



CAMBIOS PROTEICOS Y MODIFICACIONES DE LOS CROMÓFOROS CAUSADAS POR ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

Giménez Belén^a, Rodríguez^b Hernán B, Graiver^a, Natalia, Zaritzky^{a,c} Noemi

^aCentro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET, Fac. de Cs Exactas, UNLP. 47 y 116, La Plata (1900), ARGENTINA.

^bINIFTA (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Diag. 113 y Calle 64, La Plata, Argentina. ^cDepto. de Ing. Química, Fac. de Ingeniería, UNLP. 47 y 1, La Plata (1900), ARGENTINA, belengimenez@live.com.ar

Resumen

La tecnología de altas presiones hidrostáticas (APH) se basa en la aplicación de presiones entre 100 y 900MPa por tiempos cortos en alimentos envasados al vacío que luego se conservan bajo refrigeración. La aplicación de APH genera modificaciones conformacionales en las proteínas miofibrilares produciendo desnaturalización y transformaciones en los cromóforos (mioglobina y derivados). La utilización de preservadores químicos previo a la aplicación de la tecnología de APH mejora la coloración de la carne. En este trabajo se estudió el efecto de APH y la concentración salina del pre-tratamiento químico sobre las modificaciones conformacionales de las proteínas del músculo y el color superficial. Se utilizaron discos de carne vacuna que se sumergieron (2,5h) en una solución previamente optimizada conteniendo 0,6 g NaNO₂/L, 8,5 g ác. ascórbico/L y NaCl (S1: 30 g/L ó S2: 60 g/L). Las muestras se envasaron al vacío y se aplicó el tratamiento APH (100-600 MPa). Por medio de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Espectroscopía infrarroja (FTIR) se observaron las modificaciones en las proteínas. Al aumentar las presiones aplicadas se evidenció en los termogramas de DSC la reducción de los picos correspondientes a las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares. A partir de los espectros de FTIR y analizando la banda de Amida I (entre 1600 y 1700 cm⁻¹) se observó una disminución en el contenido de estructuras α -Hélice del 10%, para las muestras tratadas con la solución S2 y del 5% para las tratadas con la solución S1 (menor concentración de NaCl). El tratamiento APH afectó los parámetros de color, presentando las muestras tratadas a mayor presión un menor valor de a* (disminución de la coloración rojiza) y un mayor valor de L* (blanqueamiento). Las muestras tratadas con los preservadores químicos presentaron una menor variación de estos parámetros con respecto al control. Los cambios en el color se relacionaron con el contenido de los pigmentos de la carne bovina (mioglobina, oximioglobina, metamioglobina y nitrosomioglobina) utilizando el método de Reflectancia difusa, basado en la ecuación de Kubelka-Munk. La aplicación de presiones (100-600MPa) en carnes sin tratamiento químico provocó una decoloración de la matriz y destrucción de los cromóforos al aumentar la presión, evidenciada por la disminución de la función de Kubelka-Munk en el rango del espectro 450-750 nm. En las muestras pre-tratadas con los preservadores químicos disminuyó la decoloración por formación de nitrosomioglobina, que presentó mayor estabilidad frente a APH.

Palabras clave: carne bovina, color, reflectancia difusa, alta presión hidrostática, FTIR



1 Introducción

La alta presión hidrostática (APH) es una tecnología emergente que se destaca sobre los procesos térmicos porque dichos procesos causan inevitablemente una pérdida de nutrientes y sabores en los alimentos. Utilizando el tratamiento de APH se obtienen productos cuyas vitaminas, sabores, aromas y colores se conservan casi intactos, permitiendo extender su vida útil. Se basa en la aplicación de presiones entre 100 y 900 MPa por tiempos cortos a alimentos envasados en vacío que luego se conservan bajo refrigeración. La aplicación de APH genera modificaciones conformacionales de las proteínas de la carne produciendo desnaturalización, agregación o gelificación de las mismas, alteraciones principalmente causadas por la ruptura de las interacciones no covalentes proteína-proteína y la generación de nuevos enlaces inter e intramoleculares (Sun y Holley, 2010).

Al aplicar APH a niveles superiores a 300 MPa en carne bovina se afectan los parámetros de color, atenuando significativamente la tonalidad roja característica en la carne. Para contrarrestar este efecto se requiere un tratamiento previo con preservadores químicos como el nitrito que permita la formación de nitrosomioglobina, proteína más resistente a las altas presiones, manteniendo un color adecuado en la superficie de la carne (Giménez et al, 2015).

Las medidas de color en la carne están determinadas por la proporción relativa de oximioglobina (MbO₂), mioglobina (Mb) y metamioglobina (MetMb) (Francis y Clydesdale, 1975). La reflectancia difusa es una técnica no destructiva y está basada en la determinación del espectro de reflectancia de las muestras de carne. Para desarrollar un método que permita medir las concentraciones de los pigmentos que colorean la carne es preciso basarse en la teoría de Kubelka-Munk la cual se aplica en los puntos isobécticos correspondientes y a longitudes de onda determinadas por cada pigmento de la carne permitiendo seguir la evolución de la concentración de dichos pigmentos. Los puntos isobécticos son aquellas longitudes de onda del espectro de absorción de una muestra donde la absorbancia total no cambia durante reacciones químicas o cambios físicos. En el caso de la carne, cuyo cromóforo es la Mb y sus derivados, a dichas longitudes de onda, dichos pigmentos derivados de la mioglobina tienen el mismo coeficiente de absorción por unidad de concentración.

El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto de APH y la concentración salina del pretratamiento químico sobre las modificaciones conformacionales de las proteínas de la



carne bovina, el color superficial y el efecto sobre los pigmentos de la carne.

2. Materiales y métodos

2.1 Materia prima: se utilizaron cortes de cuartos traseros (nalga, músculos *adductor femoris* y *semimembranosus*). Los músculos se separaron luego de 48 horas postmortem y se recortó toda la grasa visible. Las materias primas tenían un valor de pH entre 5,4 y 5,7. Las muestras de carne fueron obtenidas luego en el laboratorio bajo condiciones asépticas, seccionando las mismas en forma circular de 0,3 cm de espesor y 6 cm de diámetro.

2.2 Tratamiento con solución salina de preservadores químicos: el proceso incluyó una etapa de inmersión de discos de carne (3 mm de espesor y 6 cm de diámetro, 2,5 h) en una solución preservadora compuesta por 0.62 g/L NaNO₂, 8.5 g/L ácido ascórbico y NaCl en dos concentraciones: 30 g/L (S1) o 60 g/L (S2).

2.3 Envasado de las muestras y aplicación del tratamiento de APH: las muestras de carne se envasaron al vacío en bolsas Cryovac BB4L y se sometieron al proceso de APH. Este tratamiento se llevó a cabo en un sistema de Stansted Fluid Power (modelo FPG9400:922, cilíndrico de 2 litros de capacidad, presión máxima de trabajo 900 MPa, rango de temperatura: de -20 a 120 °C) en el Laboratorio del INTA Castelar. La velocidad de presurización con la que opera el equipo es de 300 MPa/min y la despresurización se realizó instantáneamente. Se utilizaron seis niveles de presión (100, 200, 300, 400, 500 y 600 MPa), el tiempo de mantenimiento de APH fue de 5 min a 20 °C ± 5 °C.

2.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC): se analizó la desnaturalización proteica por efectos de la difusión de las sales de curado seguida del tratamiento de alta presión a través de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC Q100) (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA). Se obtuvieron muestras de 9-10 mg que fueron colocadas en cápsulas de aluminio y selladas herméticamente. Se empleó una velocidad de calentamiento en el DSC de 10 °C/min en el rango de 20 a 100 °C utilizando como referencia una cápsula vacía. Cada ensayo fue realizado utilizando 4 muestras.

2.5 Espectroscopía Infrarroja (FTIR): los espectros FTIR de las muestras de carne se registraron utilizando un Espectrómetro infrarrojo Nicolet™ iS™10, Thermo Scientific™, (Madison, USA) equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) de diamante. El análisis se realizó a temperatura ambiente; los espectros FTIR se

obtuvieron de 400 a 4000 cm^{-1} con 32 escaneos a 4 cm^{-1} de resolución. La interferencia de fondo se eliminó usando el software Omnic 8 (Thermo Scientific™, Madison, USA).

2.6 Determinación de parámetros de color: se realizó con un colorímetro triestímulo Minolta C400 el cual utiliza la escala de color CIE $L^*a^*b^*$, mediante la cual el color es descrito por los parámetros de luminosidad L^* , y de cromaticidad a^* y b^* . Las determinaciones se realizaron sobre 3 muestras de carne (6 medidas para cada muestra).

2.7 Reflectancia Difusa: los estudios de color se complementaron con la determinación de los espectros de reflectancia difusa que fueron obtenidos en un espectrofotómetro UV-visible de doble haz marca PG Instruments modelo T90+, equipado con accesorio de esfera integradora perteneciente al INIFTA (CONICET, UNLP). Se interpuso una placa de cuarzo (2 mm de espesor) entre las muestras y la esfera para evitar la contaminación de la misma, utilizándose BaSO_4 con la misma placa como referencia del 100% de reflectancia. Se seccionaron muestras circulares de carne (3 cm de diámetro, 4 mm de espesor) que se ajustaban a las dimensiones del porta-muestras del equipo. Se registraron medidas entre 400 y 800 nm.

2.8 Análisis Estadístico: los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software SYSTAT (SYSTAT Inc., 1990, v. 10.0). Las diferencias significativas entre las medias fueron determinadas por el método de la menor diferencia significativa, LSD ($P < 0.05$).

3 Resultados y discusión

3.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC): los termogramas de la carne

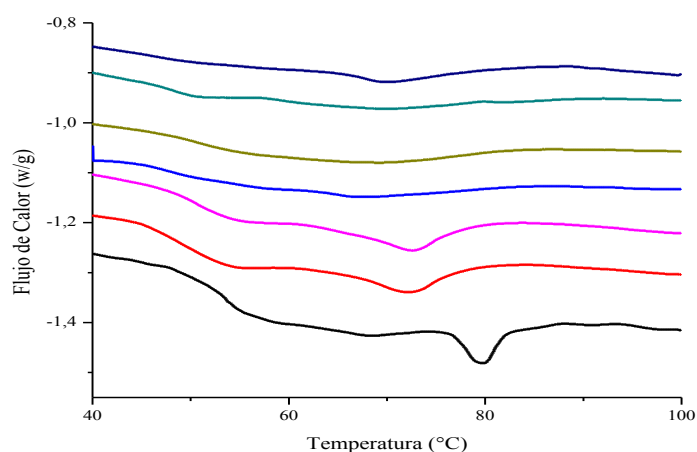


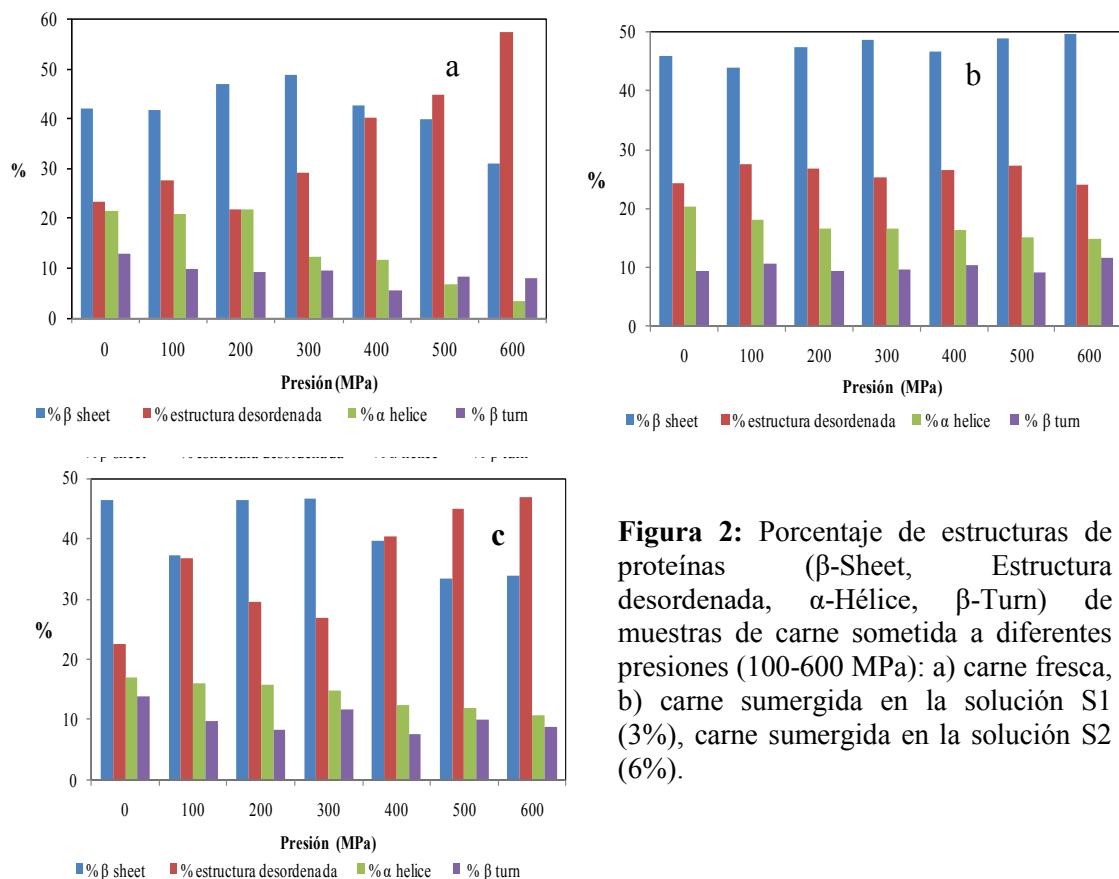
Figura 1: Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de carne fresca (—), carne sumergida en la solución de inmersión S1 (3%) (—) y carne sumergida S1 y sometida a 400 MPa (—) y a 600 MPa (—) y carne sumergida en la solución de inmersión S2 (6%) (—) y carne sumergida S2 y sometida a 400 MPa (—) y a 600 MPa (—).

obtenidos por DSC se vieron afectados por los diferentes niveles de presión del tratamiento APH y por la composición de la solución de inmersión, como se muestra en la **Figura. 1** Se observaron diferentes picos de transición particularmente en la carne fresca. Los primeros picos registrados entre 50 y 70 °C representan el rango de

temperatura de desnaturalización de la miosina y el pico entre 74-84 °C está asociado con la desnaturalización de actina (ambas proteínas miofibrilares).

Al analizar los termogramas para las muestras tratada con APH en el rango de presiones entre 100 y 600 MPa, se observa una disminución en el área de los picos de las proteínas miofibrilares. A partir de 500 MPa desaparecen los picos lo que implica desnaturalización de las proteínas por presión. La desnaturalización parcial de la proteína causada por los tratamientos de APH estaría relacionada con la desestabilización de interacciones no covalentes en estructuras terciarias y secundarias (Chapleau *et al.*, 2004). Para el caso de las muestras tratadas con los preservadores químicos y no sometidas a APH, se observó la disminución de la entalpía total con respecto a la carne fresca; esto podría deberse a la adición de NaCl. Barbut *et al.* (1991) estableció que un incremento en la concentración de las sales desestabiliza térmicamente a la miosina y a la actina.

3.2 Espectroscopía Infrarroja (FTIR): la banda de la Amida I entre 1600 y 1700 cm^{-1} (Figura 2) fue estudiada debido a que esta región es más sensible a cambios en las proteínas miofibrilares (Martinez *et al.*, 2017). Se obtuvieron los espectros de





deconvolución de Fourier (FSD) de esta región para mejorar la resolución espectral y para obtener una visión de los cambios en las estructuras secundarias, tales como hoja β (**β -Sheet**), α -hélice, giros β (**β -Turn**), así como estructuras al azar o desordenadas. Se encontraron cuatro bandas correspondientes a estructuras de las proteínas localizadas en las siguientes regiones de la Amida I: entre 1622-1624 cm^{-1} correspondiente a **β -Sheet**; 1654-1656 cm^{-1} a la fracción de α -Hélice, 1673- 1678 cm^{-1} a **β -Turn** y una banda en 1640 cm^{-1} correspondiente a una estructura desordenada.

En el ensayo se encontró que al someter las muestras a APH se produce una disminución del contenido de α - hélice y un aumento del contenido de estructura desordenada. Las muestras tratadas con la solución de inmersión presentaron una mayor estabilidad a las altas presiones, observándose una disminución menor en el porcentaje de α -Hélice. Al comparar el efecto de las concentraciones de cloruro de sodio (S1 y S2) las muestras que tenían mayor cantidad de NaCl, resultaron menos estables; esto puede estar relacionado con la desestabilización que produce esta sal en las proteínas (Graiver *et al.*, 2006). Estos cambios inducidos por APH indican que las presiones producen una desnaturalización parcial de las proteínas debido a la modificación de las interacciones no covalentes que estabilizan la estructura secundaria.

3.3 Determinaciones de color: en la **Figura 3** se observa la variación del color en las distintas muestras de carne sometidas dos niveles de presión utilizados (100 y 600 MPa). Se observa un mayor efecto de blanqueamiento (decoloración) en las muestras sometidas a alta presión sin un tratamiento previo con preservadores químicos. Las diferentes condiciones de tratamiento previo a APH (S1, S2 o control), las presiones empleadas y la interacción entre los dos factores, influyeron significativamente ($P < 0.05$) en los parámetros de color.

La luminosidad (L^*) de las muestras aumentó significativamente ($P < 0.05$) al incrementarse la presión: en la CF los valores pasaron de $44,44 \pm 0,43$ a 0MPa a $57,77 \pm 0,34$ a 600 MPa; en la muestra sumergida en la solución S1 (3%) $L^* = 44,15 \pm 0,51$ a 0MPa pasó a $58,0 \pm 30,14$ a 600MPa y en la S2 de $37,86 \pm 0,40$ a 0MPa a $51,4 \pm 60,35$ a 600MPa. Esto puede deberse a que los tratamientos de alta presión conducen a cambios en la estructura de las proteínas miofibrilares, provocando despolimerización como principal efecto e incrementando la relación de la luz reflejada y absorbida por el material (Campus *et al.*, 2008).

En las muestras que no fueron tratadas con la solución de inmersión (CF), el proceso de APH provocó una disminución del valor de a^* de $18,32 \pm 0,40$ (0MPa) a $14,24 \pm 0,26$

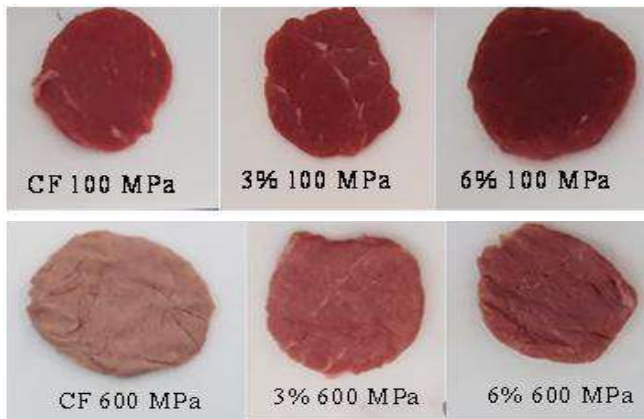


Figura 3: Cambios de coloración en muestras cárnicas frescas (CF) y tratadas con 3 y 6 % de NaCl sometidas a 100 y 600 MPa.

(600MPa). En cambio, el valor de a^* se incrementó con el aumento de la presión en las muestras sumergidas en la solución de inmersión, (S1 pasó de $17,47 \pm 0,37$ (0MPa) a $21,52 \pm 0,18$ (600 MPa) y en S2 de $18,77 \pm 0,40$ (0MPa) a $24,00 \pm 0,30$ (600MPa)) lo cual podría atribuirse a la formación de

nitrosomioglobina, proteína más estable a las altas presiones debido a su mayor resistencia a la oxidación que la mioglobina y la oximioglobina (Rubio *et al.*, 2007). El incremento del valor de a^* con la presión aplicada indicaría que la misma favorece la formación de nitrosomioglobina acentuando la coloración rojiza.

3.4. Reflectancia Difusa: la reflectancia difusa se refiere a la fracción de la luz incidente que es reflejada por una superficie, que ha sido parcialmente absorbida y parcialmente dispersada como resultado de su penetración en el interior de la muestra, y que presenta una distribución angular de reflexión (a diferencia de la reflexión especular que es direccional). La teoría más comúnmente aceptada sobre la reflectancia difusa ha sido desarrollada por Kubelka y Munk (Kortüm, 1969) y es válida para muestras poco absorbentes en sistemas reflectantes difusos.

En el marco de esta teoría, la carne se considerar como una matriz de material celular capaz de dispersar la luz, constituida por proteínas miofibrilares, tejido conectivo y pigmentos responsables de la absorción de la radiación (McDougall, 1970). La intensidad de la luz reflejada, y por lo tanto su color y apariencia, se rige por la interrelación entre la luz dispersada por componentes en el sistema, y la concentración y propiedades espectrales de absorción de los pigmentos. Los pigmentos rojos absorben luz en el espectro visible mientras que las estructuras no coloreadas y las proteínas miofibrilares dispersan y absorben (Bevilacqua y Zaritzky 1986).

Para poder determinar las concentraciones o variaciones en los pigmentos de la carne, en el marco de la teoría Kubelka-Munk se puede calcular, a partir de la reflectancia difusa de muestras cárnicas ópticamente gruesas (transmitancia despreciable), la función de Kubelka-Munk, $F(R_\lambda)$, a partir de la siguiente ecuación:

$$F(R_\lambda) = \frac{(1-R_\lambda)^2}{2R_\lambda} = \frac{K}{S} = \frac{\sum K_i C_i}{\sum S_i C_i} \quad (1)$$

donde R_λ es la reflectancia difusa de la muestra, K_i son los coeficientes de absorción de los pigmentos y la matriz, S es el coeficiente de dispersión y C_i es la concentración de cromóforos en la muestra. Esta función es proporcional a la concentración del cromóforo. Para independizar los valores de la función $F(R)$ de los cromóforos respecto a los correspondientes a la matriz, se sustrajo el valor de dicha función evaluada a $\lambda=750$ correspondiente a la matriz sin colorear.

En la **Figuras 4 a, b y c**, se muestran $F(R)$, en función de la longitud de onda para carne fresca y tratada con distintas concentraciones de sal, para la carne fresca y para las

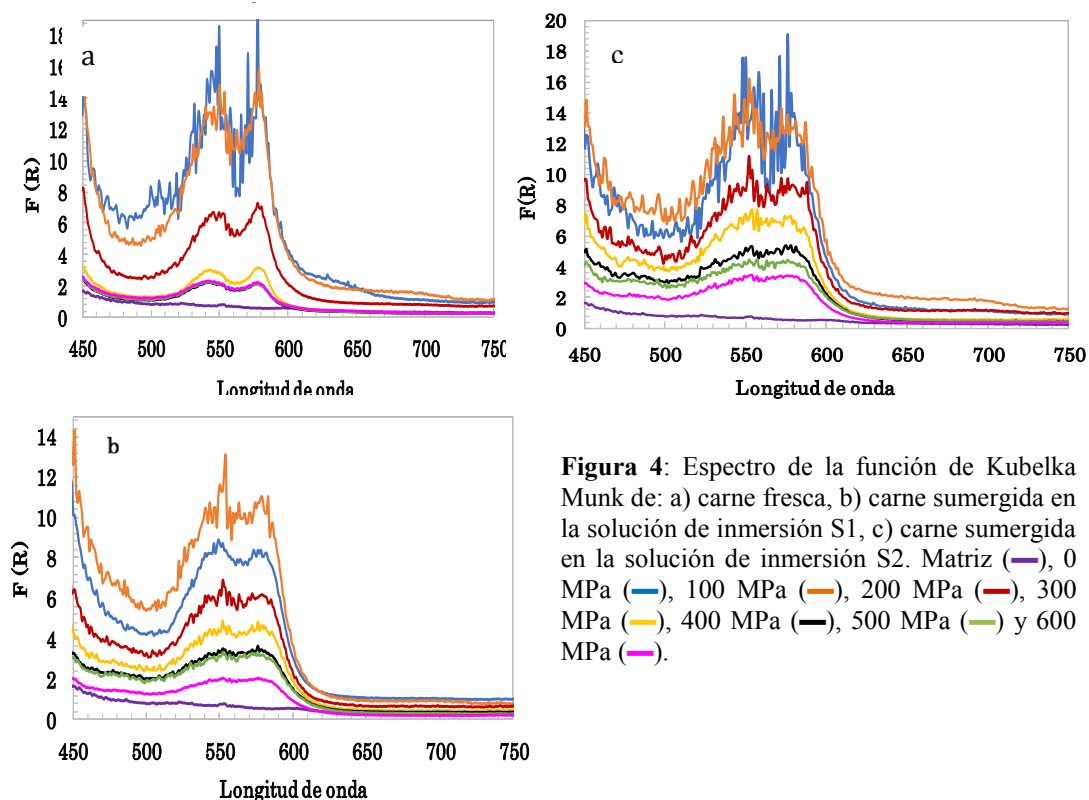


Figura 4: Espectro de la función de Kubelka Munk de: a) carne fresca, b) carne sumergida en la solución de inmersión S1, c) carne sumergida en la solución de inmersión S2. Matriz (—), 0 MPa (—), 100 MPa (—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—).

presiones (100 a 600 MPa). Puede notarse que a una presión fija a medida que aumentaba la concentración de cloruro de sodio y la cantidad de nitrito en el tejido, se incrementó el valor de $F(R)$, lo cual indica una mayor concentración del cromóforo fundamentalmente nitrosomioglobina. A mayor presión en el tratamiento (600 MPa) la

función $F(R)$ adopta valores más bajos que a 100 MPa lo cual indicaría una menor estabilidad del pigmento a mayores presiones hidrostáticas.

En el caso en que la nitrosomioglobina es el pigmento predominante, las concentraciones de mio, oxi y meta son despreciables. Dado que a 525 nm hay un punto isobéptico para todas las especies de Mb (Mb, MbO₂, MetMb y NitroMb), entonces todas estas especies presentan el mismo coeficiente de absorción a dicha longitud de onda, es decir:

$$F(R_{525}) - F_0(R_{525}) = \Delta F_{525} = \left[\frac{K_{Mb=MbO_2=MetMb=NitroMb}^{525nm}}{S_{525nm}} \right] \cdot C_{Total} \quad (2)$$

Presentando los datos como porcentaje de decoloración $(1 - \Delta F_{525} / \Delta F_{525_0}) \cdot 100$ y denominando como ΔF_{525_0} el valor correspondiente al 0% de decoloración se obtiene el siguiente gráfico (**Figura 5**), (Gimenez, 2019).

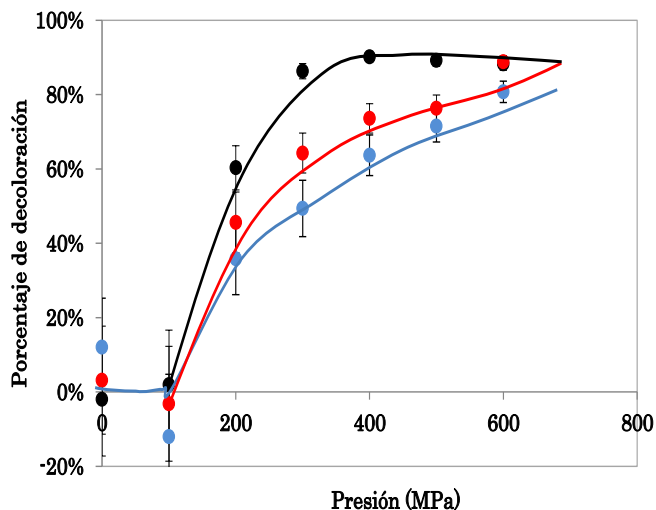


Figura 5: porcentaje de decoloración en función de la presión para las muestras de Carne fresca (●), carne sumergida en la solución S1 (●) y carne sumergida en la solución S2 (●).

Los resultados obtenidos se pueden corroborar al analizar el porcentaje de decoloración obtenido. En la carne fresca sometida a APH el cromóforo se va destruyendo y se llega a un valor de alrededor de 85% de decoloración mientras que las muestras que tuvieron un tratamiento químico previo exhiben un menor porcentaje de decoloración, esto se puede

relacionar con la formación de nitrosomioglobina la cual es más estable a las altas presiones.

4. Conclusiones

Se evidenció mediante DSC y FTIR que tanto las APH como la concentración de sal produjeron modificaciones en las proteínas de la carne, desnaturalizándolas lo cual modificó la proporción de las estructuras secundarias presentes (α -hélice, hoja β , giros β y estructuras desordenadas).



Los pigmentos de la carne (cromóforos mioglobina y sus derivados) fueron modificados por la aplicación de APH llevando a la generación de metomioglobina. Se comprobó que la utilización de una solución de inmersión permite la formación del pigmento nitrosomioglobina el cual no dependió de la concentración de NaCl y se corroboró que es más estable a las altas presiones hidrostáticas. Las muestras que tuvieron un tratamiento químico previo exhiben un menor porcentaje de decoloración.

5. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Proyecto Bilateral entre Argentina (MINCYT) y China: “Safety improvement and shelf life extension of fresh and cooked beef and mutton products applying non-thermal technologies” coordinado por el Dr. Sergio Vaudagna del INTA. Agradecemos al Dr. Sergio Vaudagna y al INTA de Castelar por permitirnos usar el equipo de APH.

6. Bibliografía

- Barbut, S.; Findlay, C. (1991). *Influence of sodium, potassium and magnesium chloride on thermal properties of beef muscle*. J. of Food Science, 56, 180-182.
- Bevilacqua E.; Zaritzky N. E. (1986). *Rate of pigment modifications in Packaged refrigerated beef using Reflectance spectrophotometry*. Journal of Food Processing and Preservation 10: 1-18
- Campus, M.; Flores M., Martinez A.; Toldran F. (2008). *Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin*. Meat Science. 80: 1174-1181
- Chapleau, N.; Mangavel, C.; Compoin, P.; De Lamballerie-Anton, M. (2004). *Effect of high-pressure processing on myofibrillar protein structure*. J. Sci. Food Agric., 84(1), 66–74.
- Francis F.J., Clydesdale F.M., Westport, Connecticut. (1975). *Food Colorimetry: Theory and Applications*. A VI Publishing Company.
- Giménez, B.; Graiver, N.; Califano, A.; Zaritzky, N. (2015). *Physicochemical characteristics and quality parameters of a beef product subjected to chemical preservatives and high hydrostatic pressure*. Meat Science, 100, 179–188.
- Gimenez B. (2019). *Efectos de la aplicación de tecnologías no térmicas (altas presiones hidrostáticas y ozono gaseoso) en las características fisicoquímicas, microbiológicas y parámetros de calidad de carnes bovinas*. Tesis de grado, Universidad Nacional de La Plata, CIDCA, La Plata, Argentina.
- Graiver, N.; Pinotti, A.; Califano, A.; Zaritzky, N. (2006). *Diffusion of sodium chloride in pork tissue*. J. of Food Engineering, 77, 910–918.
- Kortüm G. (1969). *Reflectance Spectroscopy*, Springer-Verlag, New York.
- Martínez M.A., Velazqueza G., Cando D., Núñez-Flores R., Borderías A.J. y Moreno H.M. (2017). *Effects of high-pressure processing on protein fractions of blue crab (Callinectes sapidus) meat*. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 41 (2017) 323–329
- McDougall, D. B. (1970). *Characteristics of the Appearance of Meat I. The luminous absorption scatter and internal transmittance of the lean of bacon manufactured from normal and pale pork*. J. Sci. Food Agric. 21, 568-571.
- Rubio, B.; Martínez, B.; García-Cachan, M.; Rovira, J. Jaime, I. (2007). *Effect of high pressure preservation on the quality of dry cured beef “Cecina de Leon”*. Innovation Food Science and Emerging Technologies, 8(7), 102-110.
- Sun, X. D. y Holley, R. A. (2010). *High hydrostatic pressure effects on the texture of meat and meat products*. Journal of Food Science, 75, 17–23.