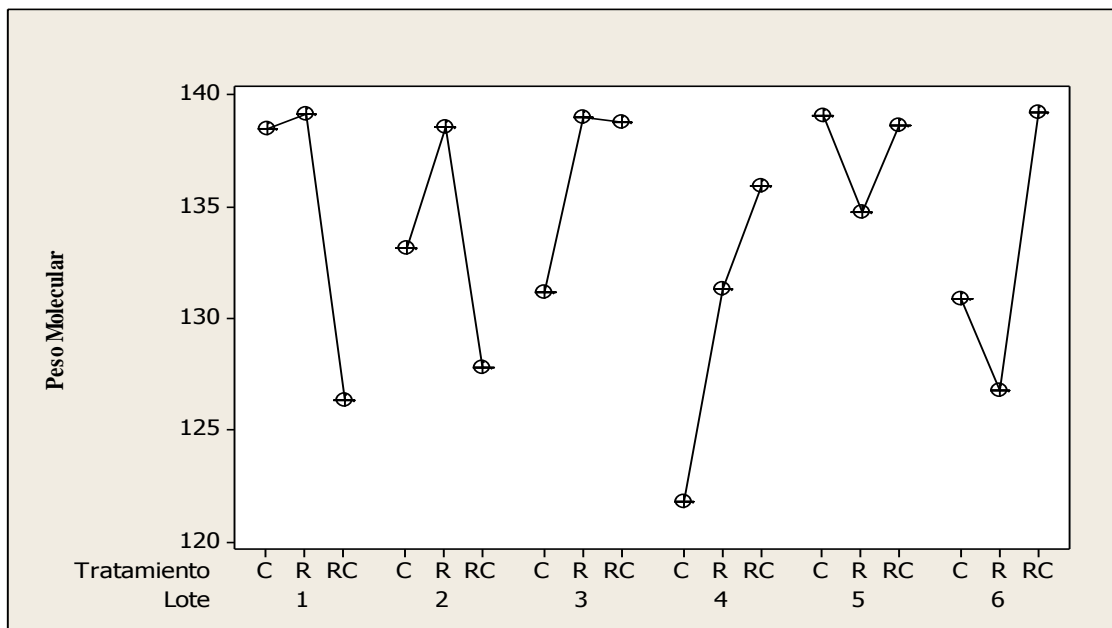


Figura 39. Valores medios para PM de cadena pesada de Miosina en condiciones reductoras

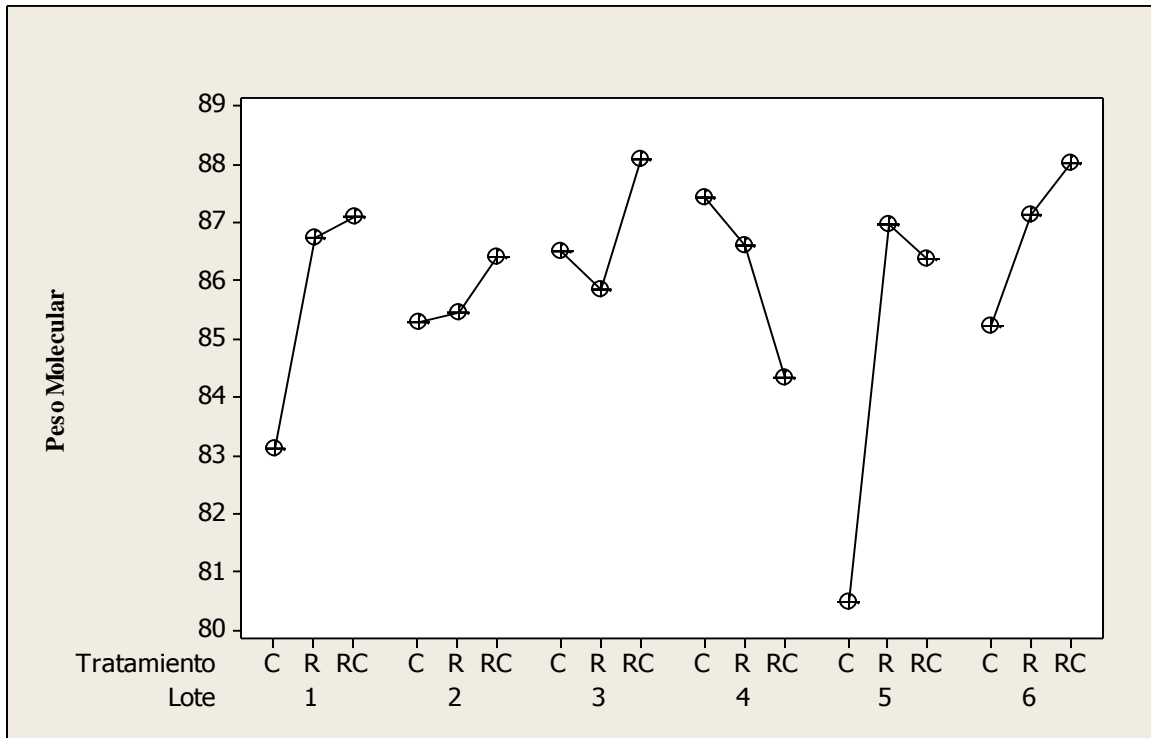


Figura 40. Valores medios para PM de cadena ligera de Miosina en condiciones desnaturalizantes

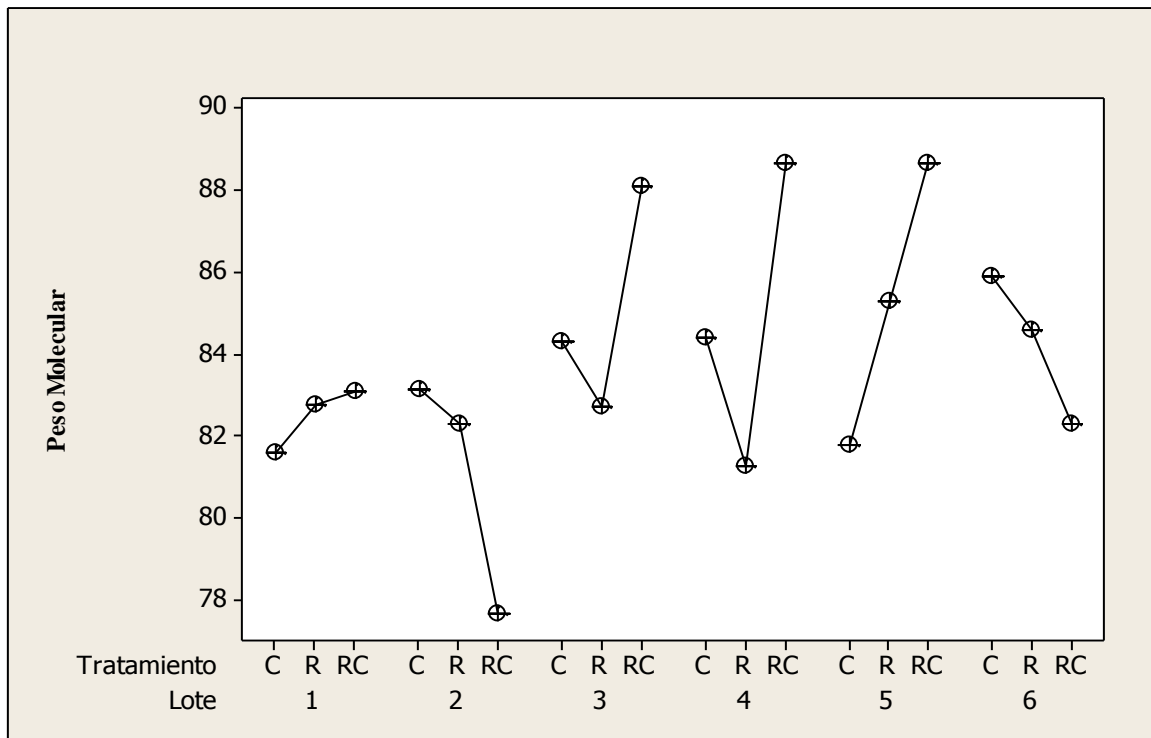


Figura 41. Valores medios para PM de cadena ligera de Miosina en condiciones reductoras



En las Figuras 38, 39, 49 y 41 se presentan los resultados del análisis estadístico, en donde se observa que el protocolo de extracción bajo condiciones desnaturalizante o reductora, no afectó significativamente el peso molecular de las cadenas pesadas y ligeras de Miosina.

Sin embargo al comparar los cambios en pesos moleculares de las cadenas pesadas y ligeras de Miosina los resultados fueron significativos por la influencia de las condiciones de conservación. En el caso de cadena pesada de Miosina en condiciones desnaturalizantes se observa que el peso molecular aparente durante la refrigeración 4°C es igual a 125.102 kDa, para congelación -18°C 117.265 kDa y para recongelación -18°C es igual a 126.485 kDa. Para condiciones reductoras se obtuvo un PMA de 131.347 kDa en refrigeración, 121.792 kDa en congelación y 135.654 kDa para recongelación. Demostrando que se guarda una relación $R \geq C < RC$, esta misma relación se mantiene para cadena ligera de Miosina en condiciones desnaturalizantes en donde se obtuvo un PMA de 87.125 kDa > 85.228 kDa < 88.017 kDa y para condiciones reductoras 85.291 kDa > 81.788 kDa < 88.696 kDa, siendo así los PMA disminuyen durante la congelación y aumentan en recongelación.

Durante la congelación la formación de cristales de hielo tiene un efecto importante en el aumento en la concentración de solutos y por consiguiente en la fuerza iónica, que afecta directamente la solubilidad de las proteínas, favoreciendo así los puentes de hidrógeno entre proteínas y moléculas de agua libre, lo que hace cambiar la conformación tridimensional de dichos polímeros. Estos fenómenos llevan a la deshidratación de proteínas y a la pérdida de estabilidad, lo cual puede explicar los resultados observados en los lotes de carne congelada, en donde los pesos moleculares obtenidos para las cadenas pesadas y ligeras de Miosina fueron menores a los de la carne refrigerada.

Por otro lado cuando la carne fue sometida a congelación-descongelación-recongelación los resultados de los pesos moleculares de las cadenas pesadas y ligeras de Miosina fueron mayores, esto puede ser debido a que al perder estabilidad las proteínas, frente a una mayor fuerza iónica los aminoácidos se ionizan con dificultad y por lo tanto dan lugar a la asociación y agregación (Badui, 2006). Los fenómenos de agregación de proteínas cárnicas durante su conservación en congelación han sido demostrados también por Ragnarsson & Regenstein, quienes en 1989 demostraron la reticulación de las cadenas pesadas y ligeras de Miosina, a través del estudio de enlaces disulfuro y no covalentes durante la congelación de carne,



encontrando que dicho proceso contribuye a la formación de polímeros de alto peso molecular y entrecruzamiento de proteínas, afectando directamente de esta manera la capacidad de retención de agua y ternura en carne.

Siguiendo la misma línea de investigación Schmidt y Wong (2009) determinaron que las pérdidas de agua en la carne se deben al cambio de fase que sufren los cristales de hielo, cuando esta se sublima, generando un fenómeno de deshidratación superficial e irreversible, lo que puede explicar la disminución de los pesos moleculares de las proteínas de la carne congelada identificados en la investigación desarrollada. El proceso de congelación y descongelación al producir fenómenos de deshidratación de las proteínas puede causar la oxidación de lípidos y proteínas a través de la formación de radicales peroxilo además por efecto de la formación de hielo se produce ruptura de las membranas celulares y de diversos organelos celulares, con la subsecuente liberación de enzimas pro-oxidantes, todas estas reacciones de oxidación van a tener un efecto importante en la textura de la carne (Xia, Kong, y Lui, J. , 2009).

Los agentes oxidantes presentes son capaces de generar un número de especies oxígeno reactivo que incluyen principalmente radicales libres. Una de las principales consecuencias de la oxidación de proteínas es la formación de agregados a través de enlaces intermoleculares no covalentes y covalentes. Liu, Xiong, y Butterfield (2000) demostraron que los radicales libres generados durante la oxidación pueden causar la polimerización y degradación de proteínas de carne conduciendo a una disminución en solubilidad y funcionalidad de las mismas, la cadena polipeptídica y muchos residuos de aminoácidos de la cadena lateral son vulnerables al ataque oxidativo, comúnmente los cambios en las proteínas oxidadas son la destrucción de aminoácidos, fragmentación y desarrollo de entrecruzamiento, desdoblamiento, aumento de hidrofobicidad de la superficie promoviendo así la desnaturalización de Miosina que comúnmente es ligada a un deterioro en la calidad de carne, ocasionando cambios especialmente en textura y sabor, estos estudios podrían también a ayudar a explicar la variación encontrada en los pesos moleculares de las cadenas pesadas de miosina de la carne congelada-descongelada-recongelada, utilizada en la presente investigación.



Finalmente el cambio significativo de peso molecular obtenido de las cadenas pesadas y ligeras de Miosina de la carne de distintos animales sugiere que a pesar de que la carne tenga la misma procedencia en términos de raza, edad o tipo de alimentación puede haber variabilidad entre animales, y que esta es evidente sólo al realizar estudios más sensibles y específicos como en este caso, con algunas de las fracciones de las proteínas de la carne.

Lo anterior puede explicarse con los estudios de Kim y colaboradores (2008) quienes demostraron que los cambios bioquímicos que se dan en el animal tras el sacrificio son diferentes para cada uno y que factores como cambios en pH favorecen la actividad de gran número de calpaínas en la proteólisis, que pueden afectar la terneza de la carne, a pesar de provenir de la misma especie, tipo de alimentación, clima y edad de matanza, la diferencia en terneza de la carne fueron altamente significativos.

Visualmente en los patrones electroforéticos de la Figura 42, muestran que la intensidad de las bandas cadena ligera de Miosina no guardan la misma densidad, demostrando que ocurren cambios significativos de un tratamiento térmico a otro en el carril 2 (carne refrigerada) 5 (carne congelada) y 8 (carne Recongelada).

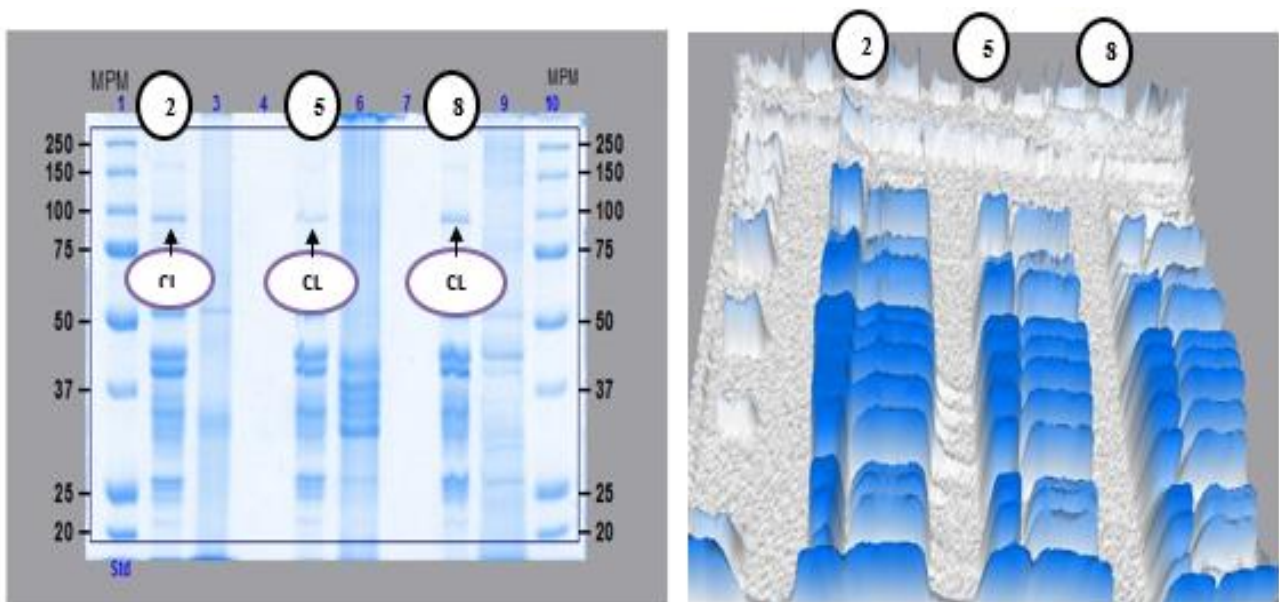


Figura 42. Patrones electroforéticos de proteína miofibrilar de la cadena ligera de Miosina (CL) en condiciones reductoras carril 2, 5 y 8 (izquierda). Vista 3D (derecha).



3.3.2 Efecto de la congelación-descongelación en Actina

La Actina es una proteína globular constituida por una cadena polipeptídica simple, se ha calculado un peso molecular de entre 37 y 45 kDa (RCSB), para este caso se tienen en el Cuadro 13 y 14 los promedios de los pesos moleculares aparentes de actina en condiciones desnaturizantes y reductoras respectivamente.

Cuadro 13 Peso molecular (kDa) Actina en condiciones desnaturizantes

# Lote	Tratamiento térmico		
	Carne Refrigerada	Carne Congelada	Carne Recongelada
1	35.432	41.295	39.298
2	44.987	40.245	40.311
3	45.060	39.928	40.872
4	40.952	41.495	37.257
5	44.948	43.466	42.553
6	47.962	43.015	41.304

Cuadro 14 Peso molecular (kDa) Actina en condiciones reductoras

# Lote	Tratamiento térmico		
	Carne Refrigerada	Carne Congelada	Carne Recongelada
1	47.139	43.885	44.163
2	46.836	46.872	47.777
3	44.433	44.328	40.332
4	42.810	45.402	46.221
5	44.560	40.906	46.921
6	43.633	40.615	42.863

Una vez obtenidos los promedios de peso molecular se procedió a realizar un ANOVA de 2 Vías, donde se consideró un nivel de significancia del 10% ($\alpha=0.10$) y donde se realiza una prueba de hipótesis que se considera de la siguiente forma:

Para los tratamientos:

$$H_0 = \mu_{PM \text{ refrigerada}} = \mu_{PM \text{ congelada}} = \mu_{PM \text{ recongelada}}$$

$$H_1 = \text{no se acepta } H_0$$

Para los bloques:

$$H_0 = \mu_{L1} = \mu_{L2} = \mu_{L3} = \mu_{L4} = \mu_{L5} = \mu_{L6}$$

$$H_1 = \text{no se acepta } H_0$$



En las siguientes Figuras 43 y 44 se observa que tanto el tratamiento térmico aplicado es una variable crítica durante el proceso de conservación de la carne, demostrando de igual manera diferencias significativas en cuanto al lote.

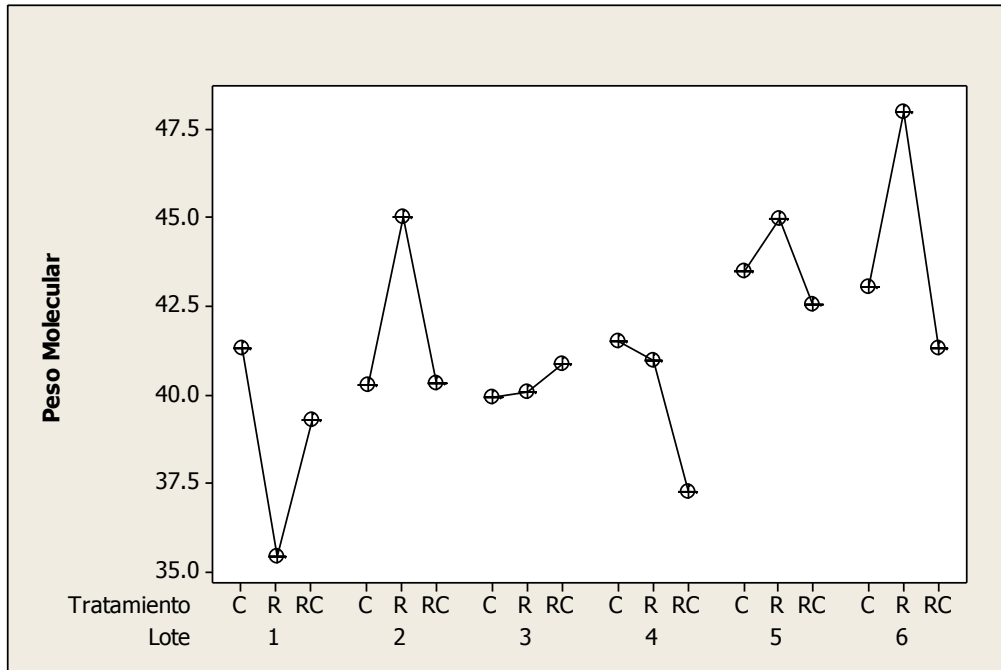


Figura 43. Valores medios para PM de Actina en condiciones desnaturalizantes

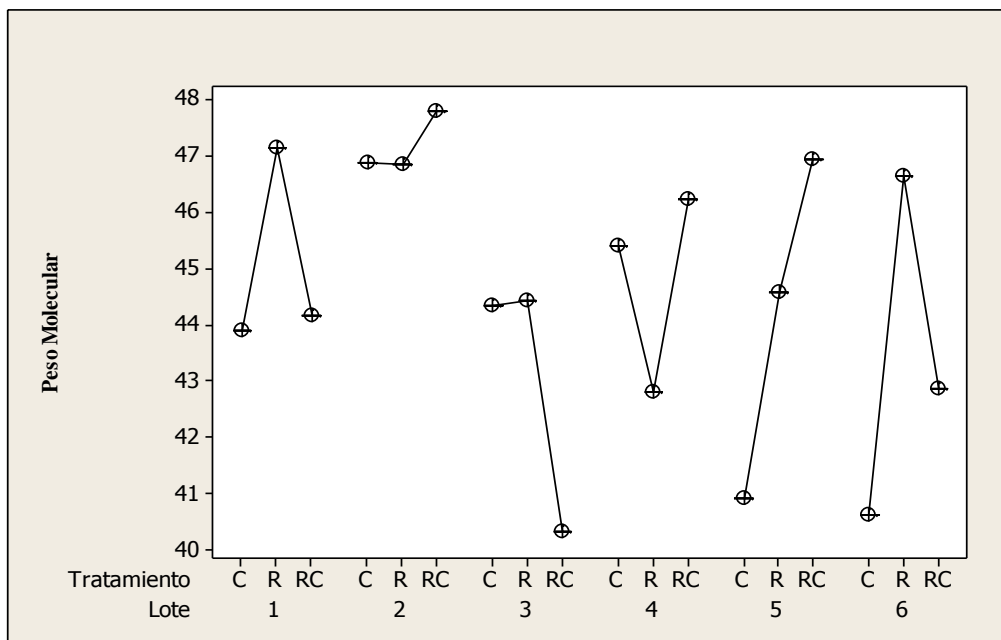


Figura 44. Valores medios para PM de Actina en condiciones reductoras



Generalmente en el caso de la Actina, se pueden agregar otras proteínas, según los resultados obtenidos por Ojeda, Wagner, y Crupkin (2001), demostraron que la deshidratación que ocurre durante la congelación, se debe a la formación de cristales de hielo y a la formación de regiones de alta concentración de solutos en un solo lugar. Al descongelarse ocurre la eliminación de grandes cantidades de agua que pueden formar parte estructural de los tejidos y que favorecen los cambios en la forma en que interacciona el agua, por lo que al recongelar la carne, los cambios en fuerza iónica, desdoblamiento y agregación de las proteínas se ven reflejados en el aumento de pesos moleculares. Manteniendo la relación $R > C < RC$ donde se obtuvo en condiciones desnaturalizantes un P_{Ma} de 45.060 kDa >39.928 kDa <40.872 kDa y en condiciones reductoras 44.560 kDa >40.906 kDa <46.921 kDa.

De esta forma, se observa en el Cuadro 13 y 14, que Actina sufrió cambios significativos en su peso molecular. Se muestra una inconsistencia en el ancho de las bandas (densidad) de los patrones electroforéticos, lo que indica, que la congelación tiene un efecto en el peso molecular aparente de las proteínas, en las bandas detectadas en los carriles 2, 5 y 8 (Figura 45).

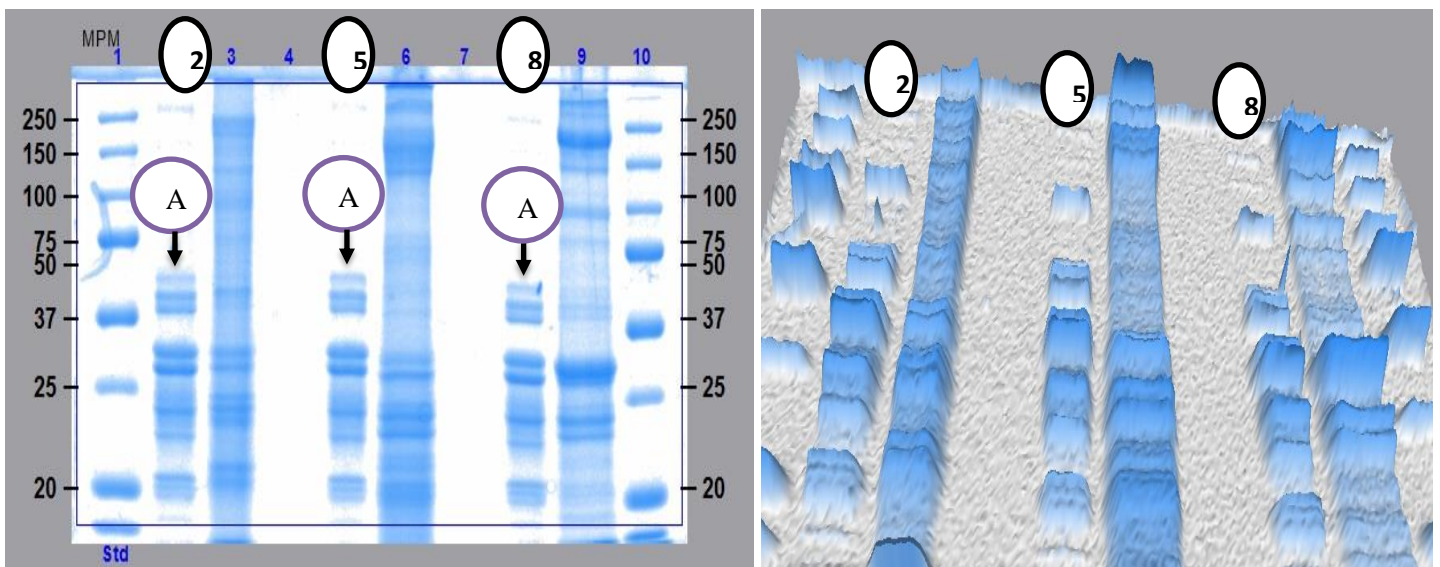


Figura 45. Patrones electroforéticos de Actina carril 2,5 y 8 en condiciones reductoras (izquierda). Vista 3D derecha.



3.4 Patrones electroforéticos de proteínas sarcoplásmicas

3.4.1 Efecto de la congelación-descongelación en mioglobina

En este caso de las proteínas sarcoplásmicas sólo se realizó el estudio de la Mioglobina, ya que esta proteína es la responsable del color en la carne y es considerado un parámetro de calidad de la misma, esta molécula tiene un peso de 18 kDa. En el Cuadro 15 y 16 se tienen los promedios de los pesos moleculares aparentes de mioglobina en condiciones desnaturalizantes y reductoras.

Cuadro 15. Peso molecular (kDa) Mioglobina en condiciones desnaturalizantes

# Lote	Tratamiento térmico		
	Carne Refrigerada	Carne Congelada	Carne Recongelada
1	18.331	19.891	18.761
2	17.657	17.232	17.296
3	18.197	18.126	18.360
4	17.132	17.180	18.028
5	18.195	18.112	18.054
6	16.874	16.822	17.115

Cuadro 16. Peso molecular (kDa) Mioglobina en condiciones reductoras

# Lote	Tratamiento térmico		
	Carne Refrigerada	Carne Congelada	Carne Recongelada
1	18.881	17.452	17.042
2	18.339	18.441	18.259
3	18.249	18.567	18.274
4	18.575	18.549	18.334
5	18.511	18.159	18.184
6	18.678	18.444	18.806

Posteriormente se procedió a realizar un ANOVA de 2 Vías, donde se consideró un nivel de significancia del 10% ($\alpha=0.10$), realizando prueba de hipótesis.

Para los tratamientos: $H_0 = \mu_{PM \text{ refrigerada}} = \mu_{PM \text{ congelada}} = \mu_{PM \text{ recongelada}}$

$H_1 =$ no se acepta H_0

Para los bloques:

$H_0 = \mu_{L1} = \mu_{L2} = \mu_{L3} = \mu_{L4} = \mu_{L5} = \mu_{L6}$
 $H_1 =$ no se acepta H_0



En donde se establece que existen diferencias significativas, indicando que la aplicación de un tratamiento térmico a bajas temperaturas es una variable crítica (Figura 46 y Figura 47), ya que, afecta de manera significativa el cambio de peso molecular aparente de la proteína.

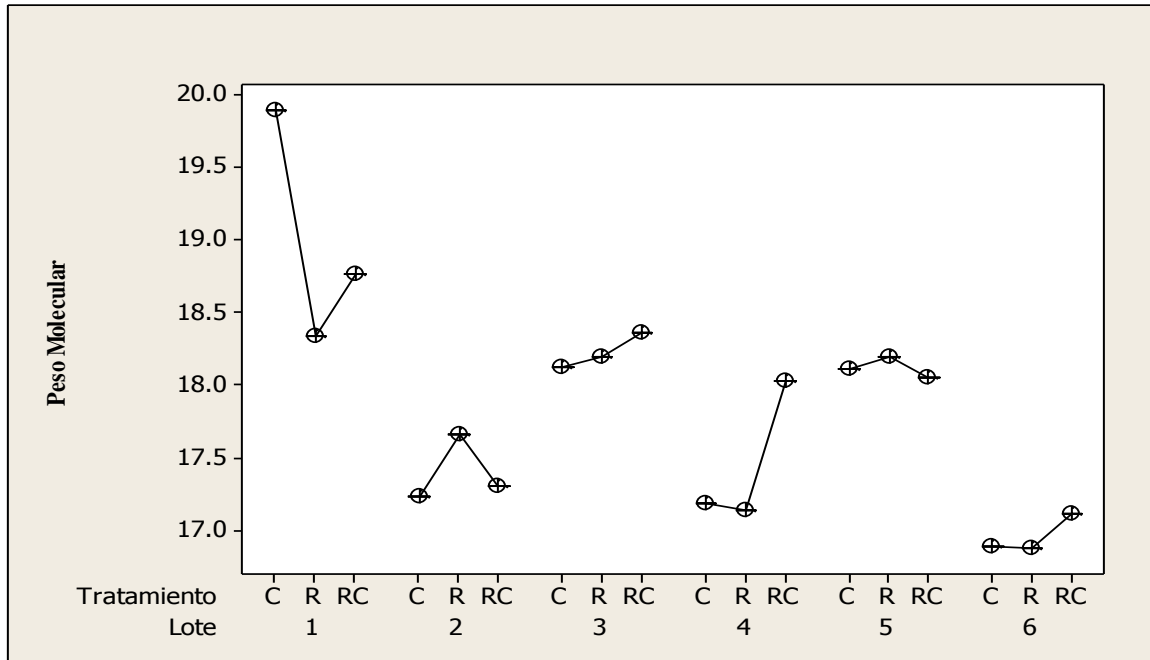


Figura 46. Valores medios para PM de Mioglobina en condiciones desnaturizantes

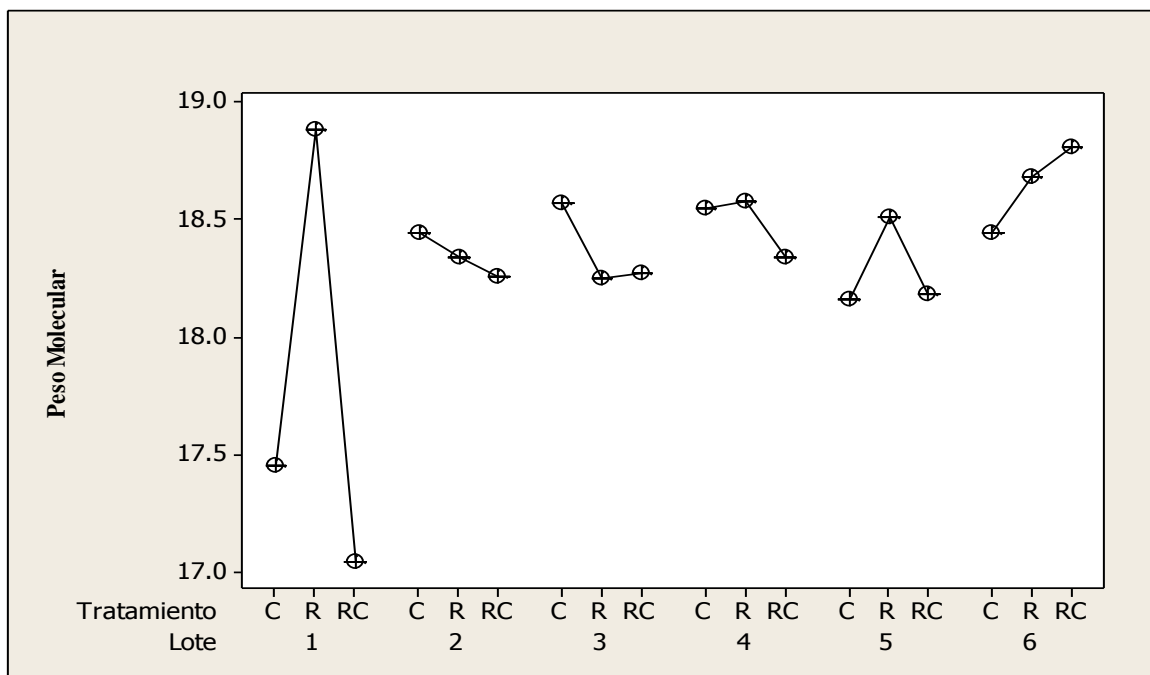


Figura 47. Valores medios para PM de Mioglobina en condiciones reductoras



El color juega un papel importante en la apariencia y aceptabilidad de la carne, en general la inestabilidad en el color puede ocurrir durante la aplicación de frío, siendo en parte responsable de la degradación del color, ya que dichos cambios se deben mayormente a los cambios bioquímicos (proteólisis) que se presentan en la carne.

En los Cuadros 15 y 16 se puede observar que la mioglobina tiene cambios significativos en P_{Ma}, ya que al ser sometida a tratamientos de congelación y recongelación a -18°C durante 24h se sigue la relación $R > C < RC$, en donde se obtuvo que para condiciones desnaturalizantes el P_{Ma} fue de 18.197 kDa en refrigeración, 18.126 kDa congelación y 18.360 kDa para recongelación, del mismo modo para condiciones reductoras la relación fue de 18.678 kDa > 18.444 kDa < 18.806 kDa para cada tratamiento térmico, demostrando así que el abuso de bajas temperaturas influyen de manera significativa.

A partir de técnicas calorimétricas Gil y colaboradores (1999), compararon la capacidad de la carne para resistir la oxidación a metamioglobina durante el almacenamiento en refrigeración posterior a la congelación, en donde se obtuvo que este cambio en el color se debe a que existe una fracción de la mioglobina que se desnaturaliza en algún momento durante la congelación; dicha desnaturalización conduce a un aumento en la susceptibilidad a la auto-oxidación de la mioglobina y la subsiguiente pérdida en el color óptimo. Sin embargo se tiene que considerar el envejecimiento de la carne y el tiempo de almacenamiento, ya que cuanto mayor sean estos, la metamioglobina comienza acumularse rápidamente en la superficie y los cambios en el color son más evidentes (Leygonie *et al.*, 2012).

Dileep, Omana, y Mirko (2011) demostraron que el aumento de la oxidación de lípidos se correlaciona con la disminución en el enrojecimiento de color, sugiriendo que la degradación de color es debida a reacciones de pardamiento no enzimático. Es posible que el proceso de congelación-descongelación conduzca a un efecto en la concentración local de los iones metálicos, que pueden acelerar la oxidación y la tasa de liberación de hierro. De la misma manera el daño en los compartimentos celulares podrían liberar enzimas que podrían participar en formación de metamioglobina. (Xia, Kong, y Lui, J. , 2009).



3.5 Observación de cambios en la microestructura de la carne

3.5.1 Cambios en carne refrigerada

Se evaluó el efecto del manejo de la carne de res en refrigeración 4°C, congelación-descongelación y recongelación -18°C durante 24h respectivamente, mediante la observación de preparaciones histológicas de las fibras musculares en microscopio óptico de campo claro (Olympus, CX31, USA).

Damez y Cleiron (2008) concluyeron que la velocidad de congelación es la responsable de la disminución en la calidad de la carne, atribuyendo que los cristales provocan daños mecánicos en las fibras musculares, afectando negativamente los atributos de la carne como son la ternura y jugosidad. Por consiguiente, es de vital importancia tener un amplio conocimiento de los factores que permiten diferenciar los cambios estructurales. Como ya se ha mencionado, durante la congelación de la carne ciertos cambios tienen lugar en su estructura y ultra estructura, para definir estos cambios y dar una mejor descripción de ellos, primero se realizó un análisis de carne refrigerada, llevando a cabo un estudio histológico de las muestras de carne de res de 6 lotes experimentales.

Las secciones transversales de los 6 lotes de carne fresca se muestran en la Figura 48, en donde se puede observar una distribución regular de las fibras, rodeadas por tejido conectivo. Las fibras de la carne aun no congeladas son uniformes, los espacios que existen entre las fibras son regulares, pequeños y continuos.

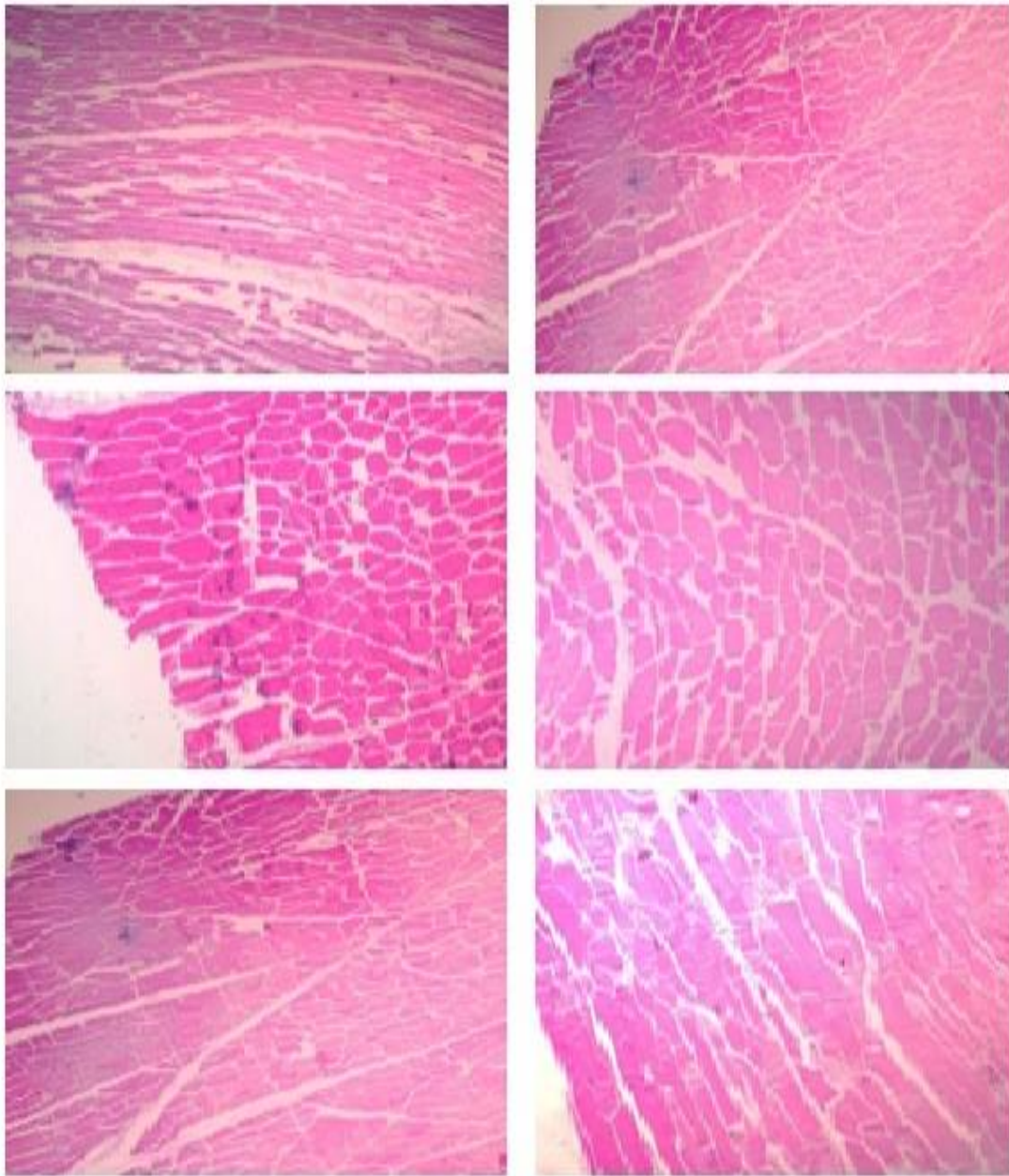


Figura 48. Cortes de carne refrigerada microscopio de campo claro (40x)



Para una mayor identificación de los detalles estructurales de la carne refrigerada, se realizó una observación a 100x, las imágenes son en la Figura 49, en donde las fibras se muestran similares y no existe separación, ni ninguna perturbación.

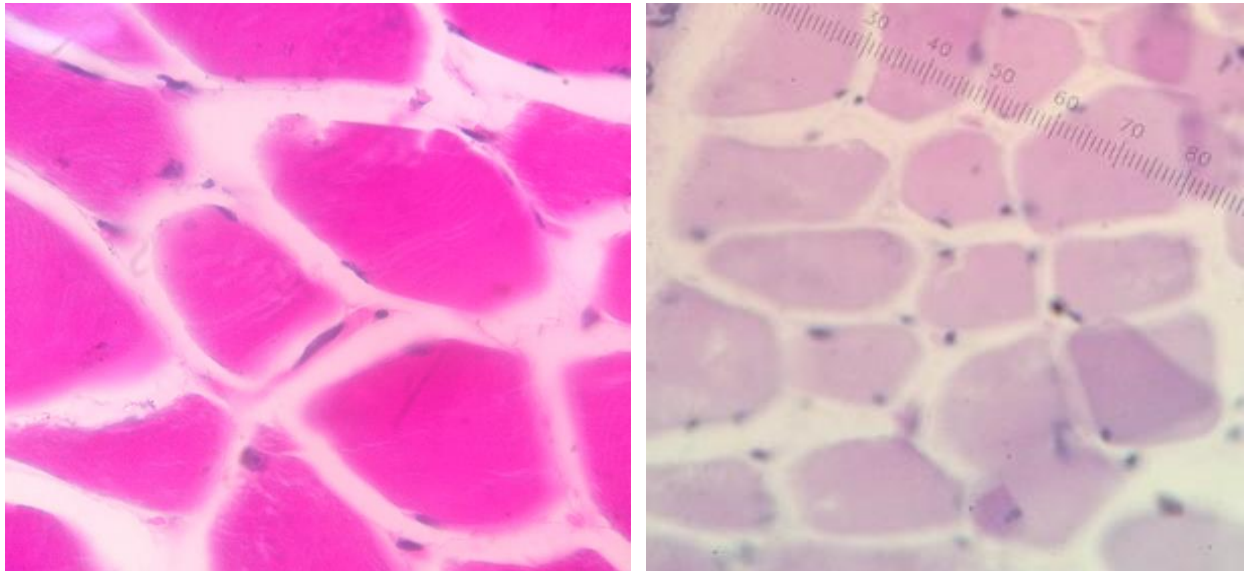


Figura 49. Cortes de carne refrigerada microscopio óptico (100x)

3.5.2 Carne Congelada

La congelación consta de tres etapas, es decir, enfriar el producto a su punto de congelación (pre- enfriamiento o etapa de refrigeración), la eliminación de calor latente de cristalización (etapa de transición de fase) y finalmente enfriar el producto a temperatura de almacenamiento. La segunda fase que se refiere a la fase de transición, implica la conversión de agua a hielo a través del proceso de cristalización y es el paso clave que determina la eficiencia del proceso y la calidad del producto, por lo tanto, el control, la comprensión y la predicción del proceso de cristalización y fenómenos relacionados en lo que se refiere a las características de los cristales son muy esenciales para la mejora de los procesos de congelación ya que la formación de grandes cristales de hielo dan lugar a daños importantes en el tejido.

En la congelación de la carne a temperaturas entre -20 y -33°C , se forman cristales de hielo tanto entre las fibras como dentro de ellas, influyendo de esta manera en la pérdida por goteo



(una mayor pérdida de los componentes celulares líquidos), impartido por el daño mecánico en la ruptura física de las fibras, por la destrucción y degeneración de las mismas.

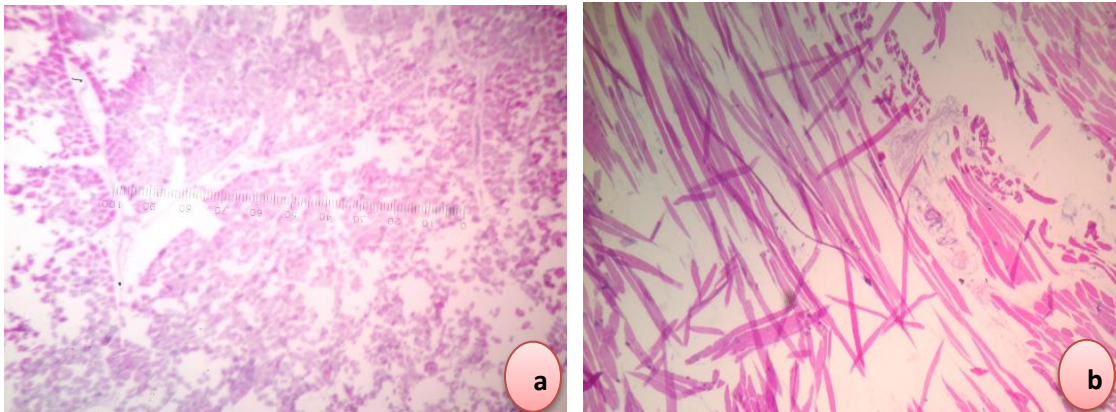


Figura 50. Corte de carne congelada, (a) daño mecánico a las fibras musculares, (b) separación y ruptura de algunas fibras (100x)

Al aplicar una congelación lenta, los cristales de hielo se forman entre las fibras, las muestras que se congelaron de esta manera tienen formación de cristales de hielo de forma irregular, este tipo de formación de cristales deforman el tejido empujando las fibras musculares en grupos (Figura 50a), las fibras que se separan individualmente por los cristales de hielo y se pueden ver en algunos lugares mostrados en la Figura 50b. Tras la congelación, la estructura parece ser afectada por el proceso en sí.

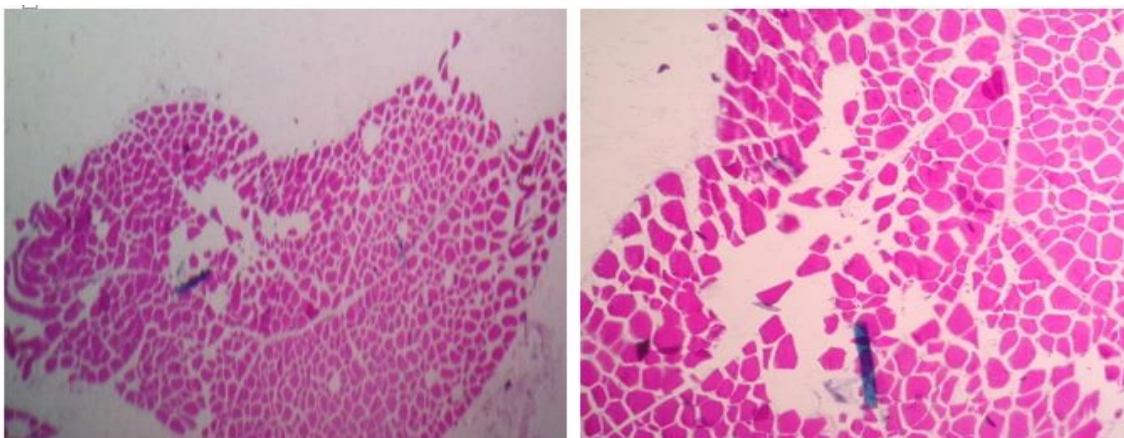


Figura 51. Cortes de carne congelada espacios formados por cristales de hielo (40x)



Como se muestra en la Figura 51, la alteración de estos paquetes de fibras y la aparición de numerosos cristales de hielo intracelular es consistente con la separación, se pueden ver claramente los espacios formados entre las fibras que dejan dichos cristales, de donde se deduce que a aplicación de este tratamiento para la conservación de carne resulta perjudicial.

Estos espacios formados se deben a que la concentración de agua en el espacio intercelular es mayor, además la presencia de sal en el líquido entre las fibras favorece un punto de congelación más alto que dentro de las fibras. Durante la congelación lenta la cristalización se forma primero en los espacios intercelulares, la congelación de esta porción de agua aumenta la concentración de sólidos disueltos en el agua restante, y esto a su vez aumenta la presión osmótica del líquido en los espacios intercelulares. Con el fin de igualar la concentración de sólidos en el líquido entre y dentro de las fibras, el agua se difunde desde las fibras en los espacios intercelulares, esta agua se congela por “adherirse” a los cristales ya formados haciendo que exista un mayor crecimiento de los mismos (Grujic *et al.*, 1993).

Finalmente el comportamiento anómalo del hielo es una de las peculiaridades más notables del agua, su volumen específico es más alto que la del agua líquida, este efecto permite un mayor contacto entre las moléculas ya que la formación de estructuras cristalinas es más evidente durante la congelación. El aumento en el volumen es responsable de gran parte del daño que sufren los sistemas biológicos, como el volumen específico es más grande en los cristales de hielo puede dar lugar a daños mecánicos, desprendimiento de las fibras, mayores espacios intercelulares e interrupción de los tejidos (Martino y Zarutzky, 1989).



3.5.3 Carne Recongelada

En las muestras de carne Recongelada se puede observar (Figura 52) que los cristales de hielo que se forman entre las fibras son lo suficientemente grandes como para comprimir, deformar y fisurar las fibras, la separación y fracturas en las fibras son más evidentes.

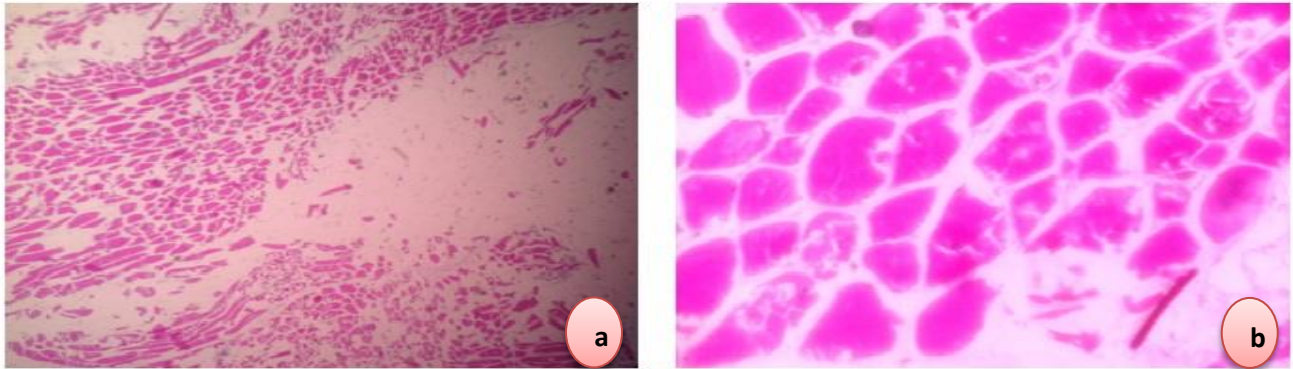


Figura 52. Corte de carne Recongelada, (a) compresión y separación de las fibras 40x, (b) ruptura de las fibras (100x).

La formación de cristales intra e intercelular comprimen favoreciendo este fenómeno, debido a la presión existente entre el cristal y la pared de la fibra. Estos cambios estructurales llevan a una mayor pérdida de agua constitutiva durante la descongelación, provocando fenómenos de deshidratación, más intensos entre mayor número de ciclos de congelación-descongelación. Algunas fibras se rompen como se muestra en la Figura 53, debido a la presión de los largos y amorfos cristales de hielo. La misma imagen muestra un desprendimiento (las fibras deshidratadas se separan ya sea individualmente o en pequeños grupos) de las fibras aunque se ven mayormente comprimidas, y las uniones intracelulares se muestran de manera interrumpida.

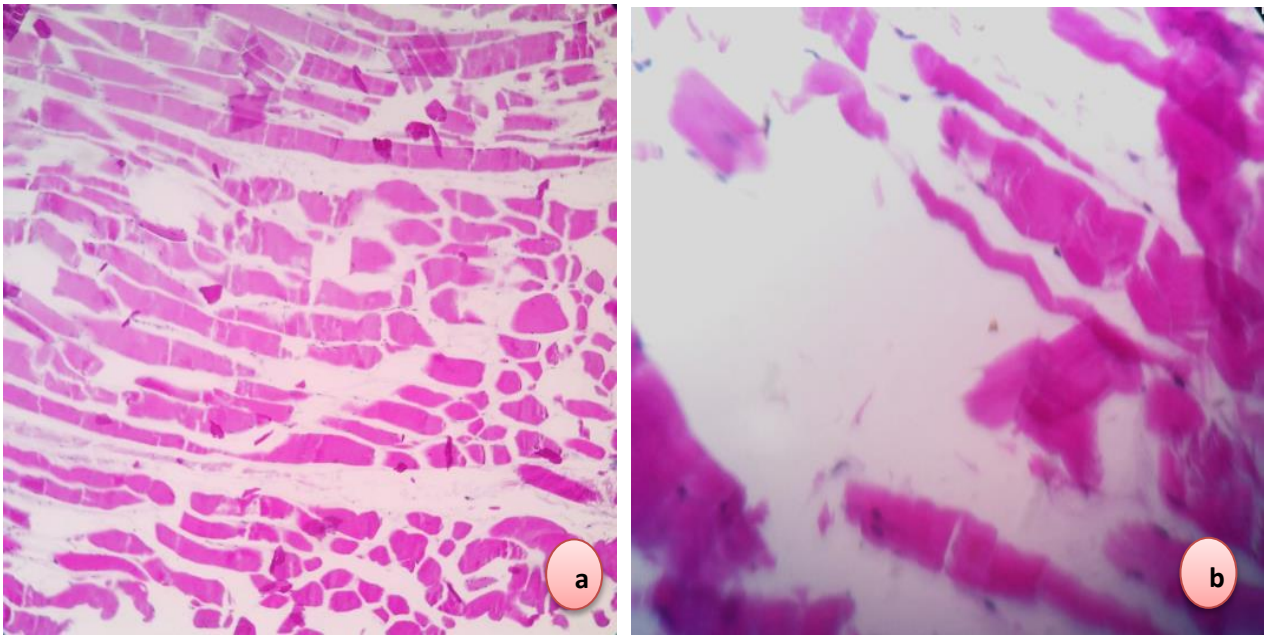


Figura 53. (a) Unión interrumpida de las fibras por cristales 40x, (b) fisuras de las fibras en carne Recongelada 100x

En la Figura 53b se muestra que las fisuras son visibles en el interior de las fibras, probablemente por la pérdida de agua, cuando la carne es sometida a una segunda congelación, posiblemente la formación de cristales son de gran tamaño y se producen intracelularmente, las fibras en la región de dichos cristales se comprimen, dando lugar a las deformaciones y en algunos casos a las alteraciones y fisuras en las fibras, debido a la presión de los cristales, una ampliación de 100x (Figura 54), muestra mejor la ruptura interna de las fibras individuales.

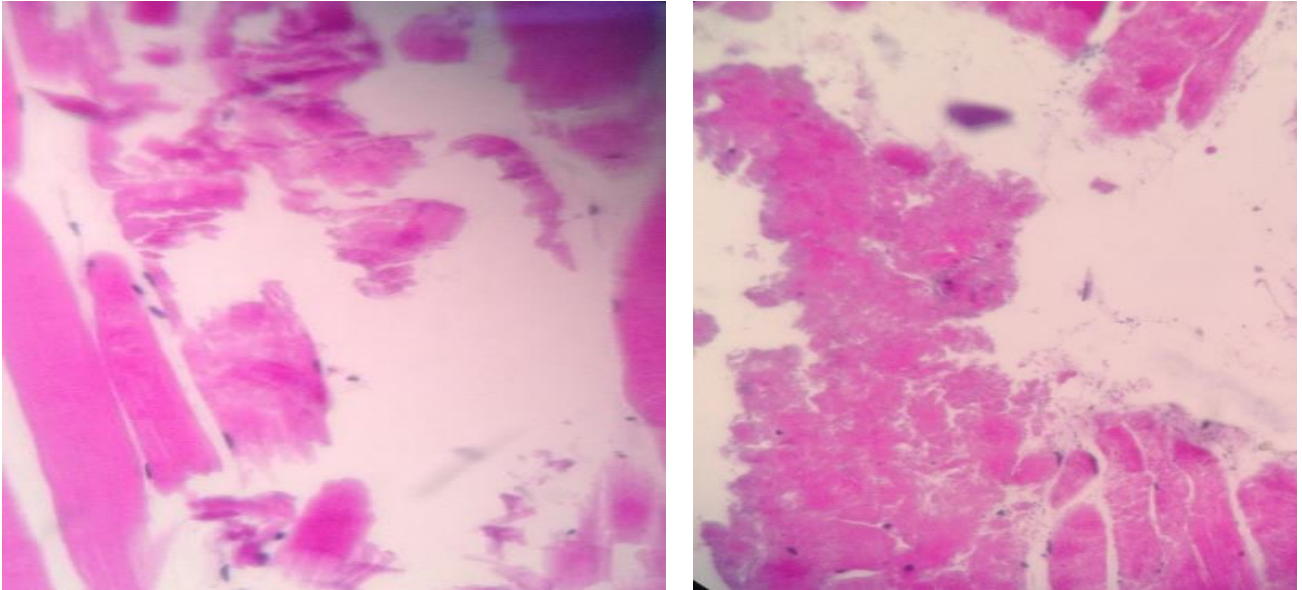


Figura 54. Ruptura interna entre las fibras de la carne recongelada (100x).

En la Figura 55 se puede observar que durante la congelación lenta las muestras presentan una mayor expansión en el espacio entre las fibras causadas por los cristales de hielo intercelulares, las fibras están separadas en paquetes y muchas de estas están rasgadas por el hielo, esto se puede percibir mejor en las fotografías de la Figura 56 con el objetivo 100x.

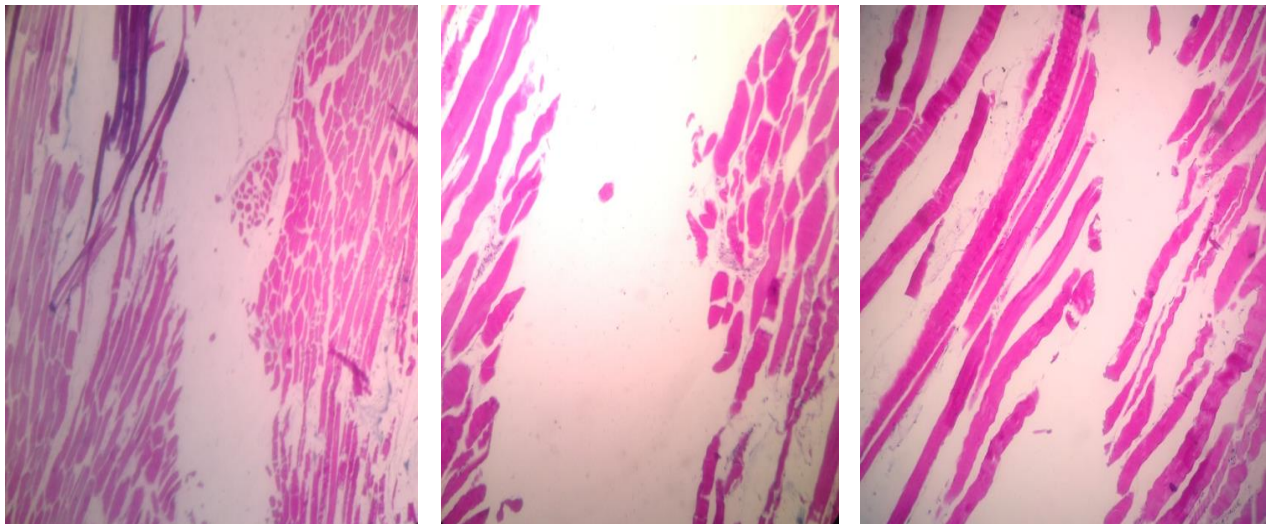


Figura 55. Mayor espacio de las fibras microscopio óptico (40x)

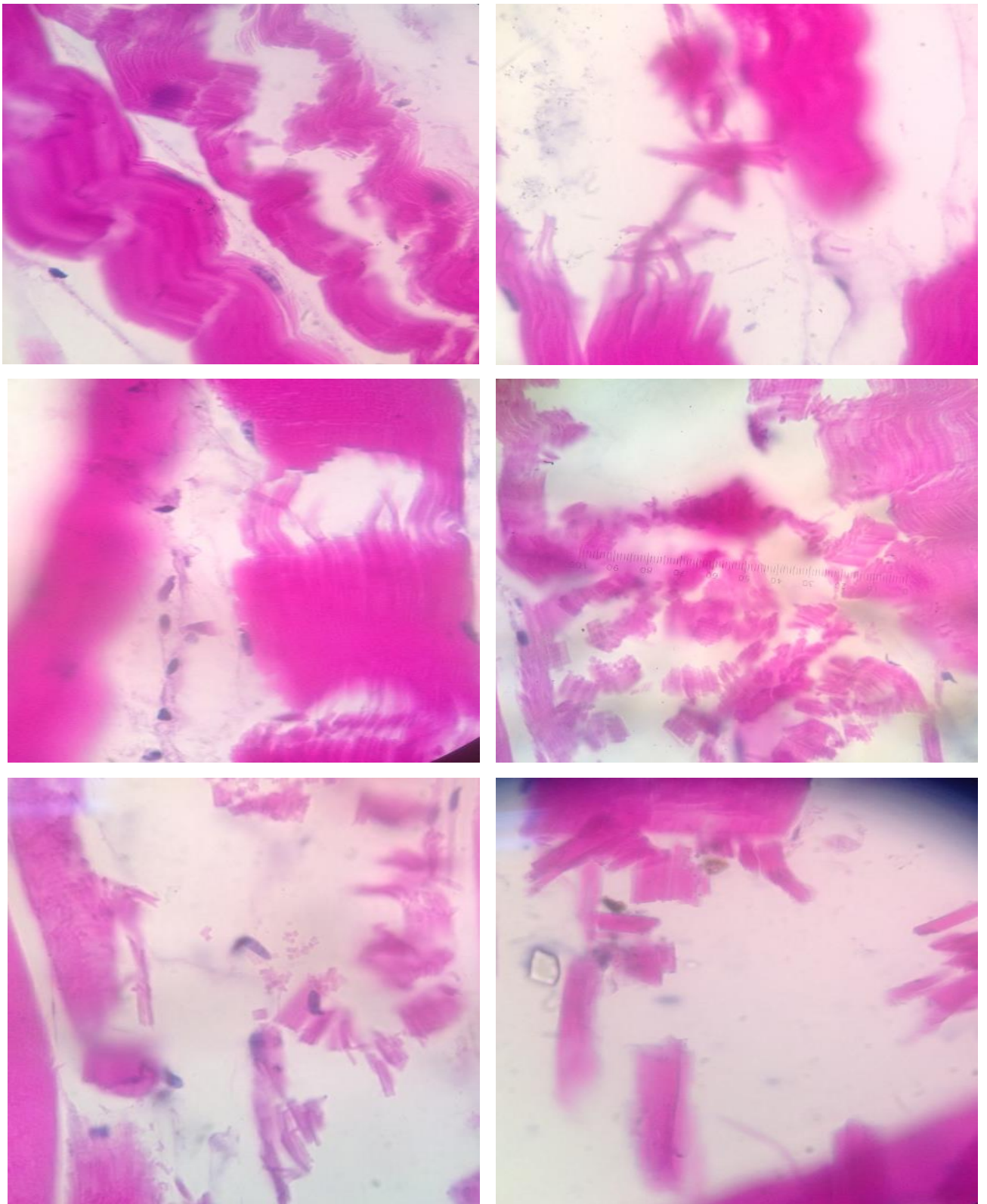


Figura 56. Ampliación 100x muestras de carne recongelada, ruptura interna, desprendimiento y fisura de las fibras musculares



Un punto importante en la formación de cristales es que se lleva a cabo de forma heterogénea, ya que se trata de un sistema biológico, este sistema multicomponente, contiene muchas sustancias que evitan que los cristales se formen de manera homogénea, dado este fenómeno, el daño provocado es mayor en un sistema cárnico, de hecho, un aumento en la cantidad de goteo, probablemente es atribuible a una distribución no homogénea del hielo intracelular (Añon y Calvelo, 1980).

Por otra parte, las fuerzas mecánicas ejercidas por los cristales de hielo y la eliminación de agua (deshidratación por exudación), causan daño en las fibras de manera inter e intracelularmente. En la Figura 57 se presenta como el hielo formado entre dos fibras interrumpe la unión de las mismas creando un mayor espacio entre ellas (ruptura de la unión celular).

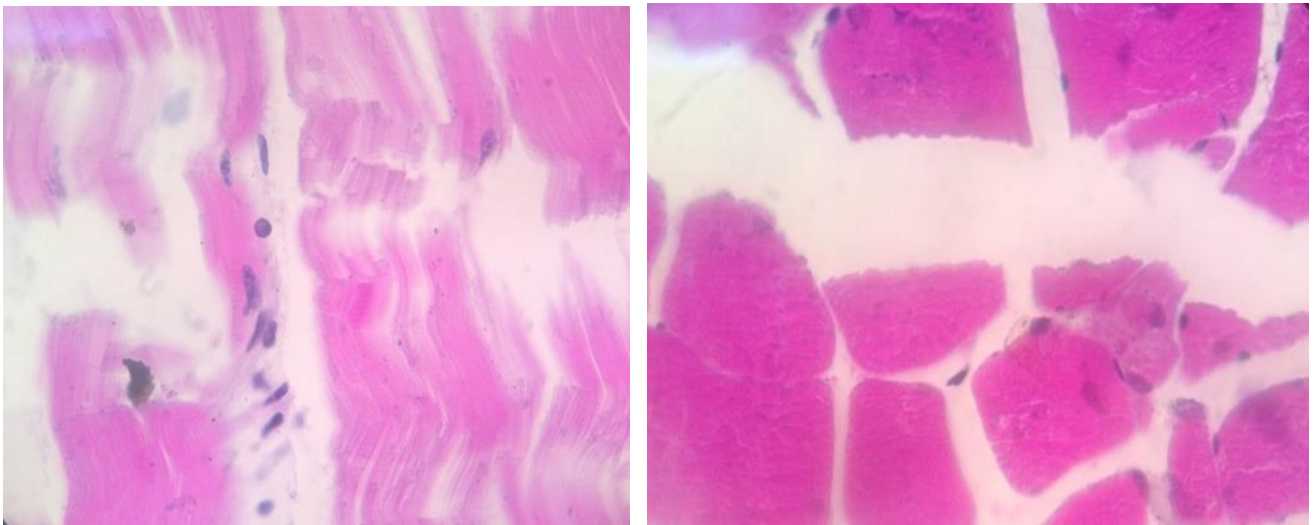


Figura 57. Formación de cristales de hielo entre las fibras (40x).

Cuando la temperatura de la carne disminuye hasta el valor que permite la formación de centros de cristalización dentro de las fibras, estos últimos no se producen, desde el punto de vista termodinámico, es más probable el crecimiento de los cristales ya existentes, que el proceso de formación de nuevos núcleos de cristalización debido a que se requiere menor energía de activación en el crecimiento de cristales que en la formación de los núcleos (Grujic, 1993).

Por el contrario en una congelación rápida, la eliminación de calor es suficiente para iniciar la formación de cristales de hielo dentro y fuera de las fibras, pero como no hay suficiente tiempo para que el agua deje las fibras, se congela dentro de ellas, Cassens (1971) informó que



a temperaturas por debajo de los -40°C los cristales de hielo se forman exclusivamente en el interior de las fibras. Bevilacqua (1980) relaciona la ubicación de la formación de cristales de hielo con el tiempo de congelación, estos autores demostraron que en muestras de carne congelada (congelación rápida) en tiempo menor a 23 minutos, los cristales son formados intracelularmente; mientras que en las muestras con tiempo mayor, ocurre de manera intercelular.

3.5.4 Análisis comparativos de los cambios micro estructurales de carne de res sometida a ciclos de congelación.

Cuando la carne es sometida a repetidos ciclos de congelación-descongelación se ocasionan daños en las fibras musculares con rupturas y desprendimientos e incluso la compresión generada por la localización y geometría irregular de los cristales sobre las fibras es tanta que estas llegan a generar cambios estructurales severos y como consecuencia existe un deterioro en la calidad de la carne. En la Figura 58 se puede observar que las fibras de la carne **refrigerada** (a) se encuentran unidas por el tejido conectivo y el espacio entre las fibras es regular y continuo, sin embargo la carne **congelada** (b) muestra los espacios generados por los cristales de hielo y las fibras están comprimidas, finalmente en la carne **recongelada** (c) se pueden observar un mayor número de espacios entre las fibras, estas llegan a desprenderse y a fisurarse, provocando los mayores cambios estructurales.

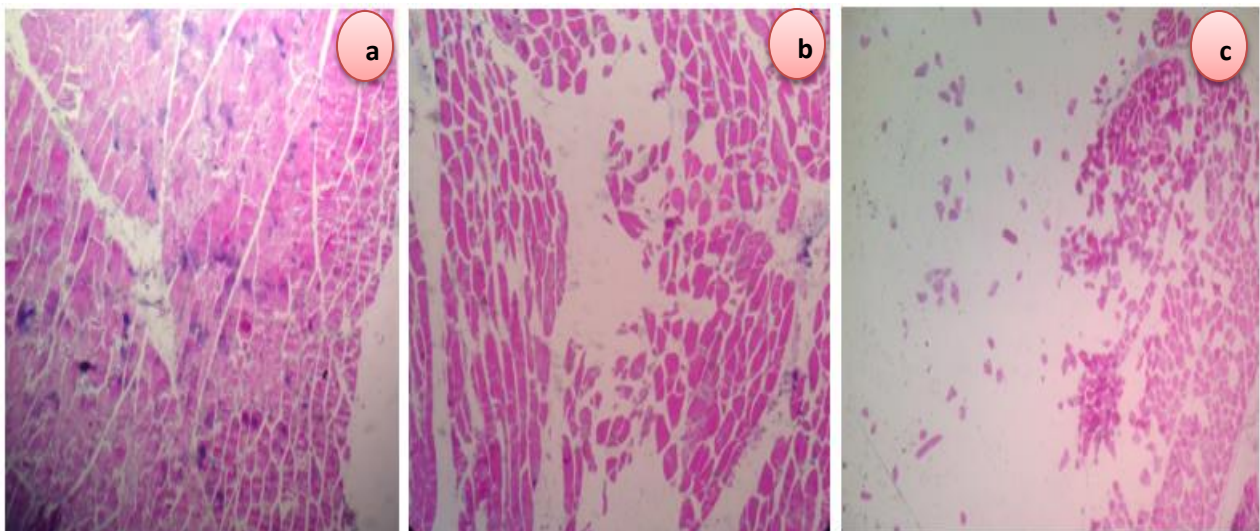


Figura 58. Micrografías de (a) Carne refrigerada, (b) Carne Congelada, (c) Carne Recongelada (40x)



Para una mejor observación se utilizó el objetivo 100x y las imágenes se muestran en la Figura 59, con evidencia de los cambios perjudiciales en las fibras, de izquierda a derecha se muestra que en la carne **refrigerada** las fibras están completas y unidas. En la imagen de en medio se observa que cuando se someten a congelación estas se desprenden y fisuran. Por último cuando la carne se recongela las fisuras y el estallido de las fibras es más evidente. Es indudable que una congelación lenta y el abuso de las fluctuaciones de temperatura causan daños mecánicos en las fibras de la carne Figura 60.

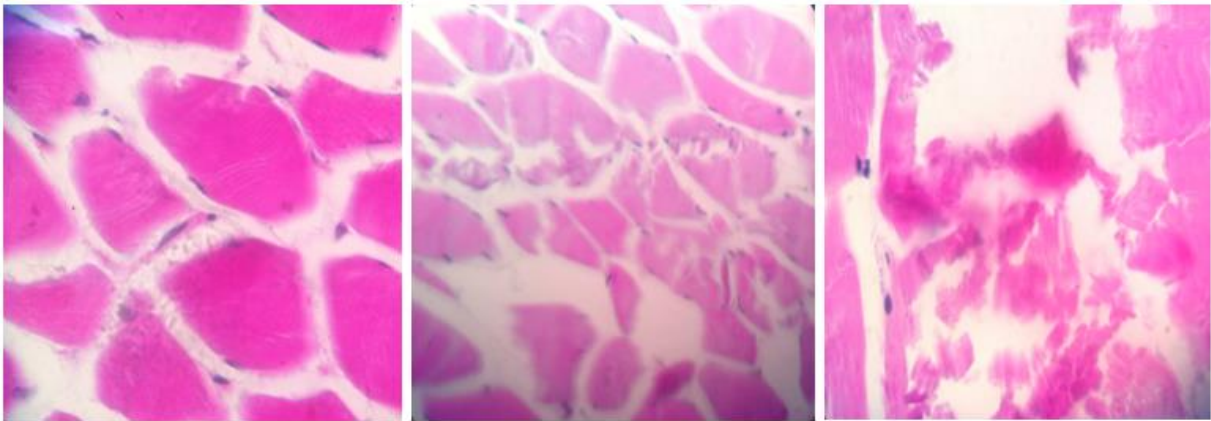


Figura 59. Micrografías 100x de carne sometida a ciclos de congelación-descongelación

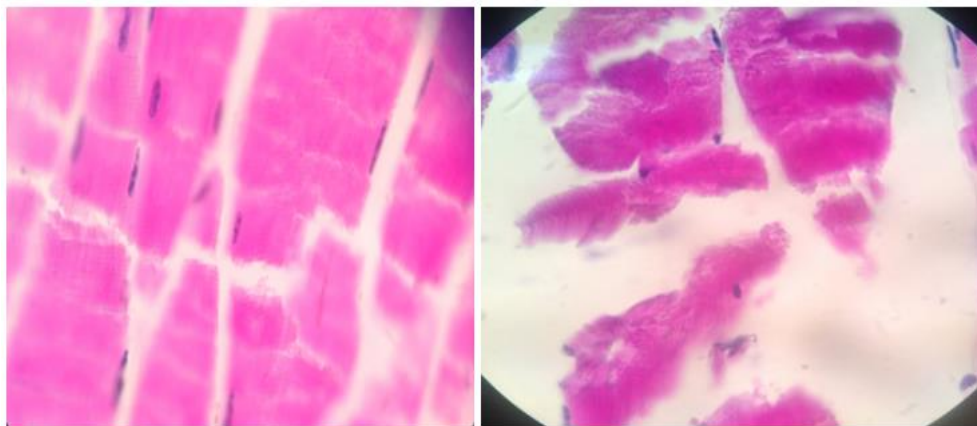


Figura 60. Daños mecánicos a las fibras musculares provocados por aplicación de bajas temperaturas



Añon y Calvelo (1980), utilizaron microscopía de barrido en estudios sobre el envejecimiento de la carne durante periodos prolongados de conservación en congelación, además cuantificaron los volúmenes de los exudados de las carnes sometidas a diferentes temperaturas y tiempos, por lo que son considerados los pioneros en utilizar metodologías para demostrar el deterioro en la calidad de la carne por efectos de la aplicación de frío. Ellos llegaron a la conclusión que el líquido exudado de la carne es producido por el efecto que tiene la presión que ejerce la cristalización, así como el tamaño, geometría y localización de los cristales en la ruptura, fisura, rompimiento y estallido de las fibras musculares. En el presente trabajo se utilizaron técnicas histológicas para optimizar las preparaciones que permitieran una mejor observación de las macro y microestructuras de las fibras musculares.



CONCLUSIONES

En la búsqueda de evidenciar los cambios que tiene la aplicación de frío (refrigeración, congelación, recongelación) en carne de res sometida a ciclos de congelación-descongelación, se evaluó el efecto en microestructuras, mediante electroforesis en gel para evaluar el impacto sobre las proteínas miofibrilares (actina, miosina) y sarcoplásmicas (mioglobina), así como de técnicas histológicas y de microscopía en el análisis de microestructuras.

- Los resultados de los perfiles electroforéticos obtenidos con soluciones desnaturizantes (SDS) no demostraron significancia en la obtención de los pesos moleculares aparentes de las cadenas ligeras y pesadas de miosina, así como de actina o mioglobina, al comparar los resultados obtenidos con el empleo de la combinación de agentes reductores (β -Mercapto-etanol) y caotrópicos (urea) en las soluciones de extracción, sin embargo éstos últimos permitieron una mayor definición de las bandas proteicas para un mejor análisis de densitometría de las proteínas de estudio.
- Los pesos moleculares aparentes de la Cadena ligera de miosina, Cadena pesada miosina, Actina y Mioglobina para cada tratamiento no mostraron diferencia significativa ($P=0.01$).
- Al analizar los resultados de los pesos moleculares aparentes obtenidos, de las proteínas de estudio, tras la aplicación de los tratamientos (refrigeración, congelación, recongelación), se encontró diferencia altamente significativa ($P=0.01$) al compararlos entre sí.
- Los cambios estructurales durante el procesamiento térmico a bajas temperaturas demostraron que la carne de res es susceptible a ciclos de congelación, descongelación, recongelación.
- Las técnicas histológicas aplicadas y su observación al microscopio en muestras de carne sometida a distintos tratamientos, permitieron analizar los cambios en la forma y unión de las fibras musculares, debidos a la formación de cristales de hielo que ocasionaron ruptura y desprendimiento de las mismas.
- Los mayores cambios estructurales se observaron en la carne recongelada.



Finalmente este estudio se puede utilizar para ampliar y mejorar procesos industriales con esta nueva comprensión del impacto de las bajas temperaturas y del comportamiento de los cristales de hielo durante el proceso y almacenamiento de la carne.



Referencias

- Amerling, C. (1977). *Tecnología de la carne* (58-60 ed.). España: Acribia.
- Añon, M., & Calvelo, A. (1980). Freezing rate effects on the drip loss of frozen beef. *Meat Science*, 4, 1-14.
- Badui, S. (2006). *Química de alimentos* (Tercera edición ed.). México: Pearson.
- Benjakul, S., Visessanguan, W., Thongkaew, C., & Tanaka, M. (2003). Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage. *Food Research International*, 36, 787-795.
- Berg, J. (2008). *Bioquímica*. España: Reverté.
- Bevilaqua, A. (1980). Food Technology. *Meat Science*, 15, 579-589.
- Carballo, B., & López de torre, G. (1991). *Manual de bioquímica y tecnología de la carne*. España: Vicente.
- Camacho B., Ramírez, N., Moreno, J. (2005). Evaluación fisicoquímica de pulpa de coroba almacenada en condiciones de congelación. *Ciencia y tecnología alimentaria*, 5 (1), 25-29.
- Cassens, R. G. (1971). The science of meat and meat products. *Meat Science*, 45, 11.
- Casserly, Ú., Mooney, M., & Troy, D. (2000). Standardization and application of a semi quantitative SDS-PAGE method for measurement of myofibrillar protein fragments in bovine longissimus muscle. *Food Chemistry*, 69, 379-385.
- Chan, L. (1983). Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrate. *Journal Food Science*, 4, 48-57.
- Chávez, B. E., & Angeles, C. (2010). *Manual para la materia de biología del desarrollo e histología veterinaria*. México: UNAM: Fes Cuautitlán.
- Cheftel, J., & Besancon, P. (1980). *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. México: Acribia.
- Claeys, E., Balcaen, A., Raes, K., & Dmeyer, D. (2004). Quantification of fresh meat peptides by SDS-PAGE in relation to ageing time and taste intensity. *Meat Science*, 67, 281-288.
- Damez, J. L., & Cleiron, S. (2008). Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure. *Meat Science*, 80, 132-149.



- Dileep, A., Omana, G. P., & Mirko, B. (2011). Effect of different ingredients on color and oxidative characteristics of high pressure processed chicken breast meat with special emphasis on use salt. *Innovate Food Science and Emerging Technologies*, 12, 244-254.
- Duncan, G., & Hershey, J. W. (1984). Evaluation of isoelectric focusing running conditions during two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: Variation of gel patterns with changing conditions and optimized isoelectric focusing conditions. *Analytical Biochemistry*, 138, 144-155.
- García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ GIAG*, 2, 31-41.
- García, L. L. (2003). *Procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*. Lima: INS.
- Garrido, G. I., Salinas, E., & Cornejo, M. A. (2003). *Manual de colorantes para laboratorios de ciencias biológicas*. México: UNAM: Fes Cuautitlán.
- Genot, C. (2003). *Congelación y calidad de la carne*. España: Acribia.
- Gil, M., Guerrero, L., & Sárraga, C. (1999). The effect of meat quality, salt and ageing time on biochemical parameters of dry longissimus dorsi muscle. *Meat Science*, 51, 322-337.
- Grujic, R., Petrovic, L., & Pikula, B. (1993). Definition of the optimum freezing, investigation of structure and ultrastructure of beef M. Longissimus dorsi frozen at different freezing rates. *Meat Science*, 33, 301-318.
- Helander, E. (1957). On quantitative muscle protein determination. *Physiology Scandinavica*, 41, 141-157.
- Herrera, r., Bolaños, N., & Lutz, G. (2003). *Química de los alimentos*. Costa Rica: Acribia.
- Jasper, P. (1978). *Conservación de la carne por frío*. España: Acribia.
- Jeong, J., Kim, G.-D., & Joo, S.-T. (2011). Effect of freeze-thaw cycles on physicochemical properties and color stability of beef. *Food Research International*, 44, 3222-3228.
- Kim, K., Soohyun, C., Seung, H. L., Hye, R. P., & Yong, M. C. (2008). Proteins in longissimus muscle of korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Science*, 80, 1968-1073.
- Koolman, J., & Röhm, H. (2004). *Bioquímica texto y atlas* (tercera edición ed.). México: Medica Panamericana.
- Lambin, P., Rochu, D., & Fine, J. M. (1976). A new method of determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). *Analytical Biochemistry*, 74, 567-575.



- Lawrie, R. (1980). *Avances de la ciencia de la carne*. España: Acribia.
- Leygonie, C., Britz, T. J., & Hoffman, L. C. (2012). Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. *Meat Science*, *91*, 93-98.
- Liebler, D. (2002). *Introduction to proteomics tools for the new biology*. New Jersey: Human Press.
- Liu, G., Xiong, Y. L., & Butterfield, D. A. (2000). Chemical, physical, and gel-forming properties of oxidized myofibrils and why-and soy-protein isolates. *Journal of Food Science*, *65*, 811-818.
- Liu, Z., Xiong, Y., & Cheng, J. (2010). Protein oxidation enhances hydration but suppresses water-holding capacity in porcine Longissimus dorsi muscle. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, *58*, 10697-10704.
- Lomonte, B. (2009). Electroforesis en geles de poliacrilamida. *IG*, *45*, 92-100.
- Madrid, V. (1992). *Los aditivos en los alimentos*. España: Mundi - Prensa.
- Maldonado, A., & Jorrín, J. V. (2001). Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida: análisis de proteínas de hojas de arabidopsis thaliana. *DBBM*, *2*, 1-16.
- Martino, M. N., & Zarutzky, N. E. (1989). Ice recrystallization in a model system in frozen muscle tissue. *Cryobiology*, *26*, 138-148.
- Molina, A., Otero, L., Martino, M. N., & Sanz, P. D. (2004). Ice IV of meat: supercooling and ultrastructural studies. *Meat Science*, *66*, 709-718.
- Moreno, B. (2006). *Higiene e inspección de carnes I* (segunda edición ed.). España: Díaz de Santos.
- NOM-008-Z00-1994. (s.f.). Especificaciones zoosanitarias para la construcción y equipamientos de establecimientos para el sacrificio de animales y los dedicados a la industrialización de productos cárnicos .
- NOM-009-ZOO-1994. (s.f.). *Proceso sanitario de la carne*.
- NOM-008-ZOO-1994. (s.f.). *Especificaciones zoosanitarias para la construcción y equipamiento de establecimientos para el sacrificio de animales y los dedicados a la industrialización de productos cárnicos, en aquellos puntos que resultaron procedentes*.
- Ojeda, M. A., Wagner, J. R., & Crupkin, L.-W. (2001). Biochemical properties of myofibrils from frozen longissimus dorsi muscle of three lamb genotypes. *Food Technology*, *34*, 390-397.



- Pearce, L. K., Rosenvold, K., Anderson, H., & Hopkins, D. (2011). Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and. *Meat Science*, 89, 111-124.
- Plank, R. (2005). *El empleo del frío en la industria*. España: Reverté.
- Ragnarsson, K., & Regenstein, J. M. (1989). Changes in electrophoretic patterns of gadoid and non.gadois fish muscle during frozen storage. *Journal Food Science*, 54(4), 819-823.
- Ramirez, R. (2006). *Tecnología de cárnicos*. Bogotá: ISBN UNAD.
- Rangel, L. (2011). *Estudio microscópico e histológico del efecto antiulceroso de la decocción de Koheleria Deppeana (Tlalchichinole)*. México: UNAM: Fes Cuautitlán.
- Ranken, M. (2000). *Manual de industrias de la carne*. España: Mundi - Prensa.
- Schmidt, K., & Wong, T. (2009). Determination of meat quality by texture analysis. *Meat Science*, 19, 1319-1324.
- Schmidt, M. (1957). *Protein methods*. New Jersey: IRL Press.
- Segal, C., & Ortega, G. J. (2005). *Manual de prácticas de biología moléculas de la célula I*. México: Publidisa.
- Swatland, H. J. (1995). *Evaluación de la carne en la cadena de producción*. España: Acribia.
- Toldrá, F., Millares, C. M., & Flores, J. (1991). Protein extractability in dry-cured ham. *Food chemistry*, 44, 391-394.
- Welsch, S. (2006). *Histología*. España: Panamericana.
- Xia, X., Kong, B., & Lui, J. . (2009). Physicochemical changes and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as influenced by different freeze/thaw cycles. *Meat Science*, 83, 239-245.



ANEXOS

I. PREPARACION DE SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN

a. Proteínas sarcoplásmicas

1. 0.03M KH_2PO_4 pH=7.4

PM= 136.09 g/mol

0.68 g/mol ----10 mL **Stock** 1M

$$V1 = \frac{C2 \cdot V2}{C1} = \frac{(0.03M)(50 \text{ mL})}{1M} = 1.5 \text{ mL se llevan a 50 mL para la extracción}$$

b. Proteínas miofibrilares

2. 0.1M Tris / HCL + 1% SDS pH=7.0

3. 8M Urea + 1% (v/v) 2-mercaptoetanol pH=7.0

PM Urea= 60.06 g/mol o Da

Formula química $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$

CON_2H_4

c. Determinación de pH

El pH debe estar dentro del intervalo de pH sobre la que la proteína de interés es estable y conserva la actividad biológica. Este pH debe impartir la carga suficiente para que la proteína sea extraída.

La determinación de pH requiere de la comparación de potencial desarrollado en una celda que contiene un electrodo indicador sumergido en la disolución problema frente al potencial cuando dicho electrodo se sumerge en una o más disoluciones patrón con concentración conocida de iones H^+ a una temperatura estable de 20 ± 2 °C.

Procedimiento

- Colocar el potenciómetro de bulbo en la mesa de trabajo
- Conectar el electrodo al equipo
- Encender el equipo
- Calibración del equipo con buffers pH=4, pH=7, pH=10 (Se recomienda calibrar después de 20 mediciones)
- Determinar pH de los reactivos



II. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

El sistema de soluciones de Laemmli es un sistema discontinuo que incorpora SDS en la solución. En este sistema las proteínas se desnaturalizan por calentamiento en la solución que contiene SDS y un agente reductor como 2-mercaptoetanol. Los polipéptidos se desnaturalizan y adquieren una forma de varilla uniforme proporcional entre masa/carga.

a. Solución stock

1. Acrilamida/ Bis (30% T, 2.67% C)

87.6g	acrilamida	(29.2g/100ml)
2.4g	N ^o N-bis-metil-acrilamida	(0.8g/100ml)

Aforar a 300 ml con agua des ionizada. Filtrar y almacenar a 4°C en un frasco ámbar (30 días máximos)

2. 10% SDS (w/v)

Disolver 10 g en 90 ml de agua con agitación suave y aforar a 100 ml con agua des ionizada.

3. 1.5 M Tris-HCL, pH 8.8

27.23g	Tris base	(18.15 g/100ml)
80 ml	agua des ionizada	

Ajustar el pH a 8.8 con 6N HCL. Aforar a un volumen total a 150ml con agua des ionizada y almacenar a 4°C.

4. 0.5 M Tris- HCL, pH 6.8

6g	Tris base	
60 ml	agua des ionizada	

Ajustar el pH a 6.8 con 6N HCL. Aforar a un volumen total a 100 ml con agua des ionizada y almacenar a 4°C.

HCL 1N T=25°C

Proveedor: J.T. Analyzed

Lote: E29 C22

HCL CAS No. 7647-01-0

H₂O CAS No. 7732-18-5



5. Sample buffer (SDS Reducing Buffer)

3.55 ml	agua des ionizada
1.25 ml	0.5 M Tris-HCL, pH 6.8
2.5 ml	glicerol
2.0 ml	10% (w/v) SDS
0.2 ml	0.5% (w/v) azul de bromophenol
9.5 ml	volume total

Almacenar a temperatura ambiente.

Añadir 50 μ l de 2-mercaptoetanol a 950 μ l de la solución muestra, posteriormente diluir 1:2 y calentar a 95°C durante 4 minutos.

6. 10x Electrodo en ejecución , pH 8.3 (aforar a 1L)

30.3g	Tris base
144.0g	glicina
10.0g	SDS

Disolver y aforar a un volumen total de 1000 ml con agua des ionizada. No ajustar pH. Almacenar a 4°C. Si se produce una precipitación llevarlo a temperatura ambiente antes de su uso.

Uso: Diluir 50 ml de 10x stock con 450 ml de agua des ionizada para corrida de electroforesis

7. 10% (w/v) APS (diario y fresco)

100mg	persulfate de amonio
	Disolver en 1 ml de agua des ionizada

b. Soluciones de tñido y desteñido

1. Solución teñidora

Azul de commassie brillante R-250	1 g
Metanol	450 mL
Acido glacial acético	100 mL
Agua	450 mL

2. Solución desteñidora

Metanol	100 mL
Acido glacial acético	100 mL
Agua	800 mL



Nombre de archivo: TESIS
Directorio: C:\Users\IIF\Desktop\CAMBIOS TESIS
Plantilla: C:\Users\IIF\AppData\Roaming\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título: Ingeniería en alimentos
Asunto:
Autor: Usuario
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 15/01/2014 10:50:00 a.m.
Cambio número: 3
Guardado el: 16/01/2014 07:23:00 p.m.
Guardado por: IIF
Tiempo de edición: 32 minutos
Impreso el: 16/01/2014 07:48:00 p.m.
Última Impresión completa
Número de páginas: 113
Número de palabras: 26,864 (aprox.)
Número de caracteres: 147,754 (aprox.)