

# Rancidez oxidativa en salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*). Interacción lípidos oxidados - proteínas



Biblioteca Central  
Facultad de Ciencias Exactas  
U.N.L.P.

**TESIS DOCTORAL**  
**Bqca. VALERIA A. TIRONI**

**Directora: Dra. María Cristina Añón**  
**Co-directora: Dra. Mabel C. Tomás**

TESIS  
No 1113



**Universidad Nacional de La Plata**  
**Facultad de Ciencias Exactas**

**Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología  
de Alimentos (CIDCA)**

DONACION.....  
A.....  
Fecha 27-12-06  
Inv. E..... Inv..... B. 55278



Biblioteca Central  
Facultad de Exactas  
U.N.L.P.

*A mi familia.*

*A todos los que día a día  
luchan para superarse.*

## **Muchas Gracias !!**

- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por permitirme la realización de este trabajo a través de la beca que me otorgó.
- A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata por ser la institución donde recibí mi formación de grado y postgrado
- A la Dra. María Cristina Añón por aceptar la dirección de esta tesis, por sus conocimientos y experiencia.
- A la Dra. Mabel Tomás por abrirme las puertas del CIDCA.
- Al Dr. Rodolfo Mascheroni por su buena onda y predisposición.
- A Jero por estar siempre presente, aunque esté lejos, y por las fotos.
- A Leo por estar siempre dispuesto a ayudar.
- A Paula C. por su ayuda en el Kjeldhal y por escucharme.
- A Claudio por su buena onda y las cosas ricas, a Emanuel, Vicky y Silvana por los momentos compartidos.
- A Pachi por su compañía y sus mates.
- A Cecilia, Laura, Galo, Silvana, Fernando y María Elena por los buenos momentos en la cátedra y fuera de ella.
- A mis amigos de toda la vida porque se que siempre puedo contar con ellos.
- A la Dra. Liliana Bruzzone por su colaboración en la espectrofluorometría, a Viviana Sorrivas por su colaboración en la microscopía electrónica, a Rosa Baeza y a la Dra. Ana Pilosof por su colaboración en los ensayos reológicos, a la Dra. Marta Aveldaño por su colaboración en los estudios de la fracción lipídica.
- A Tortuga por su ayuda en el manejo de los congeladores y a Julio Copes por su ayuda en lo referente a la manipulación del pescado.
- A Diana por su gran ayuda en las búsquedas bibliográficas.
- A los integrantes del CIDCA que de una u otra manera me ayudaron, tanto en lo técnico como en lo personal.

**y muy especialmente....**

- **A mis padres por todo lo que me dieron y me dan, por permitir mi formación.**
- **A Patricio por apoyarme y seguir apoyándome, aún en las circunstancias más difíciles.**
- **A Daniela y Mauricio por ayudarme y bancarme, y por Imanol.**
- **A Lucas por su gran ayuda, en todos los aspectos, porque de otra manera todo hubiera sido más difícil.**
- **A Daniela y Alejandra por ser mis amigas y estar en los peores momentos.**

**INDICE**

**Pág.**

<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
<b>I.I. EL PESCADO COMO ALIMENTO</b>	<b>2</b>
<b>I.I.1. Clasificación de las especies pesqueras</b>	<b>2</b>
<b>I.I.2. El músculo de los peces</b>	<b>4</b>
<b>I.I.2.1. Estructura muscular</b>	<b>4</b>
<b>I.I.2.2. Composición química del músculo</b>	<b>8</b>
<b>I.I.2.3. Proteínas musculares</b>	<b>10</b>
I.I.2.3.1. Fracción soluble en agua o proteínas sarcoplásmicas	11
I.I.2.3.2. Fracción insoluble o proteínas del estroma	11
I.I.2.3.3. Proteínas contráctiles o miofibrilares	12
I.I.2.3.4. La contracción muscular	17
I.I.2.3.5. Composición de aminoácidos de las proteínas musculares	18
<b>I.I.2.4. La fracción lipídica del músculo</b>	<b>18</b>
<b>I.I.2.5. Otros componentes musculares</b>	
I.I.2.5.1. Compuestos nitrogenados no proteicos	22
I.I.2.5.2. Vitaminas y minerales	24
<b>I.I.3. Cambios post-mortem en el músculo</b>	<b>24</b>
<b>I.I.4. Métodos de conservación del pescado</b>	<b>29</b>
<b>I.I.5. Funcionalidad de las proteínas musculares: Gelación térmica</b>	<b>30</b>
<b>I.I.6. La especie en estudio: Salmón de mar (<i>Pseudoperca semifasciata</i>)</b>	<b>35</b>
<b>I.I.6.1. Características biológicas</b>	<b>35</b>
<b>I.I.6.2. Importancia comercial</b>	<b>36</b>
<b>I.II. OXIDACIÓN LIPÍDICA</b>	<b>37</b>
<b>I.II.1. Autooxidación lipídica</b>	<b>37</b>
<b>I.II.1.1. Mecanismo de autooxidación</b>	<b>37</b>
<b>I.II.1.2. Factores que afectan la velocidad de autooxidación lipídica</b>	<b>43</b>
<b>I.II.1.3. Métodos de determinación de la oxidación lipídica</b>	<b>45</b>
<b>I.II.2. Importancia de la oxidación lipídica en pescado</b>	<b>48</b>
<b>I.II.3. Interacción de los productos de oxidación lipídica con proteínas</b>	<b>49</b>
<b>1.3.1. Mecanismos de Interacción lípidos oxidados - proteínas</b>	<b>49</b>
<b>I.II.4. Antioxidantes naturales</b>	<b>54</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>60</b>
<b>III. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	
<b>CAPÍTULO 1. SISTEMAS MODELO</b>	
<b>1.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>64</b>

<b>1.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>1.2.1. Material utilizado</b>	67
<b>1.2.2. Preparación de los sistemas modelo</b>	
1.2.2.1. Aislamiento de proteínas miofibrilares de salmón de mar	67
1.2.2.2. Obtención de malonaldehído (MDA)	68
1.2.2.3. Incubación de las proteínas miofibrilares con MDA	69
<b>1.2.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</b>	70
<b>1.2.4. Electroforesis</b>	72
1.2.4.1. SDS-PAGE en gradiente	73
1.2.4.2. Electroforesis bidimensional	74
1.2.4.3. Análisis de los geles	74
<b>1.2.5. Solubilidad proteica</b>	
1.2.5.1. Solubilidad en KCl 0,6M	75
1.2.5.2. Solubilidad en distintos medios	75
1.2.5.3. Electroforesis de las fracciones solubles	76
<b>1.2.6. Determinación de lisina disponible</b>	77
<b>1.2.7. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</b>	79
<b>1.2.8. Formación de estructuras tipo gel por efecto del MDA sin tratamiento térmico</b>	79
<b>1.2.9. Análisis de parámetros reológicos durante el proceso de gelación térmica</b>	80
<b>1.2.10. Propiedades de los geles obtenidos por tratamiento térmico</b>	81
1.2.10.1. Análisis de textura	81
1.2.10.2. Capacidad de retención de agua (WHC)	82
1.2.10.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	83
1.2.10.4. Solubilidad de los geles en distintos medios	83
1.2.10.5. Electroforesis de los líquidos exudados	84
<b>1.2.11. Análisis estadístico</b>	84
<b>1.3. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
<b>A. ASPECTOS ESTRUCTURALES</b>	
<b>1.3.1. Desnaturalización térmica de las proteínas miofibrilares de salmón de mar</b>	85
<b>1.3.2. Electroforesis</b>	
1.3.2.1. SDS-PAGE de los sedimentos	91
1.3.2.2. SDS-PAGE bidimensional	93
<b>1.3.3. Solubilidad proteica</b>	
1.3.3.1. Solubilidad en buffer con KCl 0,6 M	95
1.3.3.2. SDS-PAGE de las fracciones solubles en buffer con KCl 0,6 M	97
1.3.3.3. Solubilidad en diferentes medios	99
1.3.3.4. SDS-PAGE de las fracciones solubles en diferentes medios	101
<b>1.3.4. Lisina disponible</b>	103
<b>1.3.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</b>	105
<b>B. ASPECTOS FUNCIONALES: GELACIÓN TÉRMICA</b>	108
<b>1.3.6. Formación de estructuras tipo gel por efecto del MDA sin tratamiento térmico</b>	109

1.3.6.1. Efecto de la concentración de MDA: observación macroscópica	109
3.2.6.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las estructuras tipo gel	110
<b>1.3.7. Seguimiento del proceso de gelación térmica mediante ensayos de viscoelasticidad lineal</b>	<b>112</b>
<b>1.3.8. Caracterización de los geles obtenidos por tratamiento térmico</b>	
1.3.8.1. Textura de los geles	118
1.3.8.2. Capacidad de retención de agua de los geles (WHC)	122
1.3.8.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	123
1.3.8.4. Electroforesis de los líquidos exudados	125
1.3.8.5. Solubilidad de los geles en distintos medios	126
<b>1.4. CONCLUSIONES</b>	
<b>CAPÍTULO 2. ALMACENAMIENTO REFRIGERADO</b>	
<b>2.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>133</b>
<b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.2.1. Material utilizado	136
2.2.2. Procesamiento y almacenamiento del pescado	136
2.2.3. Aplicación del antioxidante	137
2.2.4. Composición proximal del músculo de salmón de mar	138
2.2.5. Composición de la fracción lipídica	138
2.2.6. Ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)	139
2.2.7. Determinación de compuestos fluorescentes	140
2.2.8. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	141
2.2.9. Proteína total extraíble y proteínas miofibrilares solubles	141
2.2.10. Lisina disponible	142
2.2.11. Textura del músculo	144
2.2.12. Gelación térmica	144
2.2.13. Determinación del pH del músculo	145
2.2.14. Determinaciones de nitrógeno básico volátil total (NBV-t) y trimetil amina (TMA)	145
2.2.15. Recuento de microorganismos aerobios totales	145
2.2.16. Determinación de parámetros de color	145
2.2.17. Análisis estadístico	146
<b>2.3. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
<b>A. MODIFICACIONES DURANTE EL ALMACENAMIENTO REFRIGERADO DEL MÚSCULO DE SALMÓN DE MAR</b>	
2.3.1. Composición proximal del músculo de salmón de mar	147
2.3.2. Seguimiento de la oxidación lipídica: Número de TBA	148
2.3.3. Modificaciones en la composición de la fracción lipídica	151
2.3.4. Determinación de compuestos de interacción de carácter fluorescente	159

2.3.4.1. Determinación de los máximos de excitación y emisión de fluorescencia	158
2.3.4.2. Seguimiento de los compuestos de interacción durante el almacenamiento refrigerado.	159
<b>2.3.5. Modificaciones de la fracción proteica</b>	
2.3.5.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	167
2.3.5.2. Solubilidad de proteínas	172
2.3.5.3. Electroforesis	177
2.3.5.4. Lisina disponible	179
<b>2.3.6. Modificaciones en el color del músculo</b>	180
<b>2.3.7. Modificaciones de parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad del pescado</b>	
2.3.7.1. pH	185
2.3.7.2. Nitrógeno básico volátil (NBV-t) y trimetilamina (TMA)	186
<b>2.3.8. Crecimiento microbiano durante el almacenamiento refrigerado</b>	189
<b>2.3.9. Otras determinaciones relacionadas con la funcionalidad del músculo</b>	190
2.3.9.1. Textura del músculo	191
2.3.9.2. Gelación térmica	192
<b>B. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE UN ANTIOXIDANTE DE ORIGEN NATURAL (EXTRACTO DE ROMERO) AL MÚSCULO REFRIGERADO</b>	
<b>2.3.10. Efecto del extracto de romero sobre la oxidación lipídica</b>	
2.3.10.1. Número de TBA	195
2.3.10.2. Composición de la fracción lipídica	196
<b>2.3.11. Compuestos fluorescentes</b>	200
<b>2.3.12. Efecto del extracto de romero sobre las modificaciones proteicas</b>	207
<b>2.3.13. Efecto del extracto de romero sobre los cambios de color</b>	211
<b>2.4. CONCLUSIONES</b>	215
<b>CAPÍTULO 3 ALMACENAMIENTO CONGELADO</b>	
<b>3.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	220
<b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.2.1. Material utilizado	222
3.2.2. Procesamiento y almacenamiento del pescado	222
3.2.2.1. Congelación de las muestras	222
3.2.2.2. Almacenamiento congelado de las muestras	223
3.2.2.3. Descongelación de las muestras	223
3.2.3. Aplicación del antioxidante	224
3.2.4. Composición proximal del músculo	224
3.2.5. Composición de la fracción lipídica	224
3.2.6. Ensayo de TBA	224
3.2.7. Determinación de compuestos fluorescentes	224
3.2.8. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	224



<b>3.2.9. Proteína total extraíble y proteínas miofibrilares solubles</b>	224
<b>3.2.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)</b>	224
<b>3.2.11. Lisina disponible</b>	224
<b>3.2.12. Determinación de parámetros de color</b>	225
<b>3.2.13. Microscopía electrónica de barrido (SEM)</b>	225
<b>3.2.14. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</b>	225
<b>3.2.15. Análisis estadístico</b>	225
<b>3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
<b>A. MODIFICACIONES DURANTE EL ALMACENAMIENTO CONGELADO DEL MÚSCULO DE SALMÓN DE MAR</b>	
<b>3.3.1. Seguimiento de la oxidación lipídica. Número de TBA</b>	226
<b>3.3.2. Modificaciones en la fracción lipídica</b>	228
<b>3.3.3. Compuestos fluorescentes</b>	231
<b>3.3.4. Modificaciones de la fracción proteica</b>	
3.3.4.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	234
3.3.4.2. Proteína extraíble total y proteínas miofibrilares solubles	238
3.3.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	244
3.3.4.4. Lisina disponible	246
3.3.4.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	248
3.3.4.6. Textura del músculo	250
3.3.4.7. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	251
3.3.4.8. Funcionalidad proteica. Gelación térmica	253
<b>3.3.5. Color</b>	256
<b>3.3.6. Otros parámetros relacionados con el deterloro</b>	260
<b>B. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE EXTRACTO DE ROMERO AL MÚSCULO ALMACENADO CONGELADO</b>	
<b>3.3.7. Efecto del extracto de romero sobre la oxidación lipídica</b>	
3.3.7.1. Número de TBA	262
3.3.7.2. Composición de la fracción lipídica	264
<b>3.3.8. Compuestos fluorescentes</b>	266
<b>3.3.9. Efecto del extracto de romero en las modificaciones proteicas</b>	271
<b>3.3.10. Efecto del extracto de romero sobre los cambios de color</b>	274
<b>3.4. CONCLUSIONES</b>	278
<b>IV. CONCLUSIONES GENERALES</b>	283
<b>V. BIBLIOGRAFÍA</b>	288

# I. Introducción General



## I. INTRODUCCION GENERAL

### I.I. EL PESCADO COMO ALIMENTO

La carne de pescado es una importante fuente de proteínas animales, siendo fundamental en la dieta de distintas culturas. Diversas características de estos productos los hacen beneficiosos desde el punto de vista nutritivo y de la salud del consumidor. Así, datos epidemiológicos indican una mayor longevidad en los países donde su consumo es muy frecuente (Ackman, 1988). Entre sus ventajas pueden mencionarse: bajo nivel de grasas con una baja proporción de ácidos grasos saturados y abundancia de ácidos grasos omega 3 e importante fuente de minerales y vitaminas.

Las capturas mundiales de pescado se han duplicado a partir de la década del 60 desde 40 millones de toneladas hasta estabilizarse justo por debajo de los 100 millones después de 1988 (Huss, 1998).

Nuestro país mantiene un consumo bajo de pescado, aunque éste se ha incrementado debido a modificaciones en los hábitos de consumo, alcanzando los 9 kg/habitante/año en 1997, con significativas diferencias entre las distintas regiones. En función de ello, en Argentina el mercado interno del pescado corresponde a menos del 15 % de las capturas (Consejo Federal de Inversiones CFI). Las exportaciones de pescado constituyen una fuente importante de divisas, superando en ciertos años las correspondientes a la exportación de carne.

#### I.I.1. Clasificación de las especies pesqueras

Dada la enorme variedad de animales acuáticos disponibles para la alimentación humana, existe una gran dificultad para la identificación correcta de las especies. El uso de nombres locales o comunes crea generalmente confusión, haciéndose imprescindible rotular exactamente las especies, principalmente las de comercialización internacional.

Por otra parte, la clasificación de las especies es importante desde el punto de vista práctico, ya que los distintos grupos se deterioran en formas diferentes y varían en cuanto a su composición química.

Desde el punto de vista industrial, existen fundamentalmente dos grupos de peces importantes: los Condrictios o peces cartilagosos y los Teleósteos o peces óseos. Las diferencias entre estas dos grandes clases no se limitan a las características del esqueleto, sino que también existen grandes diferencias en la estructura de las agallas, la morfología de los órganos sexuales, el mecanismo de flotación, la estructura de la piel y otras (Contreras Guzmán, 2002). Estas características influyen en el comportamiento bioquímico post-mortem y en su utilización tecnológica. En la **Tabla 1.1.** se presentan las características generales de estos dos grandes grupos y algunos ejemplos (Huss, 1998).

**Tabla 1.1.** Clasificación de los peces

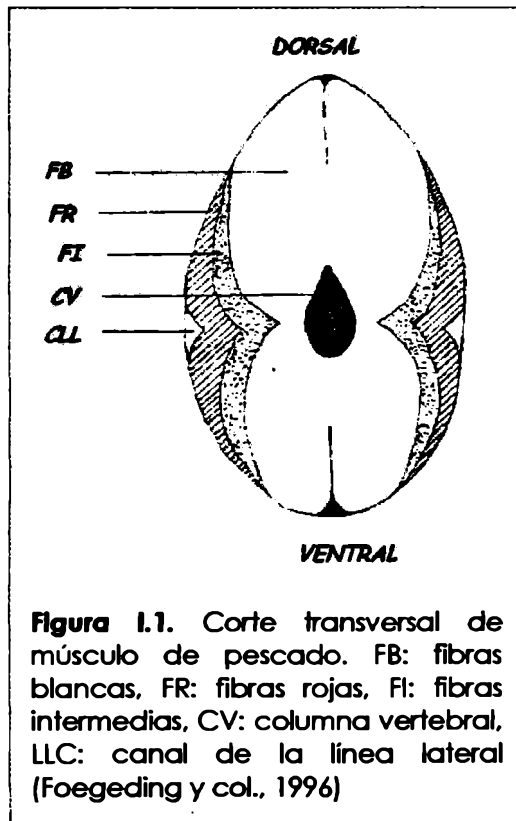
Clase	Caract. biológicas	Caract. tecnológicas	Ejemplos
Condrictios	peces cartilagosos	alto contenido de urea en el músculo	tiburones y rayas
Teleósteos o peces óseos	peces pelágicos	pescado graso (lípidos almacenados en el tejido muscular)	arenque, caballa, sardina, atún, anchoa
	peces demersales	Pescado (blanco) magro, almacena lípidos solo en el hígado	bacalao, merluza, mero, <u>salmón de mar</u>

Las especies pelágicas son aquellas cuyo cuerpo está adaptado para desarrollar grandes velocidades para la búsqueda de alimentos o durante la migración para desovar; son predadores y viven en la superficie. Por otra parte, los peces demersales son los de aguas profundas, poco veloces y que generalmente no tienen hábitos migratorios (Contreras Guzmán, 2002).

Los peces pelágicos son de gran importancia en la industria de alimentos marinos ya que, por formar cardúmenes pueden ser capturados masivamente. Constituyen la materia prima básica de las conservas enlatadas y harinas de pescado.

## I.1.2. El músculo de los peces

Un corte transversal del cuerpo del pescado -obtenido luego de la separación de la cabeza, las vísceras y la piel- muestra una carne generalmente clara organizada en cuatro bloques bien definidos (Contreras Guzmán, 2002). Los



músculos de los peces se organizan longitudinalmente a lo largo de la columna vertebral. Los dos cuadrantes superiores constituyen las masas musculares dorsales y los inferiores las masas musculares ventrales (Figura I.1.).

El músculo de los peces puede ser dividido en músculo claro y músculo rojo u oscuro, los cuales presentan diferentes características fisiológicas y bioquímicas. La masa muscular oscura corre lateralmente desde la cabeza hasta la cola, encima del músculo claro o penetrando en él. En los peces sedentarios, el músculo oscuro es solo una capa fina que puede verse al retirar la piel, constituyendo alrededor de un 5 % del

peso del filete. En los peces migratorios, puede llegar a ser hasta un 48 % del filete (Love, 1970), penetrando hacia la columna en diversas formas dependiendo de la especie.

Dentro de las diferentes características de los dos tipos de músculos, se destacan el mayor contenido de lípidos y de mioglobina en el músculo rojo.

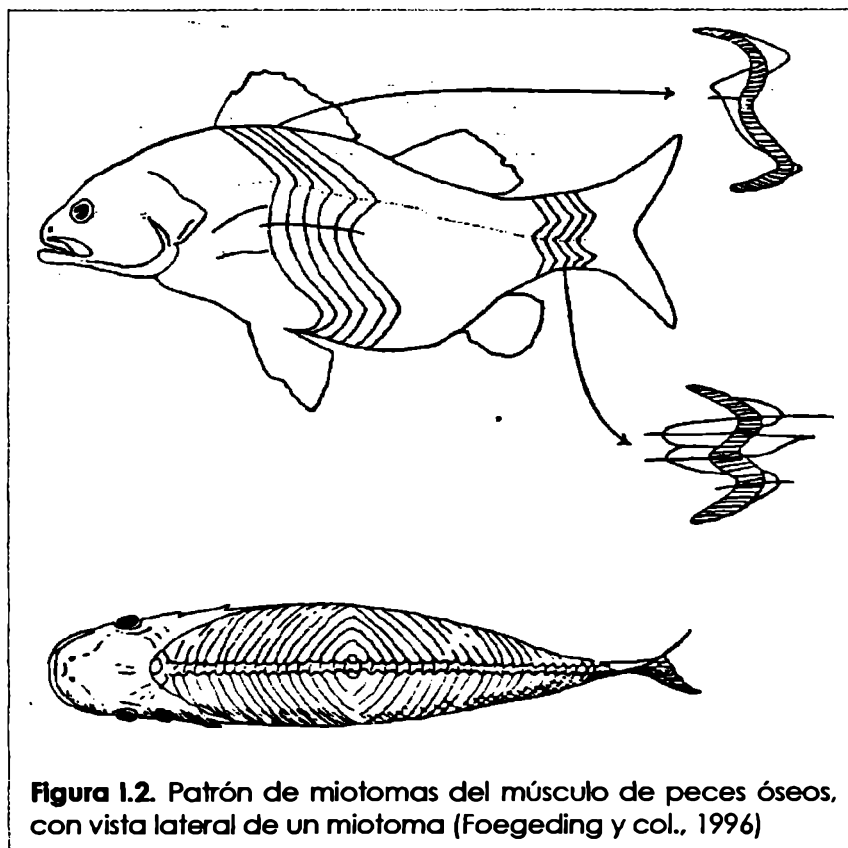
### I.1.2.1. Estructura muscular

La anatomía del músculo del pez difiere de la anatomía de los animales terrestres y los pájaros, estando las diferencias dadas fundamentalmente por tres factores básicos. El primero está relacionado con el hecho de que el cuerpo del

pez es sostenido por el agua, por lo cual no requiere un tejido conectivo fuerte y extenso para soportar y mantener los músculos. Por otra parte, dado que la mayoría de las especies comercialmente importantes son poiquilotermas y viven en ambientes fríos, las proteínas musculares tienen propiedades diferentes con respecto a las de los animales de sangre caliente. En tercer lugar, debido a los particulares movimientos que debe realizar el cuerpo del pez, el arreglo estructural del músculo es marcadamente diferente con respecto al músculo de los animales terrestres y los pájaros (Foegeding y col., 1996).

El músculo esquelético está constituido por células multinucleadas, largas y angostas denominadas fibras. Su longitud se encuentra en el orden de los centímetros mientras que su diámetro oscila entre 10 y 100  $\mu\text{m}$ . A nivel celular, existe mucha similitud entre los músculos de una amplia variedad de especies.

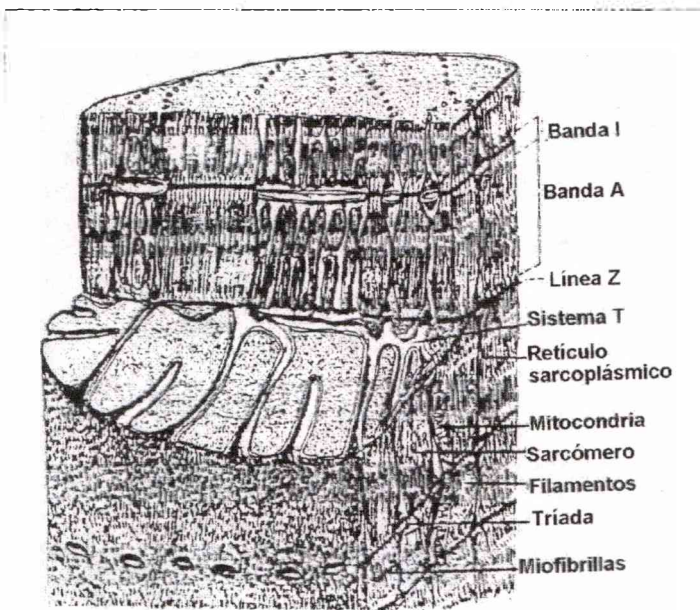
El arreglo de las fibras musculares en un pez óseo típico se muestra en la **Figura 1.2**. Las células musculares corren en paralelo, separadas perpendicularmente por capas delgadas de tejido conectivo llamado miosepta (myocommata). Los segmentos musculares situados entre estos tabiques de tejido



**Figura 1.2.** Patrón de miotomas del músculo de peces óseos, con vista lateral de un miotoma (Foegeding y col., 1996)

conectivo se denominan miotomas (Huss, 1998). Los miotomas tienen forma de W y van desde la superficie hasta la columna vertebral ensamblándose de manera típica. Debido a la inclinación que presentan los miotomas, se produce una superposición de los mismos formando conos embutidos muy visibles en un corte transversal en el cual se ven como anillos concéntricos (Contreras Guzmán, 2002). Los myocommatas corren en forma oblicua, formando un patrón de surcos perpendiculares al eje longitudinal del pez. En la superficie de los músculos, los mioseptos se fusionan con el perimio - membrana de fibras entrecruzadas que recubre el músculo-, y en el interior se amarran a la columna vertebral. Esto permite dar flexibilidad al músculo en los movimientos que propulsan al pez a través del agua.

La fibra o célula muscular se encuentra recubierta externamente por una membrana, el endomio, que es una prolongación del miosepto. Por debajo del endomio se encuentra la membrana celular o sarcolema, la cual regula la entrada y salida de metabolitos y está relacionada con la contracción muscular.



**Figura 1.3.** Corte de una fibra muscular mostrando su membrana externa, sus invaginaciones (sistema T) y la unión al retículo sarcoplásmico en la tríada (Foegeding y col., 1996)

El sarcolema está formado por al menos cuatro capas, de las cuales, la más interna, es la membrana plasmática. Las invaginaciones del sarcolema forman el sistema de túbulos T, cuyos extremos se unen en el interior de la célula con el retículo sarcoplásmico -sistema membranoso generalmente paralelo al eje principal de la célula- (Figura 1.3.). La unión del sistema T y el retículo sarcoplásmico (tríada) ocurre cerca de los discos Z en los

peces. La extensión del sarcolema dentro de la célula por medio de los túbulos T hace que la célula muscular responda como una unidad. La despolarización de

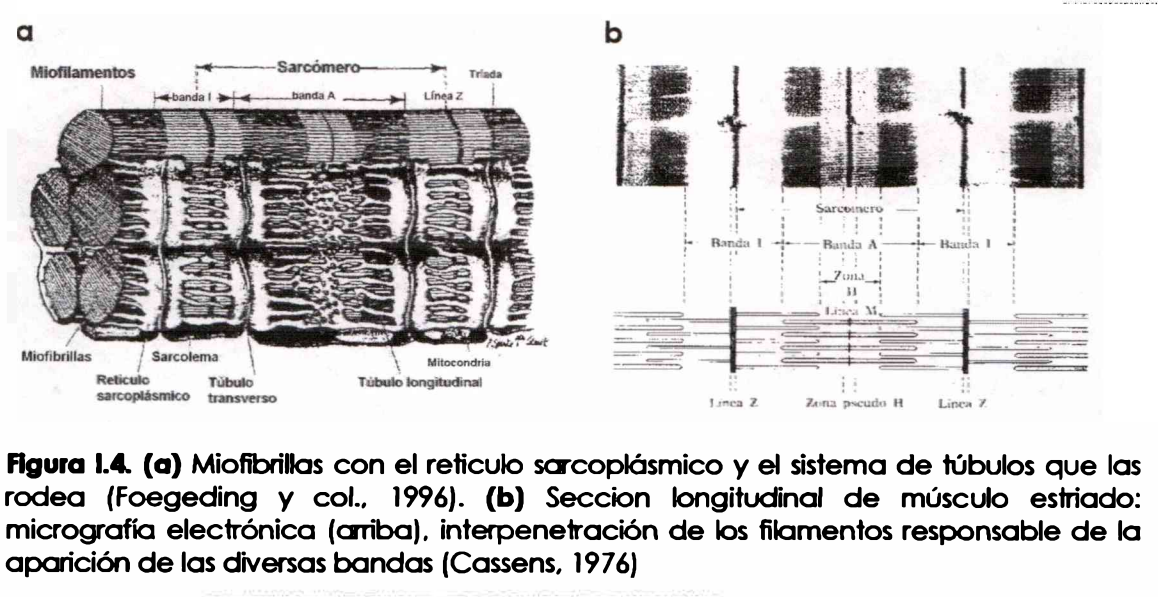
estas estructuras produce una liberación de calcio de las vesículas del retículo sarcoplásmico desencadenando el proceso de contracción muscular.

El espacio interior de la célula muscular está ocupado por el sarcoplasma, líquido viscoso en el cual se encuentran los núcleos (periféricos) y el resto de las organelas (corpúsculos de Golgi, mitocondrias, lisosomas), gránulos de almidón, gotas de grasa, numerosas proteínas -entre ellas las enzimas y la mioglobina-, muchos compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (ATP, creatina, óxido de trimetilamina, aminoácidos) e iones inorgánicos.

En el centro de la fibra muscular se encuentran los miofilamentos o miofibrillas, los cuales constituyen el aparato contráctil del músculo. Las miofibrillas se encuentran rodeadas por el sarcoplasma, los túbulos T y el retículo sarcoplásmico (**Figura 1.4.a.**). La disposición repetitiva específica de las proteínas en las miofibrillas es responsable de la apariencia estriada (bandas claras y oscuras) típica de los músculos al microscopio (**Figura 1.4.b.**). Las bandas oscuras son anisotrópicas o birrefringentes al ser vistas bajo luz polarizada; por ser anisotrópicas se denominan bandas "A". Las bandas claras son isotrópicas denominándose bandas "I". En el centro de las bandas "I" hay una línea oscura, la línea Z o disco Z; mientras que en el centro de las bandas "A" se encuentra una zona clara llamada zona "H". En el centro de esta última aparece la línea "M" más oscura.

Los miofilamentos se encuentran organizados longitudinalmente al eje de la fibra, formando segmentos llamados sarcómeros que están separados entre sí por tabiques divisorios (líneas Z) (**Figura 1.4.**). La longitud promedio de un sarcómero es de 2 a 2,5  $\mu\text{m}$  (Sanclivier, 1982). Un sarcómero está compuesto por filamentos gruesos y filamentos finos. Los filamentos finos aparecen hacia fuera de los discos Z en ambas direcciones, constituyendo la banda "I". Dichos filamentos se superponen con los filamentos gruesos en una zona de la banda "A". La zona "H" es la zona de la banda "A" donde los filamentos finos no se solapan con filamentos gruesos. Los filamentos gruesos se disponen hexagonalmente, en las zonas de interpenetración de ambos tipos de filamentos, cada filamento grueso se halla rodeado por seis filamentos delgados, mientras que cada filamento delgado es compartido por tres filamentos gruesos (Cassens, 1976).





### 1.1.2.2. Composición química del músculo

La composición química del músculo de los peces varía ampliamente entre las diferentes especies, así como también dentro de la misma especie. En la **Tabla 1.2.** se presentan los rangos correspondientes a los principales constituyentes del músculo de pescado con sus variaciones en las distintas especies, en comparación con la carne vacuna (Huss, 1998).

**Tabla 1.2.** Principales constituyentes del músculo de pescado y de vacuno

Constituyente (g/100 g de músculo)	pescado (filete)	vacuno (músc. aislado)
Proteínas	16 - 21	20
Lípidos	0,2 - 25	3
Carbohidratos	< 0,5	1
Cenizas	1,2 - 1,5	1
Agua	66 - 81	75

La composición proximal de la carne de pescado sufre frecuentes fluctuaciones dado que los diferentes estados fisiológicos del animal se reflejan en el tenor de grasa, agua y en algunos casos de proteínas (Contreras Guzmán,

2002). Entre los principales factores que afectan la composición del músculo, pueden mencionarse:

- **Edad de los peces (alevín, juvenil, adulto):** los peces jóvenes generalmente tienen más agua y menos lípidos que los adultos, dado que al encontrarse en desarrollo disminuyen las reservas de grasa.
- **Estación del año y fase de la migración:** la influencia de la estación del año es muy marcada en los peces pelágicos, los cuales aumentan o disminuyen su porcentaje de grasa en función de la disponibilidad de alimento. En general, se observa una acumulación de grasa desde el final de la primavera y durante el verano y el otoño, así como un mínimo al inicio de la primavera. El contenido de agua se comporta de manera opuesta. El conocimiento de la variación estacional tiene gran importancia tecnológica pues afecta el rendimiento, sabor y firmeza de la carne y por otra parte, la estabilidad frente a la oxidación lipídica varía por el aumento estacional de los ácidos grasos poliinsaturados o por la variación de los antioxidantes naturales (tocoferoles, flavonoides) sintetizados en el plancton.
- **Sexo y desarrollo de las gónadas:** Durante el desove, hay un consumo notable del contenido graso del cuerpo con un aumento proporcional de agua. Las proteínas musculares normalmente son preservadas. No obstante, se ha observado en merluza la degradación de la miosina en pre-desove, debida al stress metabólico y alimenticio (Roura y col., 1992). Las alteraciones extremas pueden dañar la textura de la carne y si el agotamiento de las reservas es muy grande puede ser fatal, particularmente si coincide con la migración.
- **Zona del cuerpo analizada (lomo, cola, vientre):** El porcentaje de grasa es mayor en la zona ventral y menor en la caudal, mientras que el contenido de agua registra un comportamiento inverso. Las proteínas presentan mayor porcentaje en la zona dorsal. Estas diferencias son particularmente evidentes en los peces grasos y menos perceptibles en los semigrasos, desapareciendo prácticamente en las especies magras.
- **Clase de músculo (claro, oscuro):** el contenido de lípidos es marcadamente más alto en los músculos oscuros mientras que el del resto de los componentes suele ser mayor en los músculos claros.

Anteriormente se han mencionado especies grasas, semigrasas y magras. Esta división se realiza en base al porcentaje de lípidos, siendo importante su consideración ya que la misma influye notoriamente en el tipo de producto, vida útil, aceptabilidad y tecnología de los productos obtenidos a partir de ellas (Contreras Guzmán, 2002). Así, Jacquot (1961) propuso la siguiente clasificación:

- Peces magros: menos de 2,5 % de grasa
- Peces semigrasos: entre 2,5 y 9,5 % de grasa
- Peces grasos: más de 9,5 % de grasa

Otra manera posible de distinguir entre especies magras y grasas es denominar como especies magras aquellas que almacenan lípidos sólo en el hígado y como especies grasas las que almacenan lípidos en células distribuidas en otros tejidos del cuerpo (Huss, 1998).

Stansby (1962) propuso incluir en la clasificación el contenido de proteínas, dando lugar a las siguientes categorías:

- Categoría A: muy altos en proteínas (más de 20 % p/p) e intermedios en grasas (entre 5 y 15 % p/p).
- Categoría B: Intermedios en proteínas (entre 15 y 20 % p/p) e intermedios en grasa (entre 5 y 15 % p/p).
- Categoría C: muy altos en grasas (más de 15 % p/p) y bajos en proteínas (menos de 15 % p/p). Dentro de este grupo se encontrarían las especies pelágicas.
- Categoría D: muy altos en proteínas (más de 20 % p/p) y bajos en grasas (menos de 5 % p/p).
- Categoría E: bajos en proteínas (menos del 15 % p/p) y bajos en grasas (menos del 5% p/p).
- Categoría F: Intermedios en proteínas (entre 15 y 20 % p/p) y bajos en grasas (menos del 5 % p/p).

### **1.1.2.3. Proteínas musculares**

Las proteínas del músculo pueden ser clasificadas de acuerdo con su función biológica o sus propiedades químicas. En el primer caso, pueden dividirse

en proteínas relacionadas con el metabolismo energético, con la contracción y estructurales (Foegeding y col., 1996). Según sus propiedades químicas, pueden clasificarse de acuerdo a su solubilidad en medios acuosos en tres tipos: proteínas solubles en agua, proteínas solubles en soluciones salinas y proteínas insolubles en las condiciones antes mencionadas (Hultin, 1976).

#### **1.1.2.3.1. Fracción soluble en agua o proteínas sarcoplásmicas.**

Son aquellas proteínas que pueden ser extraídas del músculo con agua o soluciones salinas diluidas. Se trata de proteínas de estructura globular y pesos moleculares relativamente bajos (20 - 60 kD).

Esta fracción está constituida fundamentalmente por enzimas, principalmente las de la vía glicolítica, creatin-quinasa y AMP-deaminasa así como también por el pigmento mioglobina. En los peces marinos constituyen entre el 20 y el 30 % de las proteínas (Contreras Guzmán, 2002).

Su composición polipeptídica es bastante constante dentro de una misma especie, variando poco con el sexo, la edad, estación y condiciones fisiológicas, lo cual las hace apropiadas como criterio de identidad biológica (Cowie, 1968).

#### **1.1.2.3.2. Fracción insoluble o proteínas del estroma**

Es el residuo insoluble que queda después del tratamiento con soluciones salinas de alta fuerza iónica. Está constituida fundamentalmente por proteínas del tejido conectivo (colágeno, elastina); sin embargo, también puede incluir algunas proteínas contráctiles no extraídas, tales como la titina y la desmina.

La composición del tejido conectivo depende de la zona de extracción (piel, músculo, esqueleto) (Montero y Borderías, 1990). En el músculo, el tejido conectivo está constituido por las membranas que envuelven externamente cada haz de fibras (fasciae), por los tabiques que separan segmentos (mioseptos) y por membranas intra-miotomas.

La principal proteína constituyente del tejido conectivo es el colágeno. Esta es una glicoproteína con residuos de azúcares (glucosa, galactosa) unidos a

hidroxilisina. El colágeno existe bajo diferentes formas polimórficas, formadas por tres cadenas polipeptídicas helicoidales (diferentes de la típica  $\alpha$ -hélice debido a su alto contenido de hidroxiprolina) conformando una superhélice. Las moléculas de colágeno se unen a través de sus extremos para formar las fibras de colágeno.

En general, el contenido de colágeno del músculo de los peces es inferior al de los mamíferos (Foegeding y col., 1996). Diferentes especies pesqueras contienen diversas cantidades de colágeno, probablemente la distribución de esta proteína esté relacionada con el comportamiento natatorio de las especies (Huss, 1998). Además, las diversas cantidades y diferentes tipos de colágeno en los peces pueden tener influencia en las propiedades texturales del músculo (Montero y Borderías, 1989).

En general, las fibras de colágeno forman una compleja estructura de redes, similar a la presente en los mamíferos. Sin embargo, el colágeno de los peces es mucho más sensible al calor, conteniendo menos entrecruzamientos y más termolábiles que el colágeno de animales de sangre caliente. El contenido de hidroxiprolina es en general menor en peces que en mamíferos (Contreras Guzmán, 2002).

Otras proteínas estromáticas son la reticulina y la elastina. La primera constituye el retículo sarcoplásmico, mientras que la elastina es una proteína fibrosa y elástica característica de los tejidos sometidos a tensiones constantes pero que deben recuperarse rápidamente.

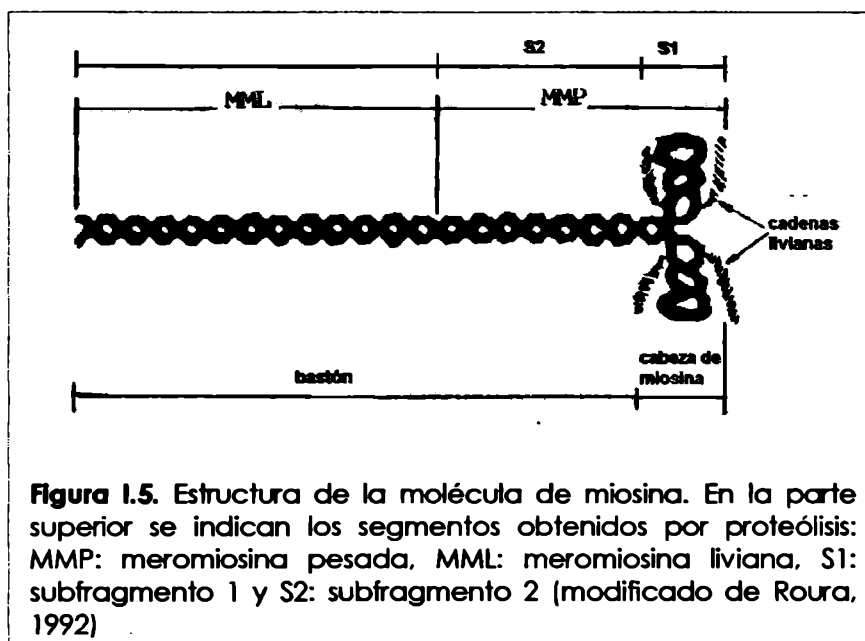
#### **1.1.2.3.3. Proteínas contráctiles o miofibrilares**

Son solubles en soluciones salinas de alta fuerza iónica (NaCl o KCl 0,6 M, pH = 7,0 - 7,2). A continuación se enumeran las principales características de las proteínas miofibrilares más importantes:

##### ***Miosina***

Es la proteína constituyente de los filamentos gruesos. Representa entre el 50 y el 60 % de las proteínas miofibrilares. Es una molécula muy grande (alrededor de 160 nm de longitud), con un peso molecular cercano a los 500 kD. Contiene un

total de seis cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas y cuatro cadenas livianas, ensambladas en una estructura cuaternaria formando una cola con dos cabezas globulares (**Figura I.5.**). La región recta de la cola (bastón) consta de dos cadenas pesadas con estructura de  $\alpha$ -hélice, superenrolladas en una estructura de  $\alpha$  - hélice doble que termina en la región de las cabezas. La región de la cola es responsable de la asociación de la miosina en los filamentos gruesos.



**Figura I.5.** Estructura de la molécula de miosina. En la parte superior se indican los segmentos obtenidos por proteólisis: MMP: meromiosina pesada, MML: meromiosina liviana, S1: subfragmento 1 y S2: subfragmento 2 (modificado de Roura, 1992)

El principal tipo de estructura presente en las cabezas de miosina es la  $\alpha$  - hélice. Asociadas con cada cabeza se encuentran dos cadenas livianas. Existen dos tipos de cadenas livianas: las cadenas livianas DTNB (18 - 19 kD), llamadas así porque pueden ser removidas de la miosina por tratamiento con DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), o también llamadas cadenas livianas regulatorias por ser responsables de la regulación mediada por calcio de la contracción del músculo de los moluscos y de la regulación mediada por fosforilación en el músculo liso. El otro tipo de cadenas livianas son las alcalinas (16 - 22 kD) dado que son liberadas en condiciones alcalinas, también llamadas cadenas livianas esenciales porque antiguamente eran consideradas esenciales para la actividad ATPasa. Cuando la miosina es tratada con agentes disociantes, la  $\alpha$  - hélice doble se desarma, liberando dos polipéptidos formados por la región que conforma el

bastón y la cabeza (200 kD) y las cadenas livianas se separan de las cabezas (Foegeding y col., 1996).

A fin de facilitar los estudios realizados sobre la molécula de miosina, ésta puede ser tratada con enzimas proteolíticas tal como la tripsina, para dar dos segmentos: la meromiosina liviana y la meromiosina pesada que contiene las cabezas globulares (**Figura 1.5**). La sección de la cabeza de la meromiosina pesada se designa subfragmento 1 o S1 y está unida a la región recta (subfragmento 2 o S2) a través de uniones flexibles. La región de la meromiosina liviana es la responsable de asociarse y formar la estructura del filamento grueso.

Cada filamento grueso contiene alrededor de 400 moléculas de miosina, unidas cabeza con cola en ambas direcciones. Esta disposición es fundamental para que la contracción ocurra.

Además de la miosina, existen otras proteínas en los filamentos gruesos, tales como las proteínas C, H y X. Estas se encuentran en bandas espaciadas periódicamente. Se piensa que estos anillos proteicos podrían proteger al filamento contra la destrucción por fuerzas de tensión o por cambios en el ambiente iónico.

### **Actina**

Es la principal proteína de los filamentos finos, constituye entre el 20 y el 25 % de las proteínas miofibrilares. En la forma monomérica (actina G) (42 – 48 kD) tiene estructura globular y es estable en agua, pudiendo existir también como dímero. La G-actina une ATP muy firmemente y, en presencia de magnesio, polimeriza espontáneamente para formar F-actina, con la consecuente hidrólisis del ATP unido. La F - actina o actina fibrosa presenta una estructura de doble hélice. La G - actina también polimeriza en presencia de sales neutras a una concentración de aproximadamente 0,15 M.

Los filamentos de F-actina interactúan con la cabeza de miosina. Al examinarse al microscopio electrónico, la miosina unida a la F-actina aparece como largas cuerdas en puntas de flecha apuntando en la misma dirección, lo cual indica que los monómeros de actina en la F-actina tienen polaridad (Foegeding y col, 1996).

### **Actomiosina**

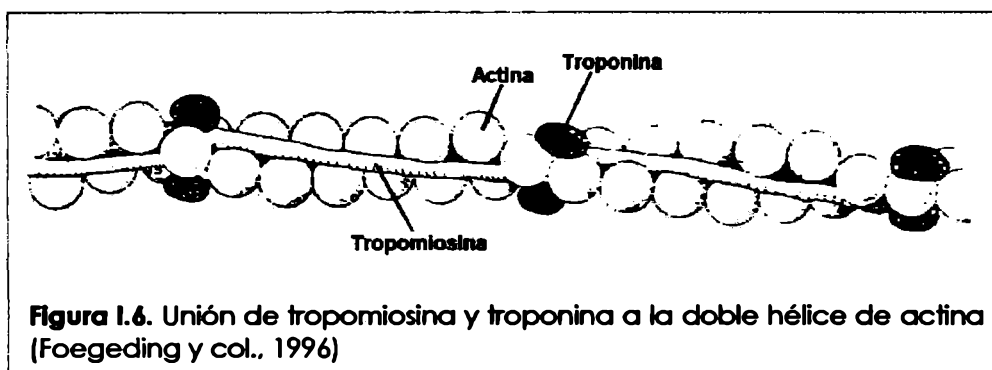
Cuando se mezcla miosina y actina *in vitro* se forma un complejo llamado actomiosina, interaccionando a través de puentes disulfuro. La actividad ATP-asa de la actomiosina está modificada con respecto a la miosina, ya que esta última es activada por calcio e inhibida por magnesio mientras que la primera es activada por magnesio. El complejo puede ser disociado en presencia de ATP y/o ADP e iones magnesio.

En el músculo *pot-mortem*, la actomiosina es el principal estado en que se encuentran la miosina y la actina, dada la depleción de ATP que ocurre. Por lo tanto, este complejo se encuentra en los extractos de músculo *post-mortem*.

### **Tropomiosina $\alpha$ y $\beta$**

Representa el 5 % de las proteínas miofibrilares. Su peso molecular es de 68 kD y está constituida por una cadena de  $\alpha$ -tropomiosina (37 kD) y una de  $\beta$ -tropomiosina (33 kD), aunque a veces también están presentes los homodímeros. Las dos cadenas polipeptídicas ( $\alpha$  - helicoidales) se encuentran formando una estructura supersecundaria parecida a la porción cola de la molécula de miosina.

La tropomiosina se agrega a través de sus extremos y se une al filamento de actina en cada uno de sus surcos, de manera tal que cada molécula de tropomiosina interactúa con siete monómeros de actina (**Figura 1.6.**). Junto con la troponina, forman un complejo que regula la interacción de la miosina con los filamentos finos.





### **Troponinas**

Representan un 5 % de las proteínas miofibrilares, existiendo en tres formas moleculares organizadas en un complejo: la *troponina I* (21 – 24 kD) es la subunidad que inhibe la unión miosina-actina y la actividad ATP-asa, la *troponina C* (18 kD) es el sitio de unión del calcio y la *troponina T* (31 – 37 kD) es el sitio de unión de troponina - tropomiosina.

Aunque los pesos moleculares de estas proteínas se conocen bien en los mamíferos, hay algunas discrepancias en los valores publicados para diversos pescados.

### **$\alpha$ y $\beta$ -Actininas**

Son proteínas de unión a la F-actina. La  $\alpha$ -actinina se localiza en el disco Z, siendo su función, aparentemente, darle estructura al mismo. Tiene una masa molecular de 200 kD y está constituida por dos subunidades de masa similar.

La  $\beta$ -actinina está constituida por un polipéptido de 35 kD y otro de 31 kD. Se localiza en el extremo libre del filamento de actina, pudiendo estar involucrada en la regulación de la longitud de los filamentos finos.

### **Otras proteínas sarcoméricas estructurales**

La desmina es una proteína de 55 kD que forma parte del citoesqueleto celular. Forma filamentos intermedios en longitud (10 nm), los cuales se localizan en la periferia de cada línea Z formando la conexión con las miofibrillas adyacentes.

La titina es una proteína de alta masa molecular (alrededor de 1000 kD), suficientemente larga como para extenderse desde la línea Z a la línea M. Representa el 10 % de las proteínas miofibrilares. Interactúa con la miosina, las proteínas de la línea M y la  $\alpha$ -actinina. Se cree que su función es regular la longitud de los filamentos gruesos y mantener la continuidad mecánica de las miofibrillas.

La principal proteína constituyente de la línea M es la miomesina (165 kD), representando el 3 % de las proteínas miofibrilares.

La nebulina es otra proteína miofibrilar grande (700 – 900 kD) que representa el 5 % de las proteínas miofibrilares. Tiene múltiples sitios de unión a la actina y podría funcionar regulando la longitud de los filamentos finos.

#### ***1.1.2.3.4. La contracción muscular***

La contracción ocurre cuando el músculo es estimulado por un impulso nervioso que despolariza el sarcolema. Dicha despolarización es transmitida al interior de la célula a través del sistema de túbulos T (Foegeding y col., 1996), produciendo una liberación de calcio del retículo sarcoplásmico a través de un canal de calcio. El calcio liberado se une a la troponina C causando una transición estructural que consecuentemente produce cambios en el complejo troponina-tropomiosina-actina, haciendo que la tropomiosina se mueva dentro de los surcos de la superhélice de F-actina. De esta manera, el filamento fino es capaz de interactuar con un filamento grueso y causar la contracción.

Cada cabeza de miosina puede interactuar con dos monómeros de actina a través de un sitio de unión fuerte y otro débil. Cuando al final de un ciclo de contracción, con la miosina fuertemente unida a la actina, se une una molécula de ATP al sitio ATPasa de la cabeza de miosina, se produce una separación de los dos segmentos de la cabeza de miosina lo cual produce un desacople de los sitios de unión fuerte. La cabeza de miosina se cierra alrededor de la molécula de ATP resultando en la disociación de la miosina y la actina. El ATP es hidrolizado, quedando ADP y fosfato unidos a la cabeza de miosina. La miosina comienza a recombinarse con la actina, primero a través de uniones débiles y luego de uniones fuertes y posteriormente, con la liberación del fosfato comienza la fuerza de contracción. Al final de la contracción el ADP es liberado y la cabeza de miosina vuelve al sitio de inicio.

La relajación del músculo involucra la desactivación del filamento fino, lo cual se logra a través de la disminución del calcio sarcoplásmico mediante un transporte activo del calcio hacia el interior del retículo sarcoplásmico.

La fuente de energía para la generación de ATP en el músculo claro es el glucógeno, mientras que en el músculo oscuro también puede ser obtenida a

través de los lípidos. El músculo oscuro posee muchas más mitocondrias que el músculo blanco, permitiéndole realizar un metabolismo aeróbico; mientras que el músculo blanco genera la energía principalmente mediante un metabolismo anaeróbico, acumulando ácido láctico.

#### ***1.1.2.3.5. Composición de aminoácidos de las proteínas musculares***

El músculo de los peces posee una excelente composición de aminoácidos que refleja principalmente la composición de la miosina, y que aporta altos contenidos de lisina, metionina, triptofano y otros aminoácidos esenciales. Esto lo hace un muy buen complemento de dietas que contienen proteínas vegetales (Contreras Guzmán, 2002). La composición de aminoácidos de peces (tanto marinos como de agua dulce) es muy próxima a la de bovino dadas las similitudes entre las correspondientes moléculas de miosina.

#### **1.1.2.4. La fracción lipídica del músculo**

Antiguamente, los lípidos de pescado eran considerados un componente indeseable, asociado al olor a grasa rancia que desvalorizaba la porción comestible. Actualmente, el aceite de pescado está causando una revolución en la medicina y en la nutrición, como consecuencia de una campaña por la reducción del colesterol dietario, ante la evidencia que las poblaciones cuya alimentación está basada en productos marinos, tienen menor incidencia de enfermedades isquémicas del corazón. Así, fue comprobado el beneficio de los ácidos grasos omega-3 ( $\omega$ 3) en la disminución del colesterol, el nivel de los triglicéridos plasmáticos, la disminución de ateromas y la atenuación de los procesos inmunoinflamatorios como asma, artritis, psoriasis (Barlow, 1987). Los esquimales, cuya dieta se basa en el consumo de animales marinos, ingieren el doble de colesterol que el occidental estándar y tienen una frecuencia de infarto 10 veces menor; mientras que los japoneses que consumen diariamente de 100 a 250 g de pescado presentan una agregación plaquetaria disminuida, con la

menor frecuencia de infarto de los países desarrollados o en desarrollo a pesar de estar sometidos a un elevado stress (Introzzi, 1995).

Las razones por las cuales los organismos marinos acumulan ácidos grasos poliinsaturados  $\omega 3$  en los tejidos musculares y depósitos de reserva no están aún totalmente explicadas. Las estructuras básicas son sintetizadas en el fitoplancton y en las macroalgas (Hardy y Keay, 1972; Ackman, 1980 y 1982) desde donde son transferidas al zooplancton y niveles superiores de la cadena alimentaria. De manera general, se puede aceptar que la estructura de los lípidos marinos es una forma de adaptación de las especies para sobrevivir en el agua salada y a temperaturas relativamente bajas, ya que los lípidos de peces de agua dulce, particularmente los de clima tropical, son completamente diferentes.

Existe una relación inversa entre el grado de poliinsaturación de los lípidos y la temperatura del hábitat, que resulta en grasas con puntos de fusión ligeramente inferiores a la temperatura mínima del medio acuático (Contreras, 2002). Aparentemente, mediante la regulación de la poliinsaturación se controla la fluidez de los lípidos protoplasmáticos (Hardy y Keay, 1972).

Por otra parte, la presencia en los organismos marinos de ácidos grasos de cadena larga se justificaría por la posibilidad de introducir un número mayor de enlaces dobles, particularmente si los ácidos grasos tuvieran estructura  $\omega 3$  (Ackman, 1982).

Los lípidos encontrados en extractos de tejidos de pescado pueden clasificarse en dos grandes fracciones: *Lípidos neutros* (triglicéridos, hidrocarburos, ácidos grasos libres, vitaminas liposolubles, esteroides, éteres de dialciliglicerol, alcoholes grasos y ceras) y *Lípidos polares* (glicolípidos, fosfolípidos, lipopéptidos).

### ***Lípidos neutros***

Los lípidos neutros constituyen cerca del 90 % de los lípidos totales en las especies grasas o semigrasas presentando porcentajes mucho menores en las especies magras. El músculo blanco de un pez magro típico puede contener menos del 1 % de lípidos, de los cuales hasta un 90 % puede corresponder a fosfolípidos (Ackman, 1980).

Los triglicéridos son los principales componentes de los lípidos neutros, siendo empleados para el almacenamiento de energía en depósitos de grasa, generalmente dentro de células especiales rodeadas por una membrana fosfolípida y una red de colágeno relativamente débil. Algunas especies pueden contener ceras esterificadas como parte de sus depósitos de grasas.

Como se mencionó anteriormente, las especies de pescado pueden clasificarse según de cómo almacenan sus lípidos de reserva; los pescados magros utilizan el hígado mientras que los grasos almacenan lípidos en células grasas en distintas partes del cuerpo tales como el tejido subcutáneo, en los músculos del vientre y en los músculos que mueven las aletas y la cola (Huss, 1998). Los depósitos de grasa se encuentran esparcidos por toda la estructura muscular, aunque la concentración de células grasas parece ser más elevada cerca de los myocommatas y en las regiones entre el músculo claro y el oscuro. El músculo oscuro contiene algunos triglicéridos dentro de las células musculares, incluso en las especies magras, dado que este músculo es capaz de metabolizar directamente los lípidos para la obtención de energía.

Los triglicéridos son los responsables de la amplia variación estacional de los lípidos, principalmente por acumulación bajo la piel y en la cavidad ventral. Dichas variaciones son más importantes en las especies pelágicas, estando relacionadas con las fases de migración y desove, como ya fue mencionado anteriormente en esta Introducción.

Dentro de la fracción de los lípidos neutros se encuentran también las vitaminas liposolubles: A, D y E. Las vitaminas A y D se encuentran en muy pequeñas cantidades en el músculo, siendo este contenido algo mayor para las especies grasas. Al igual que los mamíferos, los peces almacenan en la carne casi exclusivamente  $\alpha$ -tocoferol (el cual posee la mayor actividad de vitamina E) y pequeñas cantidades de  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol (Contreras Guzmán, 2002). La vitamina E es un antioxidante natural del músculo, pudiendo actuar en forma sinérgica con los fosfolípidos musculares.

### **Lípidos polares**

Los lípidos polares tienen funciones estructurales, alcanzando porcentajes muy variables con respecto a los lípidos totales según las especies y de acuerdo con el contenido de triglicéridos, con los cuales presentan una relación inversa.

Dentro de esta fracción, los fosfolípidos son los principales constituyentes de las estructuras de las membranas, incluyendo la membrana celular, el retículo sarcoplásmico y otros sistemas tubulares intracelulares, como así también de las membranas de organelas tales como las mitocondrias.

Cuando los fosfolípidos se expresan cada 100 g de músculo, se observan valores relativamente próximos en la mayoría de las especies, demostrando que estos compuestos no son afectados por la especie ni por condiciones nutricionales adversas (Contreras Guzmán, 2002). Si se expresan en función del contenido de lípidos totales se obtienen valores bajos para las especies grasas y altos para las especies magras.

El fosfolípido más abundante en los músculos de peces es la fosfatidilcolina, seguido por la fosfatidiletanolamina.

### **Ácidos grasos**

Los ácidos grasos se encuentran formando parte de casi todas las clases de lípidos mientras que como ácidos grasos libres se hallan en una pequeña fracción.

La composición de ácidos grasos de los lípidos está influenciada por los diferentes factores tales como la familia biológica, las condiciones ambientales (salinidad, temperatura, estaciones), la composición de ácidos grasos del alimento habitual y el estado de estrés fisiológico (ayuno, migración, desove) (Contreras Guzmán, 2002).

Existen importantes diferencias entre los ácidos grasos de los animales marinos y los de otros grupos de organismos, algunas de las cuales se resumen a continuación:

- Mayor diversidad en la longitud de las cadenas, incluyendo ácidos grasos desde 14 hasta 24 átomos de carbono.
- Ácidos grasos insaturados que contienen entre 1 a 6 insaturaciones, generando un promedio de insaturación superior al de las grasas animales y los aceites vegetales.
- Ácidos grasos en formas isoméricas, generando las estructuras  $\omega 3$ ,  $\omega 4$ ,  $\omega 5$ ,  $\omega 6$ ,  $\omega 7$ ,  $\omega 9$  y otras. En los lípidos marinos predomina la estructura  $\omega 3$  y en los peces de agua dulce la  $\omega 6$ .

En los aceites de pescado han sido identificados más de 90 ácidos grasos, aunque no más de 20 exceden el 1 % y solo 10 u 11 existen en cantidades suficientes para influir en las propiedades físicas o químicas de las grasas.

Los aceites marinos presentan una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)  $\omega 3$  y escasa cantidad de sus precursores de 18 carbonos (ácido linoleico y ácido linolénico) (Introzzi, 1995).

Entre los PUFAs de la serie  $\omega 3$  presentes en los lípidos de pescado se destacan: ácido eicosapentaenoico EPA (C20:5 $\omega 3$ ), ácido docosapentenoico DPA (C22:5 $\omega 3$ ) y ácido docohexaenoico DHA (C22:6 $\omega 3$ ).

#### **1.1.2.5. Otros componentes musculares**

##### ***1.1.2.5.1. Compuestos nitrogenados no proteicos***

En los peces el contenido de compuestos nitrogenados no proteicos (NNP) es muy elevado y presenta una composición muy compleja. El estudio de dichos componentes ha sido de gran utilidad en el desarrollo de diversas áreas de la ciencia y la tecnología de los pescados.

Algunos compuestos del NNP son específicos de las especies, lo cual permite utilizarlos en la clasificación de conservas y productos cocidos ya que no se destruyen por calor. Por otra parte, son ampliamente utilizados en la evaluación de la frescura, dado que son modificados por enzimas endógenas y microorganismos, generando compuestos típicos. Además, algunos de estos

solutos están involucrados en la generación de aroma y sabor en el pescado (Contreras Guzmán, 2002).

El contenido de NNP es dependiente de las especies, variando entre 8 y 18 % del nitrógeno total en los teleósteos (Simidu, 1961). Las especies de menor contenido de NNP son en general demersales, con pequeñas cantidades de músculo rojo y bajo contenido lipídico. Entre las especies con mayores contenidos de NNP se encuentran las de la familia Scombridae (atún, bonito, caballa), con una combinación única de aminoácidos libres que causan su sabor y aroma peculiar.

Los principales componentes de esta fracción son: bases volátiles como el amoníaco y el óxido de trimetilamina (OTMA), derivados de la guanidina (creatina), derivados del imidazol (histidina y otros), aminoácidos libres, nucleótidos y bases purínicas, y urea (en los peces cartilaginosos) (Huss, 1998; Contreras Guzmán, 2002).

La composición de los distintos componentes del NNP varía entre las especies así como también dentro de la misma especie, dependiendo de la talla, la estación del año, la zona del músculo muestreada, etc. (Konosu y Yamaguchi, 1982).

El OTMA es un compuesto importante y característico de las especies marinas. Existen diferentes teorías que explican el origen del OTMA. Por una parte, las algas verdes, rojas y cafés lo sintetizan y los organismos zooplanctónicos y los peces herbívoros lo consumen y almacenan, transfiriéndose luego a los siguientes niveles de la cadena trófica (origen exógeno). Además algunas especies de peces son capaces de sintetizar OTMA a partir de trimetilamina (TMA) (origen endógeno), aunque esta fuente se considera de menor importancia (Huss, 1998; Contreras Guzmán, 2002).

Se han postulado tres funciones básicas del OTMA en los peces marinos: 1) regulador osmótico, ajustando las concentraciones de solutos para lograr una isotonicidad con el entorno acuático; 2) agente de desintoxicación, como un mecanismo para reducir el exceso de TMA formada por degradación de otros compuestos, a través de la TMA monooxigenasa que transforma TMA en OTMA; 3) función estabilizadora de proteínas en especies con alto contenido de urea.



Cuantitativamente, el principal componente de la fracción NNP es la creatina, la cual tiene una función energética de gran importancia como portador de fosfato en la contracción muscular.

#### **1.1.2.5.2. Vitaminas y minerales**

La cantidad de vitaminas y minerales es específica de la especie y puede variar con la estación del año. En general, la carne de pescado es una buena fuente de vitamina B y como se mencionó anteriormente, de vitamina A y D en el caso de especies grasas.

En cuanto a los minerales, el pescado es una valiosa fuente de calcio y fósforo, así como también de hierro y cobre, siendo su contenido de sodio bajo.

#### **1.1.3. Cambios post-mortem en el músculo**

Al momento de la muerte del pez, el suministro de oxígeno al tejido muscular se interrumpe porque la sangre deja de ser bombeada al corazón y no circula a través de las branquias donde, en los peces vivos, era enriquecida con oxígeno. Así, en condiciones de anaerobiosis, el ATP puede ser sintetizado a través de otras vías tal como la conversión de creatina fosfato a creatina transfiriendo su fosfato al ADP, hasta el agotamiento de la creatina fosfato. Luego que la creatina fosfato ha sido utilizada, lo cual ocurre rápidamente después de la muerte, la glicólisis anaeróbica continúa regenerando algo de ATP, acumulándose lactato como producto final (Foegeding y col., 1996). Paralelamente, ocurre una depleción del ATP a través de diferentes ATPasas, principalmente de aquellas relacionadas con los sistemas de membrana y con una contribución de las proteínas contráctiles. La actividad glicolítica finaliza por consumo del sustrato o, más probablemente, por la disminución del pH causada por la hidrólisis de ATP.

De esta manera, el músculo anaeróbico no puede mantener su nivel normal de ATP y cuando el nivel intracelular declina de 7-10  $\mu\text{moles/g}$  a menos de 1  $\mu\text{mol/g}$  de tejido, el músculo entra en *rigor-mortis* (Huss, 1998). El estado de *rigor-mortis* se define como la pérdida de la plasticidad y extensibilidad de los músculos

debida a la alteración de los ciclos de contracción y relajación, ya que la depleción del ATP causa un aumento cada vez mayor de los complejos de actomiosina no disociados (Contreras Guzmán, 2002).

En función de estos cambios, después de la muerte de los animales, los músculos pasan por tres etapas bien definidas:

- 1) Fase de *pre-rigor-mortis*
- 2) Fase de *rigor-mortis* pleno (contracción)
- 3) Fase de *post-rigor-mortis* (relajación)

A lo largo de estas etapas ocurren una serie de reacciones, afectando diferentes características del músculo, las cuales se detallan a continuación:

#### **a) Cambios en las propiedades físicas y químicas del músculo**

En la fase de *pre-rigor-mortis*, el músculo conserva características físicas similares a las que tenía en el animal vivo, entre las cuales pueden mencionarse: pH alrededor de 7,0; máxima retención de agua; extensibilidad; máxima resistencia eléctrica; máxima extracción de proteínas (cercana al 90 %) y contracción frente a un estímulo eléctrico (Contreras Guzmán, 2002).

La duración del *pre-rigor* dependerá de las reservas de ATP al momento de la muerte. Según el sistema de pesca empleado, algunas especies sufren un gran stress que puede agotar el glucógeno antes de la captura, lo que resulta en ausencia de *pre-rigor* y un *rigor* breve, sin disminución del pH, llamado *rigor-mortis* alcalino, que origina un músculo con una consistencia pegajosa y una vida útil muy corta.

Una buena condición nutricional al momento de la captura, un mayor tamaño de los especímenes y un enfriamiento rápido de las capturas son factores que prolongan el período de *pre-rigor* conduciendo a un período de *rigor-mortis* más largo, lo cual es muy conveniente para extender la vida útil del pescado. Entre los factores que disminuyen el período de *pre-rigor* se cuentan: los maltratos del pescado a bordo o en la industria, el agotamiento durante la captura, las especies de carne oscura y las especies en fase de migración o desove.

El comienzo del *rigor-mortis* puede evidenciarse por una ausencia de reacción del músculo al estímulo eléctrico o a través de la verificación de la rigidez muscular mediante un texturómetro o simplemente por el tacto. También, el tiempo en el cual la mayoría del ATP ha sido degradado puede ser utilizado como un indicador del comienzo del *rigor-mortis*, coincidiendo con una incipiente pérdida de extensibilidad (Foegeding y col., 1996).

El tiempo del comienzo del *rigor* es fuertemente dependiente de la temperatura. En general, en los pescados enfriados con hielo inmediatamente después de ser capturados, el *rigor* se inicia en las primeras 7 horas (Amlacher, 1961). En distintas especies pesqueras marinas, se ha comprobado que la velocidad de entrada en *rigor* se incrementa al aumentar la temperatura (Amlacher, 1961; Jones y col., 1965); contrariamente, en bovino, la entrada en *rigor mortis* es mas rápida a 0 °C que a temperatura ambiente, aunque vuelve a incrementarse a partir de los 25 °C.

En términos generales, no hay un pH específico al cual el músculo se torne rígido, pero es frecuente que el músculo entre en *rigor* cuando el pH alcanza un valor mínimo. Dicho valor mínimo de pH puede encontrarse entre 6,1-6,5, aunque en algunas especies puede llegar hasta 5,8-6,0 (caballas) o 5,4-5,6 (atunes e hipogloso). En los pescados, raramente el pH desciende a valores tan bajos como los observados en el músculo en *rigor* de los mamíferos, tal como en el vacuno donde se registran valores de pH de 5,1 (Huss, 1998; Contreras Guzmán, 2002).

Esta disminución de pH tiene consecuencias en las propiedades físicas del músculo. A medida que el pH disminuye, se reduce la carga neta de la superficie de las proteínas musculares, causando su desnaturalización parcial y disminuyendo su capacidad de enlazar agua. El músculo en *rigor* resulta particularmente inadecuado para un procesamiento posterior que involucre calentamiento, dado que la desnaturalización por calor incrementa más la pérdida de agua, con un efecto perjudicial sobre la textura del músculo (Love, 1975; Huss, 1998).

Por otra parte, durante el *rigor* ocurre un fenómeno conocido como "gaping", el cual consiste en la separación de los miotomas debido a un debilitamiento del colágeno que los une al myocommata. El bajo pH es uno de

los factores que produce dicho debilitamiento (Foegeding y col., 1996; Contreras, 2002). Si se filetea el pescado en estas condiciones, se obtienen rendimientos bajos con un alto porcentaje de filetes desgarrados.

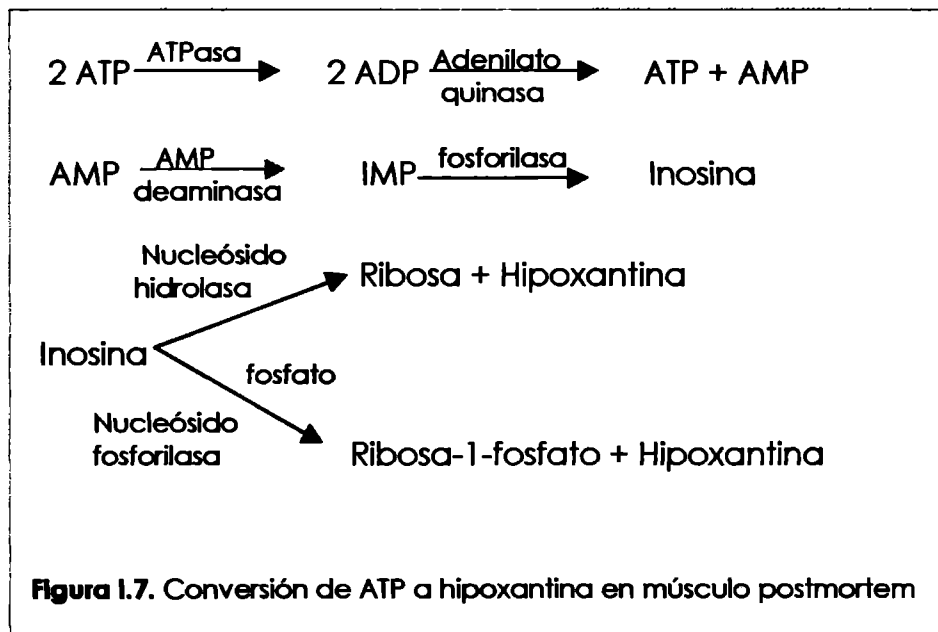
Después de un período variable de rigidez que depende de las condiciones de almacenaje y de factores biológicos (especie, edad, tipo de músculo), el músculo se relaja y recupera muchas de las propiedades que tenía en el período de *pre-rigor*, entrando en el período de *post-rigor*. Así, el pH aumenta hasta valores algo más bajos que los del *pre-rigor*; incrementándose también la retención de agua, la extensibilidad y la solubilidad de las proteínas.

La resolución del *rigor mortis* es un proceso que no está totalmente comprendido. El principal factor involucrado parece ser la pérdida de regulación de las proteasas que actúan en el recambio de las proteínas del animal vivo. Estas proteasas hidrolizan las proteínas musculares, debilitando la estructura de las miofibrillas. La actividad de las proteasas en el músculo *post-mortem* dependerá de la cantidad de enzima activa, de la presencia de inhibidores, activadores y cofactores y del pH (Foegeding y col., 1996).

Las catepsinas son proteasas lisosomales con actividad óptima a pH ácido. En el músculo se encuentran varios tipos: catepsina B1 (pH óptimo 3,5-6), catepsina H (pH 6,0), catepsina L (pH 5,0) y catepsina D (pH 3,0-5,0). No está confirmada la participación de estas proteasas en el relajamiento del músculo. Se le ha dado mayor importancia en este proceso a la participación de las calpaínas o proteasas neutras activadas por calcio ( $\mu$ -calpaína y m-calpaína). La acción de estas proteasas llevaría a la ruptura de la estructura multimolecular de los sarcómeros, por lo que su impacto en el ablandamiento de la carne sería mucho más relevante que una hidrólisis con producción de fragmentos de menor peso molecular. Este sistema enzimático se localiza en la línea Z, sobre la banda M y otras zonas rodeadas de sarcoplasma conteniendo calcio. La activación de las calpaínas produciría una remoción total o parcial de la línea Z, degradación de los enlaces cruzados (transversales) de las miofibrillas y de las proteínas ( $\alpha$ -actinina) que sostienen las moléculas de miosina (Contreras Guzmán, 2002).

**b) Degradación de nucleótidos**

El reblandecimiento del músculo durante la resolución del rigor (y eventualmente el proceso de deterioro) coincide con cambios autolíticos. Dentro de ellos, se encuentra la degradación de los compuestos relacionados con el ATP para formar diferentes intermediarios como adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), inosina (Ino) y finalmente Hipoxantina (Hx) (**Figura 1.7.**). Actualmente se acepta que la IMP es responsable del sabor deseable a pescado fresco, presente solo en productos de alta calidad.



La velocidad de cada una de las reacciones anteriores varía marcadamente de una especie a la otra, progresando generalmente en coincidencia con el nivel de deterioro percibido mediante un panel de analistas sensoriales. Saito y col. (1959) fueron los primeros en observar este comportamiento, desarrollando una fórmula para determinar la frescura del pescado basada en estos cambios. Así, definieron el valor K como la relación de la concentración de inosina e hipoxantina con respecto a la cantidad total de compuestos relacionados con el ATP.

La degradación de nucleótidos no está necesariamente relacionada con el deterioro, considerándose que solo la hipoxantina tiene un efecto directo en el sabor amargo percibido en el pescado deteriorado (Huss, 1998).

#### **1.1.4. Métodos de conservación del pescado**

A través de la historia, la preferencia del hombre ha estado dirigida al consumo de pescado fresco antes que a otro tipo de producto pesquero. Sin embargo, el pescado se deteriora muy rápidamente y ha sido necesario desarrollar otros métodos para su preservación (Huss, 1998).

Evidencias históricas demuestran que en la China milenaria, hace más de tres mil años, se utilizaba hielo natural para preservar pescado. Los antiguos romanos también empleaban hielo natural mezclado con algas marinas para mantener el pescado fresco. Sin embargo, fue el desarrollo de la refrigeración mecánica lo que hizo posible la utilización del hielo en la preservación del pescado. Las ventajas prácticas de la utilización del hielo en la manipulación del pescado fresco están plenamente comprobadas.

El hielo es utilizado en la preservación del pescado por las siguientes razones: a) reducción de la temperatura, con lo cual es reducido el crecimiento de microorganismos patógenos y de deterioro así como también la velocidad de reacciones enzimáticas de deterioro y b) el hielo derretido mantiene la humedad del pescado, previniendo la deshidratación superficial y reduciendo la pérdida de peso.

Por otra parte, la congelación es un método de preservación donde el deterioro debido a la putrefacción y autólisis que ocurren en el almacenamiento refrigerado son perfectamente controlados, aumentando así su vida útil (Dondero, 1990). Sin embargo, la congelación y el almacenamiento congelado producen deterioros en la calidad de los productos. Los problemas más serios se producen en el sabor, color y principalmente en la textura. El deterioro en el sabor se debe principalmente a la formación de compuestos de bajo peso molecular provenientes de la oxidación de lípidos o degradación de compuestos nitrogenados, mientras que la decoloración se debe a la degradación de los

pigmentos. Los cambios más importantes se producen en la textura, que se vuelve dura, fibrosa, esponjosa o seca. El músculo pierde también ciertas propiedades funcionales, como la capacidad de emulsificación, de retención de agua, de unir lípidos y de formar geles. Estos cambios son consecuencia -principalmente- de la desnaturalización proteica que ocurre a temperaturas por debajo de 0 °C.

Otro mecanismo para conservar los productos del mar es la deshidratación, inhibiendo el crecimiento bacteriano debido a la disminución de la actividad acuosa  $a_w$  de los productos. La deshidratación puede obtenerse por diferentes medios, entre los cuales puede mencionarse la "deshidratación en túnel" a través del pasaje de una corriente de aire seco; la "salazón" y el "ahumado". La salazón puede realizarse tanto con sal sólida como con salmuera. Con la técnica de ahumado, no sólo se consigue una deshidratación sino también la adición de sustancias que se desprenden de las maderas, dándole un sabor especial a los productos así conservados.

Otro procedimiento importante para la conservación de ciertas especies es el envasado de los productos cocidos en envases herméticos y su esterilización ("conservas").

### **I.1.5. Funcionalidad de las proteínas musculares : Gelación térmica**

Un gel es una fase intermedia entre un sólido y un líquido, formada por el entrecruzamiento de polímeros a través de uniones covalentes y no covalentes para dar una matriz que es capaz de retener agua y otras sustancias de bajo peso molecular (Damodaran, 1996). En el proceso de gelación está involucrada la transformación de la proteína del estado "sol" al estado "tipo gel", la cual puede llevarse a cabo a través de la aplicación de calor, enzimas o cationes divalentes en condiciones apropiadas.

Gran parte de los geles proteicos en alimentos se obtienen por tratamiento térmico. La proteína en estado "sol" es transformada primero a un estado de "progel" por desnaturalización, siendo éste un estado de líquido viscoso en el cual ya ha ocurrido un cierto grado de polimerización proteica. Esta etapa provoca el

despliegamiento de las proteínas y la exposición de grupos funcionales, necesaria para que ocurra la formación de la red proteica.

Los principales tipos de interacciones involucradas en la formación de la matriz de un gel son los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y las electrostáticas. En el caso de las proteínas que contienen grupos cistina o cisteína también pueden formarse uniones covalentes del tipo puentes disulfuro.

Las proteínas pueden formar dos tipos de geles según sus propiedades moleculares y las condiciones del medio. Así, las proteínas que contienen grandes cantidades de aminoácidos no polares sufren una agregación hidrofóbica. Los agregados insolubles se asocian posteriormente al azar en un gel tipo coágulo. La agregación y formación de la matriz ocurren a una velocidad mayor que la desnaturalización. Los geles formados son opacos debido a la matriz desordenada formada por agregados proteicos.

Sin embargo, las proteínas que contienen pequeñas cantidades de residuos no polares forman complejos solubles, con una velocidad de asociación menor que la velocidad de desnaturalización. De esta manera, la matriz del gel es formada predominantemente por puentes de hidrógeno, lo cual no ocurre hasta ser enfriada. En estas condiciones la velocidad de asociación es baja, facilitando la formación de una matriz ordenada y translúcida.

Los geles translucidos tienen una mayor capacidad de retención de agua que los coágulos opacos, sugiriendo que gran parte del agua de los geles está unida a través de puentes de hidrógeno a grupos carbonilos y aminos de las uniones peptídicas, está hidratando grupos cargados o se encuentra en estructuras formadas por interacciones de hidrógeno entre las moléculas de agua.

En el caso de productos cárneos, la formación de estructuras tipo gel son necesarias para unir piezas de carne, de distintas formas o tamaños, simulando la apariencia y textura del músculo entero o para crear nuevos productos con texturas diferentes. Comúnmente, esto se logra mediante la gelación térmica de las proteínas miofibrilares (Foegeding y col., 1996).

La capacidad de las proteínas miofibrilares para formar un gel inducido por calor fuerte requiere una buena dispersión y reactividad de la superficie de estas



proteínas, o sea, disponibilidad de los sitios para favorecer las interacciones proteína-proteína.

En el caso del músculo de pescado, la gelación térmica es un paso fundamental en la manufactura de una variedad de alimentos preparados a partir de "surimi", tales como "kamaboko" y productos análogos de crustáceos (por ejemplo, "kanikama" que es un análogo de cangrejo) (Visessanguan y col., 2000).

Se denomina con el término japonés "surimi" al producto (pasta) intermediario producido por repetidos lavados de músculo de pescado picado, almacenado en congelación en presencia de crioprotectores para extender su vida útil (Roussel y Cheftel, 1988; Visessanguan y col., 2000). El surimi es, básicamente, un concentrado de proteínas miofibrilares, al cual se le ha reducido el color, el olor y sabor a través de los lavados.

Muchos países, entre los cuales se destacan Japón, Estados Unidos, Canadá y los de la Unión Europea, producen surimi comercialmente. El surimi de mayor calidad y más económico se produce a partir de especies abundantes, neutras en cuanto a su "flavor" y olor, de músculo blanco y no grasas, siendo el Alaska pollack el pescado más ampliamente utilizado.

La preparación del surimi a nivel industrial consta de una serie de etapas, las cuales se resumen a continuación (Lee, 1986):

- 1) *Obtención de la pulpa de pescado*: el pescado descabezado y eviscerado es sometido a una máquina despulpadora donde la piel y las espinas son removidas, siendo importante el tamaño de las partículas obtenidas para el procesamiento posterior.
- 2) *Lavado*: se realizan sucesivos lavados con el fin de eliminar sangre, pigmentos, proteínas solubles, sustancias nitrogenadas no proteicas y cualquier otra sustancia soluble. La fase grasa puede ser removida durante el proceso por flotación (Lanier, 1986). Los lavados son realizados con agua fría (10 °C o menos), siendo óptima una proporción de agua a carne de 3:1 o 4:1. Se ha demostrado que no son necesarios más de tres ciclos de lavado y que el tiempo de residencia óptimo se encuentra alrededor de los 9 minutos por cada ciclo. Otros factores importantes en el

procesamiento son: la velocidad de agitación, las características del agua de lavado, la frescura del pescado y la presencia de materia grasa. En este paso se pierde entre un 15 y 20 % del peso.

- 3) *Separación del agua de lavado*: el agua es drenada a través de un tambor rotatorio perforado. Se producen algunas pérdidas de sólido que pasan a través de las perforaciones del tambor.
- 4) *Refinado*: se utilizan mallas (1-2 mm) para separar músculo claro de oscuro y tejido conectivo.
- 5) *Deshidratación*: se realiza una deshidratación por presión de la carne previamente tratada con salmuera para facilitar la remoción de humedad. El nivel de humedad alcanzado se encuentra alrededor del 85 %.
- 6) *Incorporación de crioprotectores*: Mediante un mezclador (tipo cutter o de paletas giratorias) se homogeneizan las sustancias crioprotectoras con el músculo lavado. Entre las sustancias agregadas se cuentan la sal (2-3 %) la cual logra la solubilización de las proteínas miofibrilares, polifosfatos, azúcares (sacarosa, sorbitol, glucosa).
- 7) *Congelado*

La pasta de surimi solubilizada por el agregado de sal, al ser sometida a calentamiento, permite la obtención de un gel el cual recibe el nombre de "kamaboko". Este es un complejo proceso fisicoquímico que involucra cambios estructurales y funcionales de las proteínas miofibrilares.

La formación de la matriz del gel involucra las siguientes etapas fundamentales (Roussel y Cheffel, 1990): a) disociación y solubilización de los filamentos de miosina en moléculas individuales; b) desplegamiento parcial de la región de  $\alpha$ -hélice de las cadenas pesadas de miosina y c) formación de una matriz del gel ordenada por agregación de esas regiones desplegadas a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Liu y col., 1982). Estas tres etapas pueden tener lugar cuando el surimi es mantenido a 35-40 °C (30 minutos) en presencia de sal. Una cuarta etapa tendría lugar al realizar el tratamiento a 70-90 °C, involucrando la agregación de las cabezas de miosina a través de interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro.

Las proteínas miofibrilares de pescado presentan características particulares en cuanto a su comportamiento durante la gelación térmica, presentando el fenómeno de "suwari" o "gel setting" al ser incubadas a temperaturas entre 4 y 40 °C por diferentes tiempos (Roussel y Chefftel, 1988). En estas condiciones se forma un gel débil pero elástico, el cual resultaría de interacciones proteína-proteína debidas a un desplegamiento parcial de la miosina. Se ha sugerido la participación de interacciones hidrofóbicas en el fenómeno de "setting" (Niwa, 1975).

Cuando el surimi es calentado rápidamente a 75 – 90 °C sin incubación previa a temperaturas menores a 40 °C, se obtiene un gel más rígido pero menos elástico, debido a un predominio de la agregación sobre el desplegamiento. Los mejores atributos texturales (mayor rigidez y elasticidad) se obtienen al realizar una incubación a 35 – 40 °C seguida por el tratamiento a 80 – 90 °C (Ishikawa y col., 1979; Roussel y Chefftel, 1988).

La capacidad del surimi de formar un gel elástico depende fundamentalmente de la miosina (Sano y col., 1988). El complejo de actomiosina presente en el surimi puede formar un gel elástico; esta capacidad deriva de la porción de miosina. Sin embargo, se ha demostrado que la unión con actina, modifica las propiedades de gelificación de la miosina (Yasui y col., 1980), produciendo la miosina geles más elásticos que la actomiosina (Sano y col., 1988).

La capacidad de gelación de las distintas especies parece estar relacionada con la cantidad de superficie hidrofóbica expuesta por la miosina (Chan y col., 1992a, b). Además, se ha demostrado la participación de enlaces disulfuro en la formación del gel. La importancia de la cadena pesada de miosina estaría relacionada con su alto contenido de grupos sulfhidrilos (-SH), los cuales tienden a formar enlaces disulfuro a partir de los 40 °C, incrementándose su formación a mayor temperatura (Roussel y Chefftel, 1990). Así, las cabezas de miosina tienden a agregarse a partir de los 40 °C, alcanzando la máxima interacción a partir de los 50 °C. Se ha propuesto que las cabezas de miosina permiten la gelificación mediante enlaces cabeza-cabeza, pero las colas de miosina integran la red mediante su asociación, la cual se iniciaría a partir de los 50 °C, posteriormente el

desdoblamiento de la estructura helicoidal y exposición de sus residuos hidrofóbicos (Chan y col., 1992b; Sharp y Offer, 1992).

### **1.1.6. La especie en estudio: Salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*)**

La especie elegida para la realización de este trabajo fue el "salmón de mar", "salmón blanco" o "falso salmón" correspondiente a la especie *Pseudoperca semifasciata* (Cuvier, 1829), familia Pinguipedidae, orden Perciformes. Otros nombres comunes dados a esta especie son: namorado (Brasil), chanchito (Uruguay) y Brazilian sandperch en inglés (Cousseau y Perrota, 2003).

Se trata de un pez demersal teleósteo, habitante de aguas costeras del Océano Atlántico sudoccidental. Su distribución geográfica abarca desde los 23 °S en Brasil hasta los 47 °S en la Patagonia Argentina (González, 1995). Habita tanto en cuevas "salmoneras", como en fondos duros y arenosos.

#### **1.1.6.1. Características biológicas**



Recientemente, se han realizado diversos trabajos acerca del "salmón de mar", relacionados con

aspectos biológicos y taxonómicos. Se trata de una especie con características biológicas particulares, diferentes de las de otras especies demersales. Así, se ha informado que es una especie longeva (puede vivir hasta 30 años) de crecimiento lento, hallándose ejemplares de gran peso (machos de 12 kg y hembras de 10 kg) y talla (alrededor de 140 cm) (Elías y Burgos, 1988). Presenta un marcado dimorfismo sexual, tanto en la talla como en los patrones de coloración (Macchi y col., 1995; González, 1995). La temporada de actividad reproductiva comienza en octubre, con máxima actividad en noviembre y diciembre, finalizando en enero.

En cuanto a sus hábitos alimentarios, es una especie predadora activa, principalmente consumidora de especies demersales tales como la merluza y el langostino. Con el aumento de talla, el "salmón de mar" presenta una mayor preferencia por el consumo de peces con respecto a los crustáceos (Elías y Rajoy, 1992). Se ha demostrado que los individuos no se alimentan durante el período de desove.

#### **1.1.6.2. Importancia comercial**

El "salmón de mar" es un recurso de explotación comercial considerable, tanto por la flota costera (puertos de Rawson (Chubut), San Antonio Oeste (Río Negro) y Quequén (Buenos Aires), como por la de media altura y de altura (Mar del Plata y Bahía Blanca (Buenos Aires)), Puerto Madryn y Comodoro Rivadavia (Chubut) (Elías y Burgos, 1988). Las capturas se realizan a profundidades de hasta 90 metros mediante red de arrastre de fondo.

Las capturas de los últimos años (1993 – 2003) han variado entre las 2000 y 3500 toneladas (Revista Redes, 2004). Existen variaciones estacionales en los volúmenes de captura, con una importante merma en los meses de otoño e invierno y un aumento durante la primavera y el verano.

El "salmón de mar" es un producto muy apreciado por la calidad de su carne. Se destina al mercado interno en forma de postas y entero, tanto fresco como congelado, mientras que se exporta congelado en forma de filete o entero descabezado y eviscerado(H&G).



## I.II. OXIDACIÓN LIPÍDICA

Durante el procesamiento, almacenamiento y manipulación de los alimentos, los lípidos pueden sufrir reacciones químicas complejas así como también reaccionar con otros componentes del alimento, causando la formación de compuestos tóxicos e indeseables desde el punto de vista de la calidad del mismo. Dentro de los principales procesos de deterioro de los lípidos pueden mencionarse la lipólisis, la oxidación y la descomposición térmica.

La *lipólisis* consiste en la liberación de ácidos grasos por hidrólisis de sus uniones ésteres mediante acción enzimática o mediante la acción de calor y humedad. En las grasas de tejidos animales vivientes, los ácidos grasos libres están prácticamente ausentes, pudiendo aparecer luego de la muerte del animal por acción enzimática (Nawar, 1996). La mayoría de las especies de pescado presentan hidrólisis de fosfolípidos durante el almacenamiento congelado, siendo este proceso asociado al deterioro de la calidad de esos productos.

Diversos estudios realizados indican que la hidrólisis de los triglicéridos conduce a un incremento de la oxidación de los lípidos; sin embargo la hidrólisis de los fosfolípidos inhibiría dicho proceso (Shewfelt, 1981).

En términos generales la *oxidación de los lípidos* puede darse a través de dos mecanismos:

1. **Autoxidación:** es la reacción con oxígeno molecular a través de un mecanismo autocatalítico. Es la principal causa de deterioro oxidativo de los lípidos.
2. **Enzimático:** a través de enzimas llamadas lipooxigenasas.

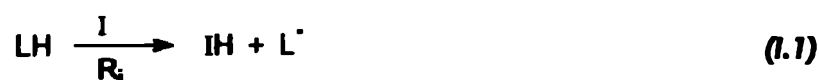
### I.II.1. Autooxidación lipídica

#### I.II.1.1. Mecanismo de autoxidación

La *autoxidación* de los lípidos se produce mediante un mecanismo de radicales libres, el cual puede describirse a través de una serie de etapas (Frankel, 1998; Nawar, 1996):

## Iniciación

La oxidación directa de los lípidos insaturados por el oxígeno triplete (la forma más estable del oxígeno) es termodinámicamente desfavorable, dado que los dobles enlaces de los ácidos grasos se encuentran en estado singlete y tal reacción no cumpliría con la regla de la conservación del spin. En función de ello, la producción de los primeros radicales debe estar catalizada. En presencia de iniciadores (I), los lípidos insaturados (LH) pierden un radical hidrógeno ( $H^\bullet$ ) de la posición  $\alpha$  con respecto a los dobles enlaces del ácido graso para formar un radical libre lipídico según la reacción (1.1):



Los iniciadores pueden producir radicales por diferentes mecanismos: disociación térmica de hidroperóxidos presentes como impurezas; descomposición de hidroperóxidos catalizada por metales o exposición a la luz; siendo el más probable el segundo.

Por otra parte, el oxígeno singlete puede reaccionar con los ácidos grasos insaturados con mucha mayor velocidad que el oxígeno triplete, generando hidroperóxidos que pueden servir como iniciadores en las reacciones anteriores. La vía más común de generación de oxígeno singlete es la fotosensibilización de los pigmentos naturales presentes en los alimentos, tales como clorofila, hemoglobina y mioglobina.

## Propagación

El radical alquilo ( $L^\bullet$ ) reacciona muy rápidamente con oxígeno molecular para formar radicales peróxilos ( $LOO^\bullet$ ) (1.2). Esta reacción es mucho más rápida que la siguiente, en la cual se transfiere un hidrógeno de otra molécula lipídica LH para dar un hidroperóxido LOOH y otro radical  $L^\bullet$  (1.3).



La susceptibilidad de los lípidos a la autoxidación depende de la disponibilidad y relativa facilidad de los hidrógenos alílicos para reaccionar con los radicales peroxilos. Debido a la estabilización por resonancia de las especies  $L^{\cdot}$ , pueden formarse hidroperóxidos isoméricos.

Los hidroperóxidos son los productos primarios fundamentales de la oxidación lipídica. Son relativamente inestables, participando en numerosas reacciones posteriores. En los primeros estadios de la autoxidación, su velocidad de formación excede a la velocidad de descomposición; mientras que en los últimos estadios se da la relación inversa.

### **Terminación**

En las últimas etapas de la oxidación, luego de alcanzar un máximo, la velocidad disminuye, los radicales peroxilos reaccionan unos con otros formando productos no radicalarios (1.4).



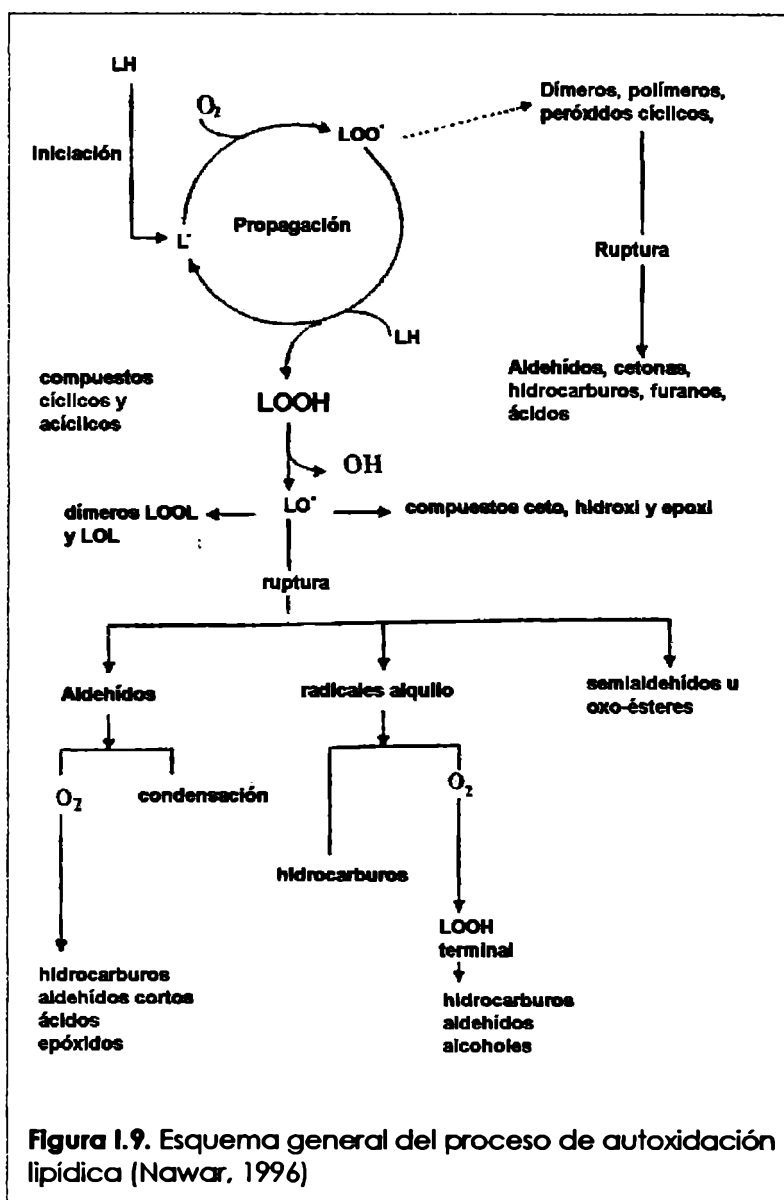
Los hidroperóxidos pueden sufrir reacciones de homólisis catalizada por metales o calor, generando radicales peroxilos y alcoxilos que pueden continuar la cadena complicando el proceso de oxidación, o formar productos finales no radicalarios.

Otras reacciones de terminación involucran la condensación de radicales peroxilos ( $LOO^{\cdot}$ ), alcoxilos ( $LO^{\cdot}$ ) o alquilos ( $L^{\cdot}$ ), siendo dependientes de la presión de oxígeno y de la temperatura. Algunas de estas reacciones se muestran en las ecuaciones (1.5), (1.6) y (1.7).





La **Figura 1.9.** muestra un esquema general del desarrollo del proceso de autoxidación de los lípidos. Como puede observarse, los hidroperóxidos generados por el mecanismo de radicales libres sufren una posterior descomposición, generando una amplia variedad de productos.

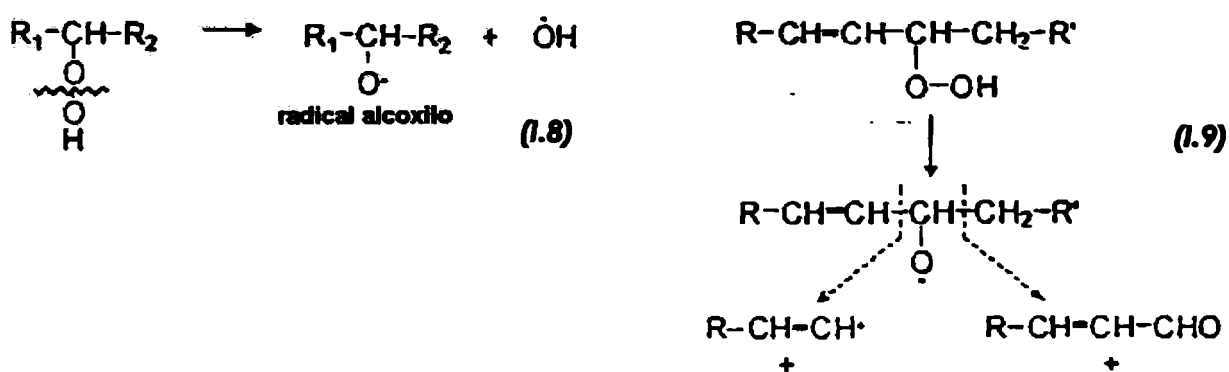


**Figura 1.9.** Esquema general del proceso de autoxidación lipídica (Nawar, 1996)

### Descomposición de los hidroperóxidos

La descomposición de los hidroperóxidos conduce, mediante rutas complejas de reacciones, a la formación de una mezcla de sustancias monoméricas, poliméricas y volátiles de bajo peso molecular (productos secundarios). Cada hidroperóxido produce un conjunto de productos de degradación típicos y específicos, dependiendo de la posición del grupo peróxido en la molécula. Estos productos pueden a su vez, sufrir posteriores oxidaciones y descomposiciones, contribuyendo a un gran pool de radicales libres.

El primer paso en la descomposición de los hidroperóxidos es la ruptura del enlace oxígeno - oxígeno del grupo hidroperóxido para dar un radical alcoxilo y un radical hidroxilo (1.8). A continuación, se rompen los enlaces carbono-carbono a cada lado del grupo alcoxilo (ruptura homolítica); produciendo generalmente un aldehído y un ácido si la ruptura se produce del lado del grupo carboxilo, o un hidrocarburo y un oxoácido cuando se rompe el enlace correspondiente al lado de la cadena hidrocarbonada (1.9). Cuando se forma un radical vinilo (como en la reacción 1.9.), posteriormente se forma un grupo aldehído por reacción con un radical hidroxilo.



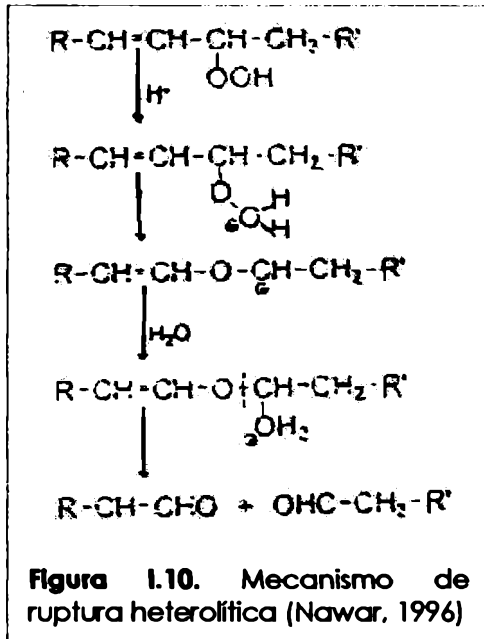
Además de los productos determinados por la ruptura homolítica, pueden aparecer otros compuestos formados a través de diversos mecanismos.

Los radicales alcoxi pueden también generar hidroxiácidos y cetoácidos, así como también epóxidos por reacción con radicales peroxilos.

Los radicales alquilo generados por ruptura homolítica del lado metilo de la cadena pueden combinarse con radicales hidroxilos para dar un alcohol,

perder un hidrógeno para dar un 1-alqueno o peroxidarse para dar un hidroperóxido terminal.

En condiciones específicas, puede producirse una ruptura heterolítica de



los hidroperóxidos, rompiéndose el enlace entre el grupo hidroperóxido y el doble enlace alílico, generando compuestos carbonílicos con mayor selectividad que en el caso de la ruptura homolítica. En la **Figura 1.10** se muestra un posible mecanismo de ruptura heterolítica.

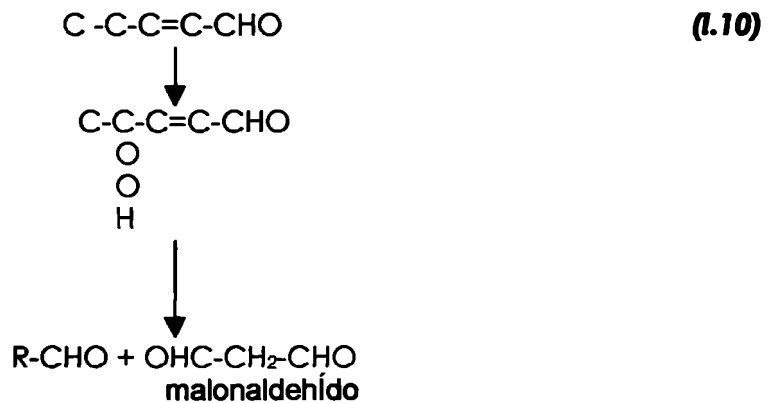
Durante la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados también pueden formarse peróxidos cíclicos, los cuales se descomponen generando una variedad de compuestos.

### Descomposición de los aldehídos

Los aldehídos son los principales compuestos generados durante la oxidación de los lípidos y pueden sufrir, posteriormente, una gran variedad de reacciones de descomposición.

Así, los aldehídos saturados pueden oxidarse para dar los ácidos correspondientes, los cuales pueden participar en reacciones de dimerización y condensación, generando compuestos del tipo trialquiltrioxanos que poseen olores fuertes.

Los aldehídos insaturados pueden sufrir autooxidación por ataque del oxígeno en la posición  $\alpha$ -metilénica, generando hidrocarburos de cadena corta, aldehídos y dialdehídos. Tal es el caso de la formación del malonaldehído, un producto volátil característico de la oxidación de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces (**1.10**).



Por último, durante la oxidación y/o calentamiento de los lípidos ocurren procesos de dimerización y polimerización mediante reacciones entre un doble enlace y un dieno conjugado; combinación de radicales libres y adición de un radical libre a un doble enlace. Los dímeros y polímeros modifican las propiedades físicas de la fase grasa.

### I.II.1.2. Factores que afectan la velocidad de autoxidación lipídica

Diversos factores relacionados con los ácidos grasos presentes, las características físicas y químicas del alimento así como también con la presencia de otros componentes, tienen un efecto sobre el proceso de oxidación lipídica. A continuación se enumeran los principales factores involucrados:

**Composición de los ácidos grasos:** El número, posición y geometría de los dobles enlaces afecta la velocidad de oxidación (Nawar, 1996). Las menores energías de disociación para hidrógenos unidos a carbonos se encuentran entre dobles enlaces adyacentes. Por lo tanto, estos son los sitios más favorecidos termodinámicamente para ser atacados por los radicales peróxilos. A mayor grado de insaturación, la velocidad de oxidación es mayor. Así, se ha comprobado que las velocidades relativas de oxidación están linealmente relacionadas con el número de grupos metileno bis-alfílicos en los ésteres de los ácidos grasos poliinsaturados en sistemas modelo, presentando, por ejemplo, el ácido 22:6 una velocidad 5 veces mayor a la del 18:2 (Crosgrave y col., 1987). Los isómeros *cis* se oxidan más rápidamente que los *trans*. La longitud de la cadena

del ácido graso no tiene efecto aparente en la velocidad o extensión de la formación de radicales.

Por otra parte, los ácidos grasos libres se oxidan a mayor velocidad que los esterificados a glicerol.

**Concentración de oxígeno:** A altas concentraciones de oxígeno (condiciones atmosféricas), la velocidad de oxidación es independiente de la misma; pero a muy bajas concentraciones la velocidad es aproximadamente proporcional a esta variable (Davidovich y col., 1980). La influencia de la concentración de oxígeno se ve afectada por otros factores tales como la temperatura y el área superficial.

**Temperatura :** La velocidad de las reacciones asociadas con la oxidación lipídica aumenta con el aumento de la temperatura. La temperatura ejerce efecto sobre la presión parcial de oxígeno así como también sobre la solubilidad del oxígeno, disminuyéndola.

**Area superficial:** La velocidad de oxidación se incrementa proporcionalmente con el área superficial de los lípidos expuesta.

**Humedad:** En alimentos con muy baja actividad acuosa ( $a_w$  menor que 0,1) la oxidación ocurre a alta velocidad. Al aumentar  $a_w$  hasta aproximadamente 0,3, la velocidad disminuye alcanzando un mínimo y aumentando nuevamente a mayores  $a_w$  (Labuza y col., 1972). La baja velocidad de oxidación con bajos contenidos de agua es atribuida a una reducida actividad catalítica de los metales, a quenching de los radicales libres y/o falta de acceso del oxígeno a los lípidos.

**Otros factores relacionados con el estado de los lípidos:** Se ha determinado que la velocidad de oxidación puede estar influenciada por factores tales como la orientación molecular, el estado físico, la presencia de una emulsión y la movilidad molecular.

**Pro-oxidantes:** Los metales de transición son los principales factores catalizadores de la oxidación lipídica en los sistemas biológicos. El hierro en particular es un buen catalizador, pudiendo actuar en forma no-hemo y en forma de grupo hemo contenido en distintas proteínas.

**Energía radiante:** tanto la radiación visible, ultravioleta como gamma son promotoras de la oxidación.

**Antioxidantes:** son sustancias naturalmente presentes o agregadas en los alimentos y en los organismos vivos en concentraciones mucho menores a la del sustrato oxidable, que pueden retrasar o prevenir la oxidación de ese sustrato (Shahidi, 1997). Este tema será desarrollado más ampliamente posteriormente.

### **1.11.1.3. Métodos de determinación de la oxidación lipídica**

Dada la gran diversidad de productos generados por la oxidación de los lípidos y la importancia de este proceso en la aceptabilidad y calidad nutricional de los alimentos, se han desarrollado muchos métodos para el seguimiento de la oxidación. Sin embargo, ninguno de ellos es capaz de determinar todos los eventos de la oxidación, siendo cada uno apropiado para evaluar una etapa del proceso.

De esta manera, existen métodos que determinan productos primarios de la oxidación lipídica, otros que determinan productos secundarios e incluso otros evalúan productos terciarios, lo cual será desarrollado en la próxima sección. Dada la diversidad de métodos, no serán todos descritos, haciendo solo una mención de los más utilizados y desarrollando más ampliamente el método a ser empleado en este trabajo.

Dentro de los métodos que determinan productos primarios puede mencionarse el *Índice de peróxido*, el cual es aplicable al seguimiento de la formación de peróxidos en las primeras etapas de la oxidación donde dichos compuestos alcanzan un máximo, disminuyendo luego. Es un método altamente empírico y dependiente del procedimiento empleado.

La determinación de *Dienos conjugados* (hidroperóxidos) es un método sensible para el seguimiento de los primeros estadios de la oxidación, donde los hidroperóxidos no han sufrido aún una importante descomposición. En estados más avanzados de la oxidación, los hidroperóxidos se descomponen en productos secundarios que pueden ser determinados por otros ensayos.

Los productos secundarios de la oxidación pueden ser medidos a través de diferentes metodologías. Los *Compuestos carbonílicos totales* se determinan mediante la formación de sus hidrazonas; mientras que otros métodos evalúan algunos compuestos carbonílicos específicos. Entre ellos pueden mencionarse el *Test de anisidina* (evalúa principalmente 2-alquenes), el *Test de Kreis* y el *Ensayo de TBA* que será descrito posteriormente.

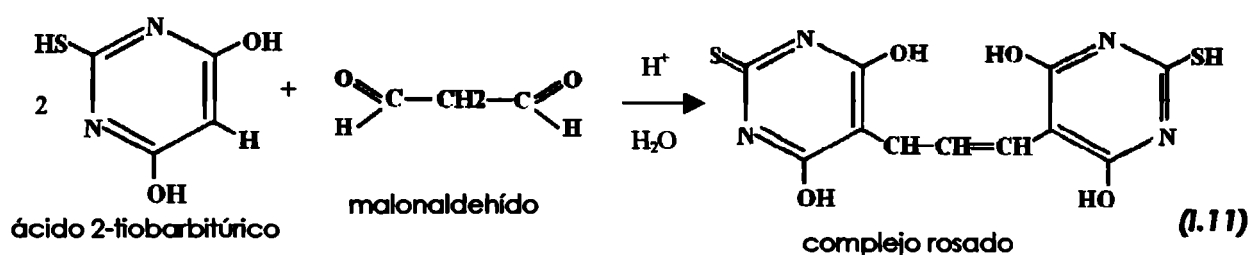
Los productos de oxidación volátiles responsables del desarrollo del flavor asociado a la oxidación lipídica pueden ser determinados mediante  *cromatografía gaseosa*. Este tipo de análisis, además de correlacionar con los análisis sensoriales, constituyen métodos sensibles que detectan bajos niveles de oxidación en diferentes sustratos. Pueden utilizarse diversas metodologías (inyección directa, espacio de cabeza estático o dinámico) (Frankel, 1998), lo cual lleva a diferencias en los perfiles de compuestos volátiles obtenidos. Los compuestos comúnmente determinados mediante estos métodos son: pentano, pentanal, hexanal, 2-heptenal, 2,4 heptadienal, nonanal, 2,4 decadienal y otros.

Por último, no se deben dejar de mencionar los *Métodos sensoriales*. En sus distintas modalidades (paneles entrenados y paneles de consumidores), en algunos casos pueden ser capaces de identificar alteraciones del flavor o el olor que no pueden ser detectados por los métodos objetivos o los análisis instrumentales. La puntuación obtenida a través de estos métodos puede ser correlacionada con los resultados de otros ensayos de oxidación lipídica.

### ***Ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)***

El ensayo de TBA es un método ampliamente utilizado para medir rancidez oxidativa en alimentos y en otros sistemas biológicos, siendo especialmente útil para determinar la evolución de la oxidación lipídica en función de la aplicación

de diferentes procesamientos. El ensayo se basa en la determinación de la concentración de compuestos de color rosado formados entre el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) y productos secundarios de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Frankel, 1998). La reacción no es específica pudiendo involucrar a una serie de compuestos, por lo cual se habla de "sustancias reactivas al TBA" (TBARS). Dentro de estos compuestos, el más importante y estudiado es el malonaldehído (MDA), el cual reacciona con el TBA según la siguiente ecuación química (Sinnhuber y col., 1958):



La formación del complejo coloreado (máxima absorción entre 532 y 535 nm) se encuentra influenciada por una serie de factores, tales como la temperatura y tiempo de calentamiento, pH, presencia de iones metálicos y antioxidantes. El calentamiento y el medio ácido parecen ser esenciales para la liberación del malonaldehído de precursores (por ejemplo unión a proteínas), para la condensación con el TBA y para el máximo desarrollo del color (Hoyland y Taylor, 1991).

El ensayo de TBA ha sido llevado a cabo de acuerdo con diversas metodologías:

- a. Por calentamiento directo de la muestra con TBA seguido de separación del complejo rosado producido por centrifugación (Sinnhuber y col., 1958; Uchiyama y Mihara, 1978; Pokorny y Dieffenbacher, 1989).
- b. Por destilación de la muestra seguida de reacción del destilado con el TBA (Tarladgis y col, 1960; Rhee, 1978; Yamauchi y col., 1982; Ke y col, 1984).
- c. Por extracción de la fracción lipídica de la muestra con solventes orgánicos y reacción del extracto con el TBA (Pikul y col, 1983, 1989).



- d. Por obtención del líquido exudado desproteneizado del músculo y posterior determinación del número de TBA mediante la reacción de Matsushita (Tomás y Funes, 1987; Tomás, 1988).
- e. Por extracción del malonaldehído usando una solución de ácido tricloroacético (Witte y col., 1970; Vyncke, 1970; Sinnhuber y Yu, 1977; Siu y Draper, 1978); o una solución de ácido perclórico (Salih y col., 1987; Pikul y col., 1989).

Los métodos de calentamiento directo y de destilación pueden formar malonaldehído y otras sustancias reactivas adicionales a través de la degradación de hidroperóxidos durante el análisis (Hoyland y Taylor, 1991). La obtención del exudado presenta ventajas frente a estos métodos dado que no utiliza condiciones drásticas durante el ensayo. En el caso de los métodos que involucran extracción de los lípidos, el malonaldehído preformado presente en la fase acuosa de la muestra no es detectado (Raharjo y col., 1993).

El método de extracción ácida emplea condiciones más suaves y no se aplica calentamiento a la muestra, lo cual minimiza la formación de sustancias reactivas adicionales.

Diferentes autores han propuesto distintos tiempos y temperaturas de reacción (desde temperatura ambiente hasta baño de agua en ebullición). En un estudio de las condiciones óptimas, Botsoglou y col. (1994) informaron que éstas corresponderían a un calentamiento de 30 minutos a 70 °C.

### **1.11.2. Importancia de la oxidación lipídica en pescado**

Los lípidos de pescado son muy susceptibles a la oxidación por contener una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados, tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Frankel, 1998). El pescado contiene también prooxidantes que generan radicales libres lipídicos iniciadores así como también antioxidantes naturales, los cuales son influenciados por una diversidad de factores.

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ 3 produce compuestos volátiles. El deterioro del flavor por oxidación lipídica en pescado es una de las

principales causas de pérdida de calidad durante el procesamiento y almacenamiento del pescado. El olor y flavor característico del pescado oxidado se debe a una mezcla de aldehídos, tales como el 2-pentenal, 2-hexenal, 4-heptenal, 2,4-heptadienal y 2,4,7-decatrienal.

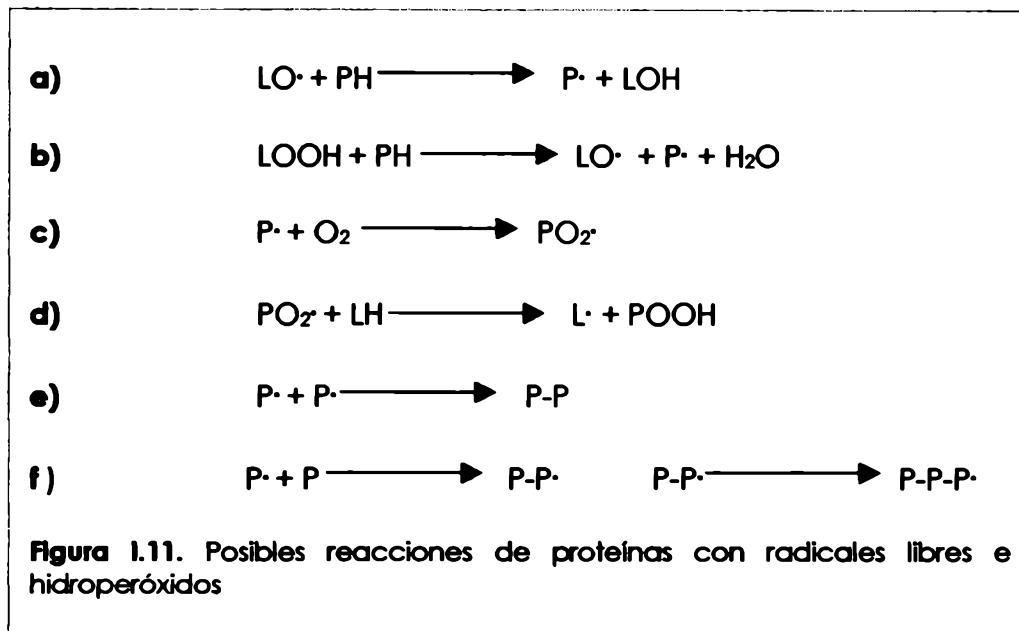
### **I.II.3. Interacción de los productos de oxidación lipídica con proteínas**

La rancidez oxidativa desarrollada en los alimentos provoca cambios en la calidad de los mismos que afectan su flavor, olor, sabor, color, textura, propiedades funcionales y nutricionales. Los productos provenientes de la oxidación -tanto los primarios como los secundarios- pueden reaccionar con otros constituyentes tales como proteínas, péptidos, aminoácidos libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Frankel, 1998; Aubourg, 1999a). Dichas reacciones son muy importantes por sus consecuencias en el deterioro de la calidad de los alimentos, en particular, las reacciones con proteínas son relevantes en alimentos ricos en las mismas tal como pueden ser los productos de origen marino.

#### **I.II. 3.1. Mecanismos de Interacción lípidos oxidados - proteínas**

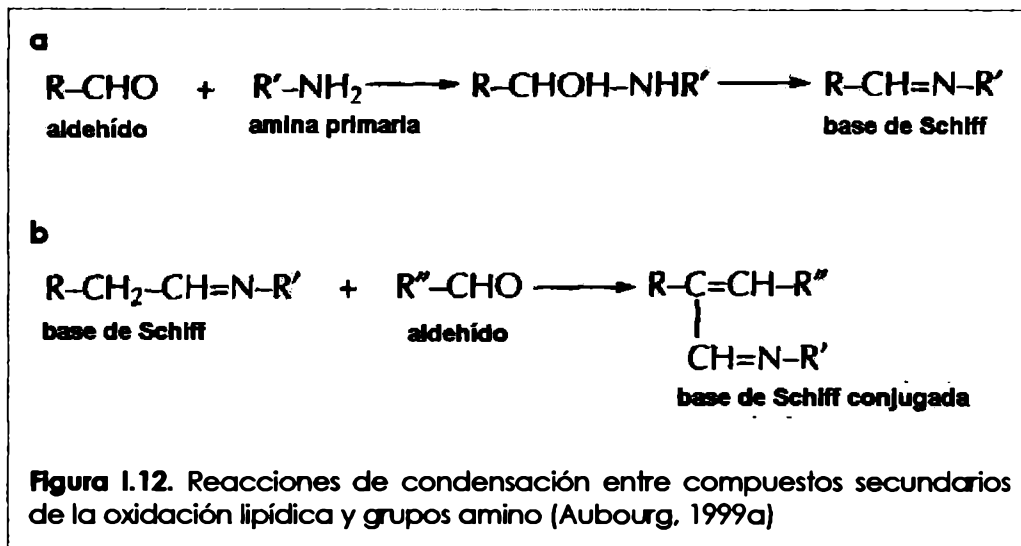
Se han descrito dos tipos de reacciones posibles que provocan daño en las proteínas por parte de los lípidos oxidados:

**1. Reacciones que involucran formación de radicales libres proteicos.** Los radicales peroxilos son muy reactivos con aminoácidos tales como triptofano, histidina, cisteína, cistina, metionina, lisina y tirosina, los cuales pueden sufrir decarboxilación, decarbonilación y deaminación (Frankel, 1998). Por otra parte, los radicales libres así como los hidroperóxidos pueden reaccionar con las cadenas laterales de las proteínas produciendo radicales libres proteicos (P•) (**Figura I.11.- reacciones a y b**). Estos radicales libres pueden incorporar oxígeno para formar radicales peroxi (**Figura I.11.- reacción c**), los cuales pueden sustraer un hidrógeno de otra molécula de lípido con la formación de un hidroperóxido proteico (**Figura I.11.- reacción d**). Los hidroperóxidos proteicos pueden



descomponerse, dando productos con estructura carbonilo. Por otra parte, los radicales libres proteicos pueden recombinarse entre sí o con otras moléculas de proteínas con la consecuente formación de dímeros u oligómeros mayores (**Figura 1.11.- reacción e y f**) así como también pueden copolimerizar con radicales libres lipídicos. Otras consecuencias de la reacción de radicales libres con proteínas son la escisión proteica y la modificación química de las cadenas laterales con un cambio en la carga eléctrica de la proteína (Chio y Tappel, 1969a; Karel, 1973; Pokorny y col., 1993); un cambio químico en las cadenas laterales puede hacer a la proteína menos estable y más susceptible a la desnaturalización que la estructura nativa.

**2. Reacciones de condensación con productos secundarios de la oxidación lipídica.** Los aldehídos, dialdehídos y epóxidos derivados de la descomposición de hidroperóxidos pueden reaccionar con grupos amino para formar un aducto denominado base de Schiff (**Figura 1.12 - reacción a**). Las bases de Schiff pueden reaccionar nuevamente, produciendo por condensación aldólica dímeros y complejos de alto peso molecular (**Figura 1.12 - reacción b**). En las bases de Schiff conjugadas producidas, el sistema de dobles enlaces conjugados se ha extendido, lo cual genera un incremento en la intensidad del color de dichas



moléculas (*browning*) (Aubourg, 1999a). Dichos compuestos presentan, además, espectros de fluorescencia característicos.

Las bases de Schiff pueden ser formadas también por reacción de un hidroperóxido lipídico y una amina primaria.

Los primeros estudios acerca de la formación de compuestos de interacción fluorescentes fueron realizados en tejidos vivos, donde se estudió la lipofucsina o "pigmentos de la edad". Chio y Tappel (1969b) propusieron la interacción de dos moléculas de aminoácidos con una molécula de malonaldehído (MDA) para formar una base de Schiff conjugada responsable de la fluorescencia de pigmentos encontrados en tejidos humanos y animales (lipofucsina), y que son considerados indicativos de procesos degenerativos de las células como envejecimiento, stress ambiental y deficiencia de vitamina E (Tappel, 1980). Nair y col. (1981, 1986) informaron acerca de la dificultad de obtener el fluoróforo en cuestión partiendo de MDA puro y compuestos amino. Posteriormente, se encontró evidencia acerca de la importancia de otros compuestos carbonílicos en la formación de las bases de Schiff responsables de la fluorescencia, sugiriendo la participación de 4-hidroxinonal y otros aldehídos reactivos similares (Tsuchida y col, 1985).

La determinación de compuestos fluorescentes ha sido empleada para evaluar la oxidación lipídica en alimentos. Para ello, se utilizaron diferentes clases de muestras: extractos orgánicos, extractos acuosos, ambos a la vez y muestras

sólidas. Los extractos orgánicos han sido empleados para estudiar el daño en tejidos vivos, donde estarían involucrados los fosfolípidos de membrana formando un complejo insoluble en agua. También se han utilizado este tipo de extractos para el seguimiento de la oxidación en leche (Bouzas y col., 1985) y en aceites de fritura (Miyagawa y col., 1991). Cuando en la formación de los compuestos de interacción se encuentran involucrados grupos amino proteicos, las sustancias fluorescentes quedan unidas a la fracción proteica y no pueden ser extraídas con solventes orgánicos, sino con solventes acuosos. Por lo tanto, la naturaleza polar o no polar de los compuestos fluorescentes dependerá de cuál es el compuesto donador de grupos amino (Aubourg, 1999a).

Kamarei y Karel (1984) desarrollaron un método para medir compuestos fluorescentes en carne liofilizada, a partir de extractos orgánicos (cloroformo: metanol, 2:1). Estos autores encontraron tres picos de excitación con máximos a 308, 318 y 350 nm respectivamente, cuyas intensidades variaron en función de la extensión de la oxidación. Así, a medida que la oxidación progresó, la intensidad registrada a 318 nm disminuyó y a 350 nm aumentó. Este corrimiento en los máximos fue utilizado como un "estándar interno" para evaluar el grado de oxidación. En cuanto a los espectros de emisión, el máximo se desplazó de 476 a 460 nm a medida que se incrementó la oxidación. La relación entre la intensidad de emisión y la intensidad de excitación a 318 nm fue utilizada como otro índice de oxidación.

Por otra parte, se han determinado productos fluorescentes en las fases orgánica y acuosa obtenidas mediante el método de Folch en carne de pollo. En este caso, se utilizó una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm (Pikul y col., 1984).

En la literatura, se encuentran diversos trabajos relacionados con la determinación de compuestos fluorescentes en pescado. Davis (1982) determinó la fluorescencia de muestras sólidas y líquidas (exudado de músculo y extractos acuosos), observando dos emisiones diferentes a lo largo del almacenamiento congelado del músculo de pescado. Estas emisiones de fluorescencia se encontrarían relacionadas con compuestos carbonílicos procedentes de la oxidación lipídica y, por otra parte, formaldehído producido por la degradación

del óxido de trimetilamina en aquellos tejidos que contienen las enzimas capaces de producirlo (Davis y Reece, 1982). La determinación de compuestos de interacción fluorescentes ha sido utilizada para evaluar el deterioro oxidativo en pescado grasos secos (Smith y col., 1990), mientras que técnicas de espectrofluorimetría en muestras sólidas se emplearon en carne de pescado liofilizada (Hasegawa y col., 1992).

Las fases orgánica y acuosa provenientes de una extracción mediante el método de Bligh y Dyer (1959), han sido ampliamente utilizadas en la determinación de compuestos fluorescentes para evaluar la calidad del pescado. Los compuestos fluorescentes formados en los primeros estadios de interacción dan lugar a otros compuestos que se visualizan a mayores longitudes de onda (Aubourg, 1999a). Este corrimiento fue medido en ambas fases como la relación ( $\delta F$ ) entre dos máximos de excitación/emisión. El corrimiento batocrómico está de acuerdo con la teoría general de una formación progresiva de bases de Schiff y otros compuestos de interacción, incrementándose los pesos moleculares y el número de enlaces insaturados. Diversos estudios se han focalizado en correlacionar dicho corrimiento con otros índices de calidad durante diversos procesamientos de pescado, tales como refrigeración de pescados grasos (Aubourg y col., 1997) y magros (Aubourg y col., 1998); congelación y almacenamiento congelado (Aubourg y col., 1998); cocción (Aubourg y col., 1995) y en conservas (Aubourg y Medina, 1997).

La interacción entre lípidos oxidados y proteínas afecta la calidad nutricional y sensorial de los alimentos. Así, ha sido posible observar una disminución en el valor biológico de las proteínas dada por la reacción con grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina, oxidación del grupo -SH de la metionina y cambios en otros aminoácidos; cambios en la digestibilidad, disminuyendo la velocidad de lipólisis por lipasas y de proteólisis por proteasas digestivas. Por otra parte, entre las modificaciones sensoriales pueden mencionarse: cambios en el flavor por unión de sustancias provenientes de la oxidación relacionadas con esta característica - por ejemplo aldehídos- con proteínas; cambios en el color fundamentalmente debidos al "browning" y cambios en la textura debidos al entrecruzamiento de las cadenas polipeptídicas (Pokorny y col., 1993; Aubourg, 1999a).

#### **I.II.4. Antioxidantes naturales**

La oxidación de los lípidos es un problema que afecta no sólo las propiedades funcionales, sensoriales y nutricionales de los alimentos como se ha mencionado previamente, sino que también tiene importantes efectos en el organismo humano. Los radicales libres, particularmente los radicales hidroxilos, pueden afectar las membranas lipídicas para producir peróxidos y especies reactivas al oxígeno, las cuales se vinculan con una variedad de enfermedades y daño a distintos tejidos (ateroesclerosis, sistema cardiovascular y corazón, riñones, hígado, pulmones y otros) y con la aceleración del proceso de envejecimiento (Shahidi,1997). Los productos secundarios también son altamente reactivos. El malonaldehído y el 4-hidroxinonal pueden reaccionar con proteínas y con el DNA. La reacción con DNA ha sido vinculada con procesos de mutagénesis, citotoxicidad y carcinogenesis (Pearson y col., 1983; Shahidi, 1997), mientras que la reacción con proteínas es responsable de la formación de los pigmentos de la edad o lipofucsina como se mencionó anteriormente. Dichos compuestos se forman por peroxidación de los lípidos de las membranas subcelulares y se acumulan en diversos tejidos animales tales como cerebro y corazón (Tappel, 1980).

Dadas las consecuencias negativas de la oxidación lipídica, la incorporación de antioxidantes sintéticos es utilizada en el procesamiento de diversos alimentos. Entre ellos, los más empleados han sido butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxianisol (BHA) y ter-butil hidroquinona (TBHQ). Con el incremento del interés por la seguridad de los aditivos alimentarios, estos antioxidantes han sido estudiados habiéndose comprobado que poseen actividad carcinogénica (Wu y col., 1982; Lindberg Madsen y Bertelsen, 1995). En función de estas observaciones, y del interés de los consumidores por reducir el consumo de aditivos químicos, la demanda de antioxidantes se ha orientado hacia el empleo de productos naturales.

Dentro de los antioxidantes naturales se incluyen diversos grupos de compuestos tales como fenoles y polifenoles, quelantes, vitaminas y enzimas, carotenoides y carosina. En la **Tabla I.3** se encuentran algunos de los

compuestos antioxidantes naturales más importantes con sus fuentes principales de obtención (Shahidi, 1997).

**Tabla 1.3. Compuestos antioxidantes naturales y sus fuentes**

Compuestos antioxidantes	Fuentes
Vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles)	Semillas de oleaginosas, aceite de palma, huevos, granos, lácteos, etc
Vitamina C	Frutas y vegetales (berries, citrus, papas, ajíes verdes, etc)
Carotenoides	Zanahorias, tomates, citrus, aceite de palma, etc.
Flavonoides e isoflavonas	Frutas y vegetales (berries, ajíes, citrus, crucíferas, tomates, cebollas, etc), semillas de oleaginosas tal como la soja
Ácidos fenólicos y derivados	Semillas de oleaginosas y ciertos aceites, cereales, granos
Catequinas	Té verde, berries, ciertas semillas de oleaginosas, etc
Extractos	Té verde, romero, salvia, orégano, tomillo, etc

Desde la época prehistórica, las especias e hierbas han sido utilizadas no solamente para aromatizar y saborizar los alimentos, sino por sus propiedades antisépticas y medicinales, sugiriendo, dadas sus propiedades preservativas, la presencia, en estos productos, de constituyentes con actividades antioxidantes y antimicrobianas en estos productos (Nakatani, 1997).



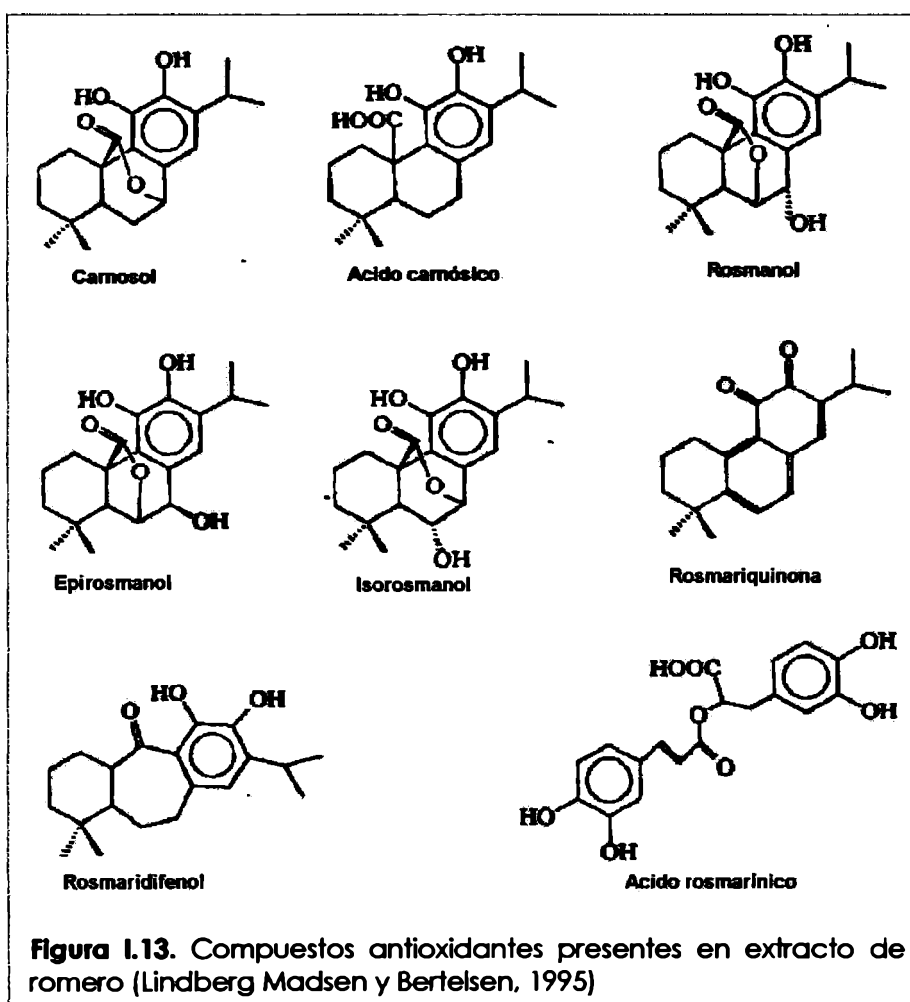
*Rosmarinus Officinalis* (romero)

Diversas investigaciones han demostrado que el romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y la salvia (*Salvia officinalis* L.) son dos de las especias más potentes como antioxidantes (Lindberg Madsen y Bertelsen, 1995). Ambas especies contienen compuestos comunes, tales como el carnosol (una lactona diterpénica



fenólica) y el ácido carnósico. A partir de romero, se han aislado además otros compuestos tales como el rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, ácido rosmarínico, rosmaridifenol y rosmariquinona, ácido ursólico y ácido betulínico.

En la **Figura I.13.** se muestran los constituyentes del romero que poseen actividad antioxidante. Los diterpenos fenólicos, carnosol y ácido carnósico, dan cuenta de una alta proporción (cerca al 90 %) de dicha actividad en los extractos comerciales de romero (Bracco y col., 1981; Offord y col., 1997).



Los antioxidantes pueden actuar a distintos niveles de la secuencia de reacciones de oxidación: 1) disminuyendo la concentración de oxígeno, 2) interceptando al oxígeno singlete, 3) secuestrando radicales libres tales como los radicales hidroxilo, 4) uniéndose a metales catalizadores, 5) descomponiendo productos primarios a compuestos no radicalarios y 6) interrumpiendo la cadena

de iniciación o propagación transfiriendo átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos (L·) y peróxidos (LOO·) (Shahidi, 1997; Frankel, 1998).

Los compuestos fenólicos son efectivos antioxidantes donadores de átomos de hidrógeno, produciéndose radicales del antioxidante no reactivos. Dichos radicales son estabilizados por deslocalización electrónica de sus estructuras fenoxilo, estando la actividad del antioxidante directamente relacionada con la estabilización por resonancia de dichas estructuras (Frankel, 1998). Tanto el carnosol como el ácido carnósico son buenos secuestradores de radicales peróxidos. La metilación de los grupos hidroxilos elimina la actividad antioxidante, indicando que estos grupos son los responsables de dicha actividad (Lindberg Madsen y Bertelsen, 1995). Un mecanismo de transferencia de hidrógeno también ha sido comprobado en el caso de la rosmariquinona (Hall y col., 1998).

Existe una variedad de productos comerciales conteniendo extracto de romero, en forma de líquidos, pastas o polvos, algunos de ellos son solubles en aceites, otros son dispersables en agua. Estos extractos pueden obtenerse utilizando distintos solventes tales como metanol, etanol, acetona, hexano y dióxido de carbono (extracción supercrítica) (Lindberg Madsen y Bertelsen, 1995). Se han desarrollado además, extractos de romero refinados, en los cuales se eliminan los problemas de olor, sabor y color. Durante los procesos que implican calor y uso de solventes, puede producirse una considerable conversión de ácido carnósico a carnosol.

Por otra parte, se ha evaluado la actividad antioxidante de los extractos en diversos sustratos tanto animales como vegetales (sistemas modelo y ensayos de almacenamiento), ya que las primeras investigaciones realizadas por Chipault y col. (1952) mostraron que la actividad antioxidante de la hierba era dependiente del sustrato utilizado en la evaluación. Tanto los extractos de romero como el ácido carnósico y el carnosol aislados han demostrado inhibir efectivamente la formación de peróxidos en aceite de maíz, soja, maní y pescado. Sin embargo, dichos compuestos fueron inactivos o promovieron la oxidación en las correspondientes emulsiones de aceites vegetales en agua, pero tuvieron efectos antioxidantes en emulsiones de aceite de pescado. Dicho comportamiento

puede ser explicado en base a la actividad superficial de los compuestos antioxidantes, los cuales presentan carácter hidrofílico (Frankel, 1998).

Se han realizado diversos estudios sobre la capacidad antioxidante del extracto de romero en diferentes sistemas cárneos sometidos a distintas condiciones de almacenamiento (Lindberg Madsen y Bertelsen, 1995). En la **Tabla I.4.** se presentan algunos ejemplos. Sin embargo, no se encuentran en la literatura suficientes trabajos acerca de la acción de este antioxidante en músculo de pescado.

**Tabla I.4.** Aplicación de romero como antioxidante en diferentes productos cárneos

Producto antioxidante	Tipo de alimento	Condiciones de almacenamiento	Reducción en el N° de TBA (%)
Oleoresina	Carne vacuna cruda molida	-20 °C, 6 meses	39
	Carne vacuna cocida molida	4 °C, 6 días	14
	Carne de pollo molida	4 °C, 6 días	11
	Carne de pollo molida	-20 °C, 6 meses	1
	Salchichas	-18 °C, 20 días	46
	Hamburguesas cocidas	4 °C, 2 días	31
Extracto	Salchichas	4 °C, 18-35 días	0-72
	Hamburguesas cocidas	4 °C, 2 días	56
	Carne cocida	4 °C, 5 días	35

## II. Objetivos



## II. OBJETIVOS

*Dada la relevancia del proceso de oxidación lipídica en sustratos ricos en ácidos grasos poliinsaturados tal como los lípidos de pescado, es importante estudiar dicho proceso y sus consecuencias sobre la fracción lipídica, así como sobre otros componentes del músculo. El salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*) es una especie pesquera local muy valorada por la calidad de su carne que no ha sido suficientemente estudiada, por lo cual se propone desarrollar la temática citada en esta especie.*

### **Objetivo general**

Evaluar el desarrollo del proceso de oxidación lipídica y su influencia sobre otros constituyentes musculares de salmón de mar tales como las proteínas musculares

Se proponen como **objetivos específicos**:

- Analizar la interacción de uno de los principales productos de oxidación lipídica -malonaldehído- con las proteínas miofibrilares aisladas de músculo de salmón de mar en un **sistema modelo**, en condiciones que propicien dicha interacción.
- Analizar los cambios en la calidad del músculo de salmón de mar durante el **almacenamiento refrigerado**, particularmente aquéllos relacionados con la oxidación lipídica y sus consecuencias sobre otros constituyentes tales como las proteínas.
- Analizar los cambios en la calidad del músculo de salmón de mar durante el **almacenamiento en estado congelado**, particularmente aquéllos

relacionados con la oxidación lipídica y sus consecuencias sobre otros constituyentes tales como las proteínas.

- Evaluar el efecto del agregado de extracto de romero como **antioxidante** de origen natural al músculo almacenado en estado congelado y refrigerado.
- Correlacionar las modificaciones registradas en el sistema real (músculo) refrigerado y congelado con los resultados obtenidos en los sistemas modelo.

# III. Desarrollo Experimental



# Capítulo 1.

## Sistemas Modelo





## 1.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Como se comentó en la **Introducción General** de este trabajo, las proteínas pueden ser alteradas por productos de la oxidación lipídica a través de dos tipos de interacciones: reacciones con productos intermedios inestables tales como radicales libres e hidroperóxidos y reacciones con productos secundarios.

Se han realizado numerosos estudios en sistemas modelo para obtener información acerca de estas interacciones, en algunos casos a través de la exposición de diversas proteínas a sistemas generadores de radicales libres y en otros, incubándolas en presencia de productos secundarios, principalmente malonaldehído obtenido químicamente, o de ácidos grasos en condiciones que favorecieran su oxidación. Este tipo de sistemas es muy útil ya que, por una parte, simplifica mucho el sistema real aislando los componentes y reacciones que se quieren analizar y por otra, permite obtener resultados de manera más rápida ya que pueden utilizarse condiciones que facilitan la realización de ensayos acelerados.

Las proteínas miofibrilares son componentes muy importantes del músculo, susceptibles de sufrir reacciones oxidativas. Decker y col. (1993) analizaron el daño oxidativo producido en miofibrillas de músculo blanco de pavo expuestas a la acción de sales de hierro, cobre y ascorbato. Así, dichas proteínas mostraron alteración de su conformación, incremento del contenido de grupos carbonilos, pérdida de solubilidad, reducción de la capacidad para formar geles y de la capacidad de retener agua, y formación de polímeros proteicos constituidos principalmente por actina y miosina. Srinivasan y Hultin (1995) utilizaron un sistema basado en la enzima xantina oxidasa para generar radicales libres hidroxilos en músculo de bacalao; los resultados obtenidos fueron una disminución de la solubilidad de las miofibrillas oxidadas luego de un ciclo de congelación/descongelación y de una disminución del pH, además de la aparición de una banda de alto peso molecular por SDS-PAGE. Estos mismos autores (1997) utilizaron un sistema generador de radicales libres no enzimático (hierro férrico, peróxido de hidrógeno y ácido ascórbico) en músculo de bacalao; obteniendo una disminución de la solubilidad proteica, pérdida de grupos

sulfhidrilos y formación de puentes disulfuro con producción de fracciones de alto peso molecular. De la misma manera, Li y King (1996) observaron disminución de la actividad ATPasa y cambios conformacionales, mientras que Liu y Xiong (2000) determinaron cambios en la desnaturalización de las proteínas modificadas.

Los primeros trabajos que analizaron la interacción entre malonaldehído (MDA) y otros componentes presentes en los alimentos datan de los años 1960. Poco tiempo antes se había reconocido al MDA como un producto de la autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Sinnhuber y col., 1958).

En solución acuosa, el MDA presenta un equilibrio tautomérico ceto-enol dependiente del pH; a pH por encima de 6,5 se encuentra totalmente en su forma de anión enolato (Kwon y col., 1965). Estos autores fueron unos de los primeros en estudiar la reactividad del MDA con otros constituyentes de los alimentos. A partir de sistemas constituidos por MDA y distintas fracciones proteicas (proteínas musculares de pollo y pescado solubles en agua, aldolasa y miosina de pescado) pudieron aislar productos resultantes de la unión del MDA con las proteínas. Posteriormente, Buttkus (1967) estudió específicamente la interacción entre MDA y miosina de trucha, demostrando que el MDA podía reaccionar con los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina, siendo la velocidad de reacción dependiente de la temperatura. Dicha reacción ocurrió también a temperaturas de congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) a una velocidad similar a la presentada a temperatura ambiente. El autor atribuye este hecho a un efecto de aumento de concentración de los reactivos por la congelación del solvente y a un efecto catalizador que involucra la estructura del hielo.

Chio y Tappel (1969b) propusieron un mecanismo para esta reacción que resulta en la formación de N,N'-disustituido 1-amino-3-iminopropeno, ocurriendo posteriormente un entrecruzamiento.

Por otra parte, fue demostrado que el MDA podía reaccionar con otros residuos de aminoácidos además de la lisina, tales como la histidina, arginina, tirosina y metionina (Buttkus, 1967; Braddock y Dugan, 1973). Estas reacciones llevan a la formación de compuestos del tipo bases de Schiff solubles y son responsables tanto de la formación de compuestos fluorescentes como de entrecruzamiento de las proteínas.

Estudios realizados en sistemas modelo constituidos por MDA y el subfragmento 1 de miosina de conejo, mostraron que el MDA se asocia con la proteína disminuyendo su actividad  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa y causando su desnaturalización con pérdida de la estructura secundaria (menor contenido de  $\alpha$ -hélice y estructuras  $\beta$  y mayor contenido de estructura al azar), formación de entrecruzamientos y polimerización (Li y King, 1999).

En función de los antecedentes comentados, se propone *analizar la interacción del malonaldehído con las proteínas miofibrilares aisladas de músculo de salmón de mar en un **sistema modelo**, evaluando aspectos estructurales, funcionales y nutricionales relacionados con dicha interacción.*

## 1.2. MATERIALES Y METODOS

### 1.2.1. Material utilizado

Este estudio fue realizado con filetes de salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*) en estado fresco adquiridos en el mercado local. Los ejemplares, provenientes del puerto de Mar del Plata (Pcia. de Buenos Aires), fueron capturados por barcos de media altura habiendo sido mantenidos en hielo hasta su llegada al laboratorio.

### 1.2.2. Preparación de los Sistemas Modelo

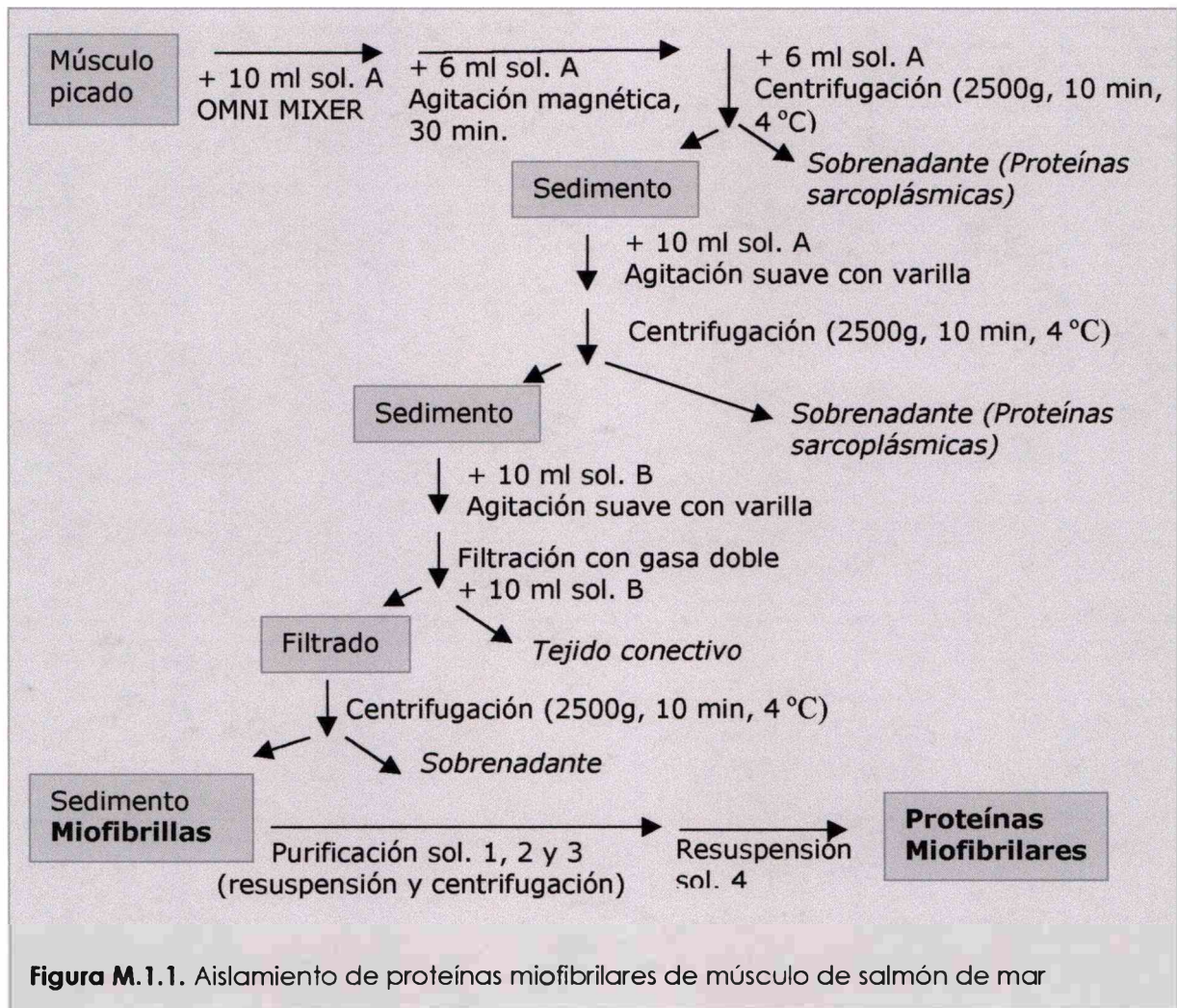
#### 1.2.2.1. Aislamiento de proteínas miofibrilares de salmón de mar

Se aislaron proteínas miofibrilares de músculo de salmón de mar, según el procedimiento de Goll y Robson (1967) modificado por Wagner y Añón (1985). Para ello, se picaron los filetes para obtener un "pool" representativo a partir del cual se tomaron muestras de 3,00 a 4,00 g las cuales fueron procesadas de acuerdo al esquema presentado en la **Figura M.1.1**.

Cada muestra fue homogeneizada con 10,0 ml de una solución buffer compuesta por sacarosa 0,25 M, EDTA 1mM, Tris (hidroximetil aminometano)-HCl 0,05 M, pH 7,0 (solución A) en un homogeneizador OMNI MIXER Sorvall. El extracto obtenido fue agitado lentamente con un agitador magnético durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 2500 g durante 10 min a 4 °C en una centrífuga Sorvall. Se descartó el sobrenadante conteniendo las proteínas sarcoplásmicas. El precipitado fue resuspendido con 10,0 ml de solución A, agitándose suavemente y se centrifugó a 2500g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue separado del sedimento, el cual se trató con una solución buffer conteniendo EDTA 1 mM, Tris-HCl 0,05 M, pH 7,0 (solución B). La suspensión resultante se filtró a través de una gasa doble a efectos de separar el tejido conectivo y posteriormente se centrifugó a 2500 g (10 min., 4 °C). Las miofibrillas presentes en el sedimento fueron resuspendidas en buffer con KCl 0,15 M, Tris-HCl 0,03 M, pH 7,0 (solución 1), se centrifugaron y purificaron mediante dos pasos sucesivos de resuspensión y

posterior centrifugación en solución de EDTA 1mM, pH 7,0 (solución 2) y agua bidestilada (solución 3), respectivamente. Finalmente, se solubilizaron con distintos volúmenes de buffer KCl 0,6 M, Tris-HCl 0,03 M, pH 7,00 (solución 4) de acuerdo a la concentración de proteínas miofibrilares deseada. Cabe señalar, que durante todo el procedimiento se trabajó en baño de hielo a fin de evitar alteraciones de las proteínas por efecto térmico.

La concentración de las proteínas miofibrilares en solución 4 fue determinada mediante el método de Biuret modificado (Robson y col., 1968).



### 1.2.2.2. Obtención de malonaldehído (MDA)

Se prepararon soluciones de MDA por hidrólisis ácida de 1,1,3,3, tetraetoxipropano (TEP) (Ke y col., 1984). Se agregó HCl 0,1 M al volumen de TEP

calculado según la concentración de MDA a obtener y se prosiguió con un calentamiento en baño de agua hirviendo durante 5 min. La solución resultante fue llevada a pH 7,0 y hasta el correspondiente volumen final.

En el caso de los estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Solubilidad, Electroforesis y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) se preparó una solución madre de MDA 100 mM, a partir de la cual soluciones 20 y 30 mM fueron obtenidas por dilución con solución 4.

En el caso de los ensayos de Lisina disponible y Gelación térmica, se utilizó una solución de MDA 300 mM dada la mayor concentración proteica requerida en estos estudios, llevando al volumen final con solución 4.

### **1.2.2.3. Incubación de las proteínas miofibrilares con MDA**

Con el objetivo de poner de manifiesto la interacción de las proteínas miofibrilares con el MDA, se prepararon los siguientes sistemas:

**1. Sistemas PM + MDA:** solución de proteínas miofibrilares con la adición de solución de MDA. De acuerdo con lo mencionado en el ítem anterior, las concentraciones de proteínas y de MDA fueron ajustadas a niveles adecuados para llevar a cabo los estudios posteriores, siendo especificadas en cada uno de los correspondientes ensayos.

**2. Sistemas control PM:** constituidos sólo por proteínas miofibrilares. Estos sistemas fueron analizados en todos los casos, a fin de evaluar un posible efecto de la temperatura y el tiempo de incubación sobre las proteínas miofibrilares.

Los sistemas fueron incubados a  $27 \pm 1$  °C durante 8 h con una baja velocidad de agitación. En la mayoría de los casos, se tomaron muestras a 0, 4 y 8 h de incubación, las cuales fueron colocadas en hielo a fin de evitar que continúe la reacción entre las proteínas y el MDA e inmediatamente procesadas, de acuerdo a cada determinación posterior.

La temperatura de incubación (27 °C) se eligió de manera tal que permitiera aumentar la velocidad de reacción realizando un ensayo acelerado, a la vez que no tuviera efecto sobre la conformación de las proteínas miofibrilares.

Los estudios realizados sobre los sistemas modelo se expondrán en dos secciones: 1) se describirán los ensayos tendientes a analizar las posibles modificaciones en la estructura de las proteínas miofibrilares y 2) se estudiarán los aspectos funcionales de las mismas, en particular se analizará el proceso de gelación térmica y las características de los geles formados. Todos los estudios fueron llevados a cabo por duplicado en cada sistema y como mínimo en dos sistemas incubados independientemente.

### **1.2.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

Los estudios de calorimetría diferencial de barrido permiten determinar las temperaturas a las cuales ocurren procesos endo o exotérmicos en una muestra sometida a un programa de temperatura, frente a una sustancia empleada como referencia, así como obtener las entalpías asociadas a estos procesos.

A tal efecto, se utilizó esta técnica para analizar las temperaturas y entalpías de desnaturalización (proceso endotérmico) de las proteínas miofibrilares de salmón de mar, así como los posibles cambios en estos parámetros debidos a la interacción con MDA.

Las mediciones se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido Polymer Laboratories (Rheometric Scientific, U.K.) provisto de un software Plus V5.41.

**Principio de funcionamiento:** la técnica se basa en la medida de la diferencia de energía entregada a una muestra y a la referencia sometidas simultáneamente a un programa controlado de temperatura, a fin de mantener iguales las temperaturas de ambas cuando ocurren procesos que involucran intercambio de calor en la muestra.

El equipo posee una celda con un disco de constantan que contiene los receptáculos donde se colocan las cápsulas con la muestra y la referencia, siendo además uno de los elementos de la unión termoeléctrica que permite medir la temperatura. Consta además, de una termocupla de cromel-alumel que permite determinar el flujo diferencial de calor transferido entre el disco y las sustancias a través de la cápsula.

El calorímetro fue calibrado con sustancias de alta pureza, utilizándose indio, ácido láurico y ácido esteárico para la escala de temperaturas (ASTM E967-83). La determinación de entalpías de transición también requiere una calibración con sustancias de alta pureza (indio) (ASTM E968-83).

**Muestras:** Los sistemas se prepararon mezclando 20,0 ml de solución de proteínas miofibrilares (5,0 mg/ml) con 20,0 ml de solución de MDA 20 ó 30 mM (relación masa proteína : masa MDA 3,5:1 y 2,3:1, respectivamente). En los sistemas control se agregó 20,0 ml de solución 4.

**Procedimiento:** Luego de la incubación, se agregó a las muestras agua destilada a fin de insolubilizar las proteínas miofibrilares y se centrifugó a 5000 g durante 10 min a 4 °C, descartando el sobrenadante.

Para realizar las determinaciones, se colocaron 20 - 22 mg de los sedimentos -previamente secados sobre un papel absorbente- en cápsulas de aluminio, cerrándolas herméticamente. Se realizaron corridas en un rango de temperatura de 15 a 100 °C, a una velocidad de calentamiento  $\beta = 10$  °C/min. Como referencia se utilizó una cápsula conteniendo agua destilada, lo cual permitió una mejor compensación y estabilización de la línea de base, dado que las muestras contenían un alto porcentaje de agua (superior al 80 %). Luego, las cápsulas fueron perforadas y colocadas en una estufa a 105 °C a fin de obtener las respectivas masas secas de las muestras.

A partir de los termogramas se obtuvieron las temperaturas de desnaturalización de miosina y actina dadas por las correspondientes temperaturas de pico, para cada muestra (PM, PM + MDA(3,5:1) y PM + MDA(2,3:1),  $t = 0, 4, \text{ y } 8$  h). Además, se estimaron las entalpías de



desnaturalización ( $\Delta H_{\text{miosina}}$ ,  $\Delta H_{\text{actina}}$  y  $\Delta H_{\text{total}}$ ) a través del área bajo la curva obtenida. En cada caso, se analizaron las muestras por triplicado.

El porcentaje de proteína nativa presente en una muestra se calculó como la relación entre el  $\Delta H_{\text{mio}}$  de la muestra y el  $\Delta H_{\text{mio}}$  del sistema control a  $t = 0$ , siendo el % de proteína desnaturalizada igual a (100 - porcentaje de proteína nativa).

#### 1.2.4. Electroforesis

A fin de analizar el efecto del tratamiento con MDA en los perfiles proteicos, se llevaron a cabo electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

**Muestras:** Las muestras fueron preparadas de manera similar a la señalada para los estudios de DSC. Luego de la respectiva incubación, se tomaron 0,5 ml de muestra obteniéndose el sedimento por centrifugación a 5000 g, tal como fue detallado en la sección anterior. Los sedimentos fueron resuspendidos con buffer conteniendo KCl 0,6 M (pH 7,0).

**Procedimiento:** Se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes (SDS-PAGE), según el sistema descrito por Laemmli (1970).

**Reactivos utilizados:**

Solución de acrilamida-bisacrilamida: acrilamida 30% p/v, bisacrilamida 0,8% p/v

Buffer de gel apilador (4x): Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), SDS 0,4%, TEMED 0,4%

Buffer de gel separador (4x): Tris-HCl 1,5M (pH 8,8), SDS 0,4 %, TEMED 0,4%

Buffer de corrida (5x): Tris-HCl 0,125 M, glicina 0.96 M (pH 8,3), SDS 0,5%

Buffer de muestra (2x): Tris-HCl 0,25 M (pH 6,8), glicerol 50 %, SDS 0,2%, TEMED 0,4%, Urea 8 M, azul de bromofenol 0,05%, con o sin ME 5%

**Equipo utilizado:** Se utilizó un equipo de miniplacas Mini Protean II (BIO-RAD). Las corridas se realizaron a 200 mV, con corrientes de 30 mA/placa mientras las muestras atravesaron el gel apilador y de 60 mA en el gel separador.

#### 1.2.4.1. SDS-PAGE en gradiente

El gel separador utilizado (1 mm) consistió en un gradiente entre 3 y 15 % p/v de acrilamida obtenido mediante un mezclador de gradiente BIO-RAD y una bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Parmer). Se utilizó un gel apilador al 3 % p/v de acrilamida.

**Muestras:** A las distintas muestras se les agregó buffer muestra con o sin ME en relación 1:1, siendo sometidas a un tratamiento térmico en baño a 100 °C durante 1 min.

En este caso se sembró el mismo volumen de cada una de las muestras. Además, se sembraron proteínas patrón de alta masa molecular (ProSieve) los cuales se detallan en la **Tabla M.1.1.** y patrones de miosina de conejo (Sigma).

**Tabla M.1.1.** Patrones de alta masa molecular

Proteína patrón	Masa Molecular (kDa)	Masa subunidades (kDa)
Tiroglobulina	669	330
Ferritina	440	18,5 (220)
Catalasa	232	60
Lactosa deshidrogenasa	140	36
Seroalbúmina bovina	67	67

**Coloración de los geles:** Los geles fueron coloreados con Coomassie Brilliant Blue R-250 0.2 % en solución metanol - ácido acético - agua destilada (5:5:2) y posteriormente decolorados con solución metanol - ácido acético - agua destilada (2.5:1:6.5). En algunos casos, cuando la cantidad de proteína sembrada fue significativamente inferior, fue necesario realizar una tinción con plata a fin de aumentar la sensibilidad en la detección de las bandas proteicas.

### 1.2.4.2. Electroforesis Bidimensional

La electroforesis bidimensional permite someter a las proteínas a dos condiciones diferentes y sucesivas de separación, aplicadas en la primera y segunda dimensión respectivamente. En este caso, la misma fue realizada según la técnica de Petruccelli y Añón (1995) en las muestras obtenidas de acuerdo a lo detallado previamente para la SDS-PAGE en gradiente.

**Primera dimensión (sin ME):** Se utilizó un gel separador (0,75 mm) en gradiente (3-15 %) sin gel apilador. Las muestras se prepararon tal como fue explicado en el ítem anterior (sin ME) sembrándose por duplicado. Luego de la corrida, se cortaron las calles, siendo almacenada una parte de ellas en glicerol al 10 % v/v a -20 °C, mientras que el resto fue coloreado con Coomassie Brilliant Blue.

**Segunda dimensión (con ME):** Se realizó en geles separadores (1,5 mm) en gradiente (3-15%) sin gel apilador. Previo a la corrida, las calles de la primera dimensión que habían sido almacenadas en glicerol fueron tratadas con buffer Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), SDS 1% p/v, sacarosa 20 % p/v,  $\beta$ - mercaptoetanol (ME) 0,2 M, durante 30 min a 55 °C, con dos cambios de solución. Se colocó la calle sobre el gel de la segunda dimensión y se adicionó buffer Tris-HCl 62,5 mM, (pH 6,8), SDS 1 % p/v y azul de bromofenol 0,01 % p/v, realizando la corrida a corriente constante (40 mA por placa).

**Coloración de los geles:** Los geles correspondientes a la segunda dimensión fueron revelados mediante tinción con plata.

### 1.2.4.3. Análisis de los geles

Los geles fueron analizados mediante un analizador de imágenes Molecular Analyst Software (Bio-Rad), obteniendo los correspondientes densitogramas y estimando las masas moleculares de las distintas especies proteicas.

## 1.2.5. Solubilidad proteica

### 1.2.5.1. Solubilidad en KCl 0,6 M

En una primera etapa, se analizó la solubilidad de las proteínas miofibrilares de salmón de mar en solución 4.

**Muestras:** en este caso la concentración proteica y de MDA se duplicaron con respecto a los estudios de DSC, manteniendo las mismas relaciones proteína : MDA.

**Procedimiento:** Las muestras previamente incubadas fueron centrifugadas a 5000 g durante 15 min. a 4 °C. Se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante por el método de Biuret. La solubilidad proteica en cada sistema se calculó como:

$$\text{Solubilidad \%} = \frac{\text{concentración proteica en el sobrenadante}}{\text{concentración proteica original}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1.1.})$$

Los resultados se expresaron como la solubilidad (S) con respecto a la solubilidad del sistema control a  $t = 0$  ( $S_0$ ):

$$S / S_0 \% = \frac{\text{solubilidad de la muestra}}{\text{solubilidad del control a } t = 0} \times 100 \quad (\text{Ec. 1.2.})$$

### 1.2.5.2. Solubilidad en distintos medios

Con el fin de obtener mayor información acerca de la naturaleza química de la interacción entre las proteínas miofibrilares de salmón de mar y el MDA, se realizaron ensayos de solubilidad en diferentes medios, los cuales se detallan a continuación:

- buffer NaCl 0,6M, Tris-HCl 0,03M, pH 7,0 (buffer 1)
- buffer NaCl 0,6M, Tris-HCl 0,03M, SDS 5%, urea 8M, pH 7,0 (buffer 2)
- buffer NaCl 0,6M, Tris-HCl 0,03M, SDS 5%, urea 8M,  $\beta$ -mercaptoetanol (ME) 5%, pH 7,0 (buffer 3)

**Muestras:** se analizaron sistemas preparados de manera similar a la detallada para los estudios de DSC, con soluciones de MDA 30 mM (relación proteínas : MDA 2,3:1).

**Procedimiento:** 1,00 ml de muestra de cada uno de los sistemas incubados a 27 °C fue tratado con 3,00 ml de cada una de las soluciones, agitando durante 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 17.000 g durante 15 min a 15 °C, determinando posteriormente la concentración de proteínas en el sobrenadante.

Dada la interferencia del SDS, urea y ME en los distintos métodos de determinación de proteínas, la concentración proteica en los sobrenadantes se determinó mediante el método de Lowry modificado por Bensadoun y Weinstein (1976), al cual se le realizaron pequeñas modificaciones.

Se tomaron 0,30 ml de muestra y se llevaron a 3,00 ml con agua destilada. Se mezcló vigorosamente con un Vórtex y se dejó en reposo durante 15 min. Se agregó 1,00 ml de ácido tricloroacético (TCA) 24% p/v, se mezcló y centrifugó a 3300 g durante 30 min a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se realizó la determinación del contenido proteico sobre los sedimentos por el método de Lowry. Se calculó la solubilidad  $S$  y  $S/S_0$  de acuerdo con las ecuaciones 1.1 y 1.2., determinando la concentración original de proteínas sobre una alícuota tomada antes de la centrifugación a 17000 g.

### 1.2.5.3. Electroforesis de las fracciones solubles

Las fracciones solubles obtenidas en ambos estudios de solubilidad fueron analizadas mediante SDS-PAGE.

**Muestras:** se mezcló una alícuota de sobrenadante con igual volumen de buffer muestra con o sin ME, sembrando 30 µg de proteína en cada calle.

La metodología utilizada para la realización de las corridas electroforéticas fue detallada en la sección 1.2.4.1.

### 1.2.6. Determinación de lisina disponible

Se analizó el contenido de lisina disponible en muestras previamente incubadas con y sin MDA mediante el método de Carpenter revisado por Booth (1971) y modificado por Leal y Sambucetti (1987). Este método se basa en la reacción del Fluor-2,4-Dinitrobenceno (FDNB) con aminoácidos para dar compuestos coloreados. A fin de poder medir la absorbancia correspondiente a las interferencias y así poder eliminarlas, se preparó un segundo tubo de reacción donde se agregó metilcloroformiato (MCC) que forma un derivado  $\alpha$ -MC- $\epsilon$ -DNF-lisina el cual es soluble en éter (ver **Procedimiento**). De esta manera, el único aminoácido que produce interferencia es la histidina que, si bien da un derivado incoloro con el DNFB, adquiere color al ser tratado con MCC y es parcialmente soluble en éter.

**Muestras:** Los sistemas fueron preparados de manera de tener una concentración final de proteínas de 20 mg/ml con una relación proteína : MDA de 5:1.

**Procedimiento:** Luego de la incubación, se agregaron 8,00 ml de NaHCO<sub>3</sub> 8 % p/v y se agitó durante 2 min en un homogeneizador Virtis. Posteriormente, se trasvasó a un balón de vidrio recubierto con papel aluminio con 2,00 ml de NaHCO<sub>3</sub>. Se practicaron dos nuevos lavados con 2,00 y 1,00 ml de etanol 96° respectivamente. Se agregaron 9,30 ml de dinitrofluorobenceno (DNFB) en etanol (2,40 ml de DNFB en 72,0 ml de etanol). Se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, evaporando luego el etanol en estufa a 37 °C (aproximadamente 2 h) Se agregaron 200 ml de HCl 8N lentamente y se homogeneizó. Se calentó el balón a reflujo durante 16 h. Se filtró el hidrolizado obtenido en caliente en matraz recubierto con papel aluminio llevando a un volumen final de 250 ml.

Se prepararon los siguientes tubos:

- *Tubo A:* Sobre 2,00 ml del hidrolizado se realizaron 3 extracciones con 5,00 ml cada una de éter libre de peróxidos. Se extrajo la fase etérea y se eliminaron los restos de éter en baño a 70 °C. Se llevó a 10,00 ml con HCl 1 N.
- *Tubo B:* Sobre 2,00 ml del hidrolizado se realizó una extracción con 5 ml de éter libre de peróxidos. Se extrajo la fase etérea y se eliminaron los restos de éter en baño a 70 °C. Se agregó una gota de fenoltaleína y posteriormente NaOH 12% p/v hasta aparición de color rosado. Se adicionaron 2,00 ml de buffer carbonato (pH 8,5) y a continuación 5 gotas de metilcloroformiato (MCC). Se tapó y se agitó vigorosamente, dejando luego en reposo durante 8 min. Se agregaron 0,75 ml de HCl concentrado y se agitó. Se practicaron 4 extracciones de 5,00 ml con éter libre de peróxidos, extrayendo luego la fase etérea y evaporando a 70°C. Se llevó a 10,00 ml con agua destilada.

Se leyeron los tubos en espectrofotómetro a 435 nm contra un blanco de agua destilada. La diferencia A – B corresponde a la absorbancia atribuida a la DNF-lisina.

Para obtener la curva de calibración se utilizó clorhidrato de ε-DNF-lisina disuelto en HCl 8N.

Los resultados se expresaron según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg lisina disponible}}{100 \text{ g proteína}} = \frac{\text{Abs} \times 0,42 \times f \times 250 \times 100}{2 \times m} \quad (\text{Ec. 1.3.})$$

donde: 0,42 = coeficiente de transformación de ε-DNF-lisina a lisina

f = factor de la curva = mg std / Abs std

Abs = absorbancia de la muestra = A – B

m = masa de proteína en la muestra (obtenida teniendo en cuenta la masa, densidad y concentración de la suspensión de proteínas)

### 1.2.7. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

A fin de investigar las posibles modificaciones estructurales sufridas por las proteínas miofibrilares por efecto del MDA, se realizó la observación de las mismas en un microscopio electrónico de transmisión.

**Muestras:** Se prepararon sistemas similares a los utilizados en los ensayos de DSC (relación proteína : MDA 2,3:1) (sección 1.2.3.).

**Procedimiento:** Luego de la incubación, las muestras fueron diluídas 1/200 con solución 4 y tratadas según el procedimiento de Lozano y Morales (1983). Se colocó una grilla (200 mesh) con un film de formvar en una gota de muestra por el lapso de 3 min. Posteriormente, se colocó la grilla en una gota de solución de acetato de uranilo saturada durante 1 min. Se secó y fue observada en un microscopio JEOL 100 CX II operado a 80 kV.

### 1.2.8. Formación de estructuras tipo gel por efecto del MDA sin tratamiento térmico

Mientras se realizaban ensayos utilizando altas concentraciones de proteínas se observó la formación de estructuras tipo "geles" en presencia de MDA durante la incubación a 27 °C. En consecuencia, se realizó una experiencia a fin de determinar la incidencia de la concentración de MDA sobre la producción de este fenómeno.

**Muestras:** Se prepararon sistemas conteniendo 20 mg/ml de proteínas y las siguientes relaciones proteína:MDA:

- 5:1 (conc. final MDA = 60 mM)
- 50:1 (conc. final MDA = 6 mM)
- 100:1 (conc. final MDA = 3 mM)
- 500:1 (conc. final MDA = 0,6 mM)
- control (sin MDA)



**Procedimiento:** Se incubaron los sistemas a 27 °C, siendo observados macroscópicamente a distintos tiempos de incubación (2, 4, 6, 8, 25 y 31 h). Cuando se observó la formación de una "masa sólida", se tomaron muestras para ser luego observadas en un microscopio electrónico de barrido (SEM), mediante la técnica que será explicada en la sección 1.2.10.3

### 1.2.9. Análisis de parámetros reológicos durante el proceso de gelación térmica

**Muestras:** Se prepararon sistemas conteniendo una concentración final de 20 mg/ml con una relación proteína : MDA 5:1. Además se realizaron ensayos sobre sistemas con la misma concentración proteica y una relación proteína : MDA 50:1.

**Procedimiento:** Se siguió la evolución del proceso de gelación térmica a través de la determinación de parámetros de viscoelasticidad dinámica. A tal fin se utilizó un reómetro Paar Physica MCR 300 controlado mediante un software US200 V2.21 y acoplado a un baño peltier Viscotherm VT 2 (Paar Physica). El sistema sensor fue de geometría plato-plato PP30/s de 29,95 mm de diámetro y distancia entre los platos de 1 mm.

Las muestras fueron sometidas al siguiente programa de temperatura:

- 1) calentamiento entre 25 y 80 °C a 5 °C/min
- 2) mantenimiento a 80 °C durante 45 min
- 3) enfriamiento entre 80 y 4 °C (20 °C/min)
- 4) mantenimiento a 4 °C durante 30 min
- 5) calentamiento entre 4 y 20 °C a 10°C

La frecuencia  $\omega$  utilizada fue de 1 Hz y la deformación  $\gamma$  de 0.01%. Se evitó la deshidratación de la muestra mediante el agregado de silicona. Se registraron los parámetros  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan(\delta)$ .

Los geles formados mediante el programa de temperatura antes descripto fueron sometidos posteriormente a un barrido de frecuencias. Para ello, se

llevaron a 20°C y se realizaron los barridos a  $\gamma$  constante e igual a 1% variando  $\omega$  entre 0,01 y 10 Hz. Los parámetros de interés en este caso fueron  $G'$ ,  $G''$  y  $\eta^*$ .

### 1.2.10. Propiedades de los geles obtenidos por tratamiento térmico

**Muestras:** Se prepararon sistemas similares a los utilizados en los ensayos reológicos (5:1) y se colocaron en tubos de vidrio (2,2 cm de diámetro interno x 6 cm de alto). Los extremos de los tubos fueron cerrados mediante tapones de goma con una abertura en la cual se colocó una varilla de vidrio (Puppo y Añón, 1998; Lupano, 2000), incubando los sistemas a 27°C.

**Obtención de los geles:** Luego de la incubación, los tubos fueron colocados en un baño termostático Lauda a 80°C durante 45 min. Durante los primeros 45 seg de calentamiento se mantuvieron abiertos (sin la varilla) a fin de eliminar el aire que contenían y posteriormente fueron cerrados. Luego, se enfriaron rápidamente en un baño de agua a temperatura ambiente y se colocaron en cámara de 4°C, donde permanecieron entre 15 y 24 h.

#### 1.2.10.1. Análisis de textura

A fin de analizar posibles diferencias en los geles dadas por la interacción con MDA, se estudiaron diferentes aspectos para caracterizarlos, entre ellos las variaciones en los parámetros relacionados con la textura de los geles.

**Muestras:** Los geles fueron separados del líquido exudado y llevados a temperatura ambiente. Se cortaron secciones de 1 cm de alto.

**Procedimiento:** Las determinaciones fueron realizadas en un Analizador de textura TA-TX2i (Stable Micro Systems, U.K.) controlado por un software Texture Expert para Windows versión 1.2. Se utilizó una sonda cilíndrica con una superficie de contacto plana de 7,5 cm de diámetro.

Se practicaron dos tipos de ensayos:

- **Análisis de Perfil de Textura (TPA):** Estos ensayos consisten en la aplicación sucesiva de dos ciclos de compresión. La compresión aplicada fue del 20 % a una velocidad de compresión de 1 mm/seg, con un intervalo de 5 seg entre los ciclos. A partir de los perfiles obtenidos se calcularon los parámetros de Firmeza (F), Elasticidad Instantánea ( $E_{ins}$ ), Elasticidad Retardada ( $E_{ret}$ ) y Cohesividad (C) (Fizman y col., 1998).
- **Ensayos de Relajación:** Estos ensayos fueron realizados bajo las mismas condiciones que los de TPA, en este caso la muestra se sometió a compresión manteniendo la misma durante 15 min. De esta manera, se registró la fuerza (F) ejercida por la muestra en función del tiempo.

#### 1.2.10.2. Capacidad de retención de agua (WHC)

**Muestras:** Los geles fueron separados de su líquido exudado y llevados a temperatura ambiente.

**Procedimiento:** Se pesaron entre 0,6 y 1,4 g de muestra (en balanza con precisión 0,0001 g) en un cilindro conteniendo una membrana de nylon con poros de 5,0  $\mu\text{m}$  (Micronsep), previamente tarada.

Se centrifugó a 120 g durante 10 min a 20 °C. Se pesó inmediatamente después de la centrifugación y se calculó la pérdida de agua como la diferencia de peso antes y después de la centrifugación. Posteriormente, estas muestras fueron colocadas en estufa a 105°C hasta peso constante. La capacidad de retención de agua del gel (WHC) se calculó según la ecuación 1.4.:

$$\text{WHC} = \frac{\text{cantidad de agua retenida}}{\text{cantidad de agua inicial}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1.4.})$$

donde la cantidad de agua retenida corresponde a la diferencia de peso antes y después del secado a 105 °C, y la cantidad de agua inicial se obtuvo como la suma del agua retenida y el agua perdida.

#### **1.2.10.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

Se tomaron muestras de los geles de aproximadamente 2 mm de lado, las cuales fueron fijadas con glutaraldehído 2,5 % en buffer fosfato (pH 7,2). Las muestras fijadas fueron lavadas, gradualmente deshidratadas en acetona y finalmente secadas usando un secador por punto crítico de dióxido de carbono (Polaron). Posteriormente, las muestras fueron recubiertas con una capa de oro mediante un equipo Pelco 91000. Las observaciones fueron realizadas usando un microscopio de barrido JEOL 35 CF a 5-6 kV (Lozano y Morales, 1983).

#### **1.2.10.4. Solubilidad de los geles en distintos medios**

Se realizaron ensayos de solubilidad de los geles en diferentes medios con el objeto de analizar las fuerzas intermoleculares que intervienen en la formación de sus matrices, en ausencia y en presencia de MDA. Las soluciones utilizadas fueron similares a las descritas en la sección 3.1.5.2.

**Muestras:** Los geles fueron separados del líquido exudado y mantenidos a temperatura ambiente durante 30 min en un desecador.

**Procedimiento:** Para cada gel, se pesaron alrededor de 150 mg para el buffer 1, 30 mg para el buffer 2 y 10 mg para el buffer 3 (en balanza con precisión 0,00001 g). Se agregaron 1,25 ml del buffer correspondiente y se homogeneizó en Ultraturrax (7800 rpm, 30 seg). Se transfirió la suspensión a un tubo eppendorf y se llevó a un volumen final de 1,50 ml. Se centrifugó en una microcentrífuga a 17000 g durante 15 min a 15°C. Se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante de manera similar a la descrita en el ítem 1.2.5.2.

La masa de gel remanente fue pesada y colocada en estufa a 105°C. A partir de la masa seca obtenida, se estimó la proporción de proteína en cada gel.

#### **1.2.10.5. Electroforesis de los líquidos exudados**

Muestras provenientes de los líquidos exudados por los geles fueron analizadas mediante SDS-PAGE a fin de determinar las especies proteicas no retenidas en la matriz del gel en cada caso. La técnica utilizada fue descrita en la sección 1.2.4.1.

#### **1.2.11. Análisis estadístico**

En todos los casos, se analizó el efecto del tiempo de incubación y de la concentración de MDA mediante un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de los valores medios se realizó mediante el test de menor diferencia significativa (LSD) de Fisher, considerándose que dos medias eran significativamente diferentes cuando la probabilidad determinada era menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Estos análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SYSTAT (Wilkinson, 1990).

## 1.3. RESULTADOS Y DISCUSION

### A. ASPECTOS ESTRUCTURALES

#### 1.3.1. Desnaturalización térmica de las proteínas miofibrilares de salmón de mar

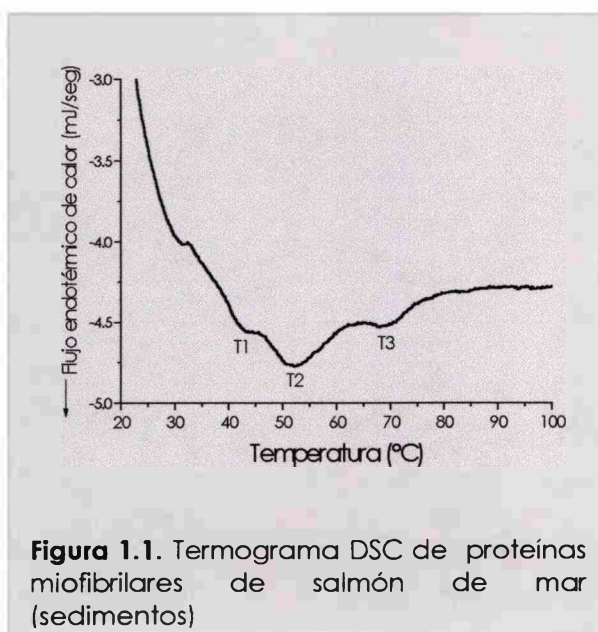
La desnaturalización térmica de proteínas es un proceso muy complejo que implica el pasaje de un estado nativo a uno desnaturalizado, caracterizado por una temperatura de desnaturalización correspondiente al punto medio del proceso (Damodaran, 1996). Dicho proceso involucra la desestabilización de las interacciones no covalentes que intervienen en la estructura proteica, tales como puentes de hidrógeno, uniones electrostáticas y de Van der Waals, cuya ruptura es endotérmica por lo cual son estabilizadas a bajas temperaturas y desestabilizadas a altas temperaturas (control entálpico); e interacciones hidrofóbicas (ruptura exotérmica, estabilizadas a altas temperaturas). La estabilidad de las interacciones hidrofóbicas tiene un máximo y luego decae debido a la ruptura de la estructura del agua a altas temperaturas (control entrópico). Por otra parte, también contribuye a la estabilidad de la conformación proteica un término de entropía conformacional. El aumento de energía cinética dado por el aumento de temperatura induce un desplegamiento de la cadena polipeptídica. La temperatura de desnaturalización de una proteína corresponde a aquella donde la suma del componente entálpico y el entrópico es decir la diferencia de energía libre es cero ( $\Delta G = 0$ ).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica que ofrece una valiosa información acerca de la conformación proteica. En primer lugar, se puede obtener la temperatura de desnaturalización, la cual es una medida de la estabilidad térmica de la proteína. La temperatura de desnaturalización puede representarse mediante la temperatura de pico o  $T_{m\acute{a}x}$ . Este valor de temperatura se encuentra normalmente unos grados por encima de la temperatura a la cual comienza la transición (temperatura de onset  $T_0$ ). Los valores de  $T_{m\acute{a}x}$  medidos en

diferentes muestras a la misma velocidad de calentamiento son comparables entre sí (Wright y col., 1977).

En el presente estudio se analizaron por DSC los sedimentos obtenidos por centrifugación de los sistemas descritos previo agregado de agua, precipitando las proteínas miofibrilares en forma de miofibrillas a pH 7,0.

**a. Estabilidad térmica de las proteínas aisladas de músculo de salmón de mar.** En la **Figura 1.1.** se presenta un termograma característico obtenido para las



miofibrillas control donde pueden observarse tres transiciones endotérmicas. Wright y col. (1977) mostraron que el termograma de actomiosina de conejo presentaba tres picos (51,5; 61 y 73 °C) atribuyendo los dos primeros picos a la desnaturalización de la miosina y el tercero a la desnaturalización de la actina. Las miofibrillas de salmón de mar presentaron las siguientes temperaturas de pico: T1 = 42,4 ± 1,3

°C, T2 = 52,7 ± 0,9 °C y T3 = 68,4 ± 0,4 °C. Puede observarse que estas temperaturas son menores a las correspondientes a las proteínas de conejo. Connell (1961) estudió la miosina presente en diferentes especies de peces de aguas frías, comparándolas con las de otras especies como bovino, conejo, pollo y rana. Este autor demostró que en el músculo de pescado esta proteína tenía menor estabilidad térmica que en el caso de mamíferos, mientras que en la rana exhibía una estabilidad intermedia entre la de los mamíferos y la de pescados de agua fría. Connell concluyó que la miosina de las diferentes especies se encuentra adaptada a las distintas temperaturas corporales. Otros autores estudiaron proteínas miofibrilares de especies de pescados que habitan en aguas con diferentes temperaturas, encontrando diferencias en las estabilidades térmicas de acuerdo a las características de su habitat. Así, músculos de

peces de aguas tropicales presentan temperaturas de desnaturalización correspondientes al primer pico alrededor de 10 °C por encima de la temperatura correspondiente para especies de aguas frías (Poulter y col., 1985; Hastings y col., 1985; Davies y col., 1988; Howell y col., 1991). Davies y col. (1994) compararon la miosina aislada de músculo de pargo emperador (tropical) y de bacalao (aguas frías), mostrando que bajo condiciones agregantes (baja fuerza iónica y pH 6) la miosina de pargo tuvo mayor estabilidad térmica que la de bacalao. Sin embargo, cuando dichas proteínas fueron disueltas en un medio con alta fuerza iónica y/o pH 8, presentaron estabilidades térmicas similares. Estos autores sugirieron que la diferencia en la estabilidad térmica de la miosina en el músculo intacto y bajo condiciones de agregación estarían dadas, en parte, por diferencias en el modo de asociación entre estas moléculas. La miosina de peces tropicales experimentaría una importante estabilización por la asociación. En la **Tabla 1.1.** se presentan algunos ejemplos de temperaturas de desnaturalización de proteínas miofibrilares aisladas de pescados con diferente habitat.

**Tabla 1.1.** Temperaturas de desnaturalización de proteínas miofibrilares de diferentes pescados

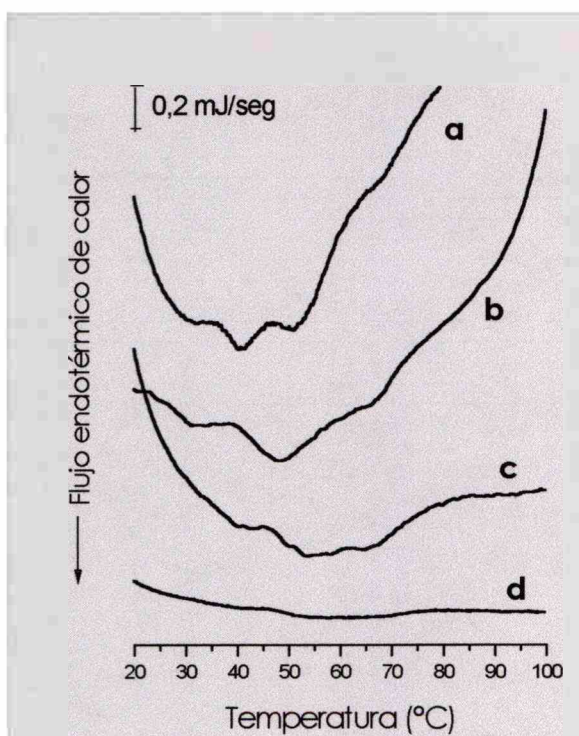
Especies	T1 (°C)	T2 (°C)	T3 (°C)	Comentarios	Fuente
<b>Especies marinas de aguas frías</b>					
Corvina blanca ( <i>Micropogonias undulatus</i> )	38	51	65	Actomiosina, pH 6,6-6,9	Wu y col., 1985
Bacalao ( <i>Gadus morhua</i> )	43	55	65	Miofibrillas, pH 7,0, I = 0,05	Howell y col., 1991
	45	55	74	Miofibrillas	Hastings y col., 1985
<b>Especies de agua dulce fría</b>					
Trucha arcoiris ( <i>Salmo gairdneri</i> )	30	44,6	66,7	Miofibrillas, pH 7,0, I = 0,05	Howell y col., 1991
<b>Especies marinas tropicales</b>					
Pargo emperador ( <i>Lutjanus sebae</i> )	40	49	-	Miosina, pH 7,0	Davies y col., 1994
Sea bream ( <i>Gymnocranius rivalatus</i> )	51,7	58	71	Miofibrillas, pH 7,0, I = 0,05	Howell y col., 1991



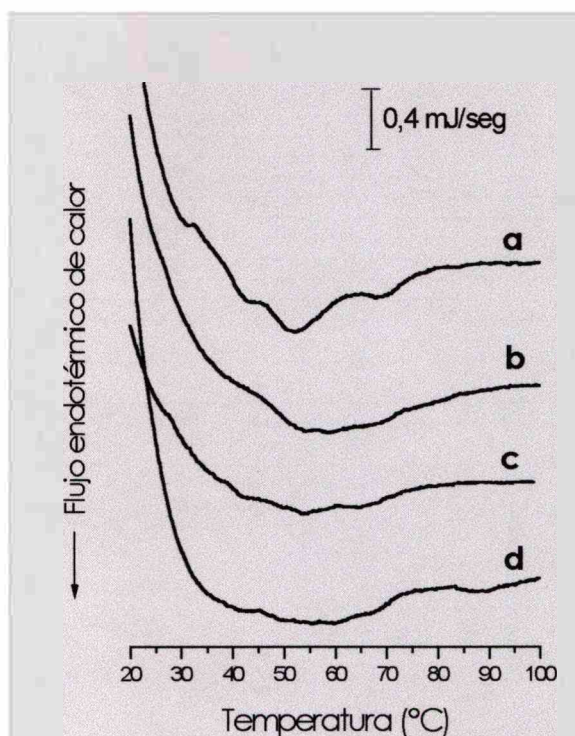
Las temperaturas de desnaturalización encontradas para las proteínas miofibrilares de salmón de mar son comparables a las de otras especies marinas de aguas frías tal como el bacalao (temperatura del hábitat 2-8 °C).

**b. Efecto de la incubación a 27°C:** Los sistemas control incubados durante 4 y 8 h mostraron termogramas similares a los obtenidos a  $t = 0$  (resultados no mostrados). De acuerdo a estos resultados, podemos decir que la incubación a 27 °C no afectó la conformación de las proteínas miofibrilares de salmón de mar en buffer con KCl 0,6 M, pH 7,0.

**c. Efecto del tratamiento con MDA:** Los termogramas correspondientes a las proteínas miofibrilares tratadas con MDA mostraron cambios importantes en su perfil, para las dos relaciones proteína : MDA estudiadas. En la **Figura 1.2.** pueden observarse los perfiles de los sistemas con relación 3,5:1 para  $t = 0, 4$  y 8 h de incubación a 27°C y en la **Figura 1.3.** los correspondientes a la relación 2,3:1.



**Figura 1.2.** Termogramas DSC de los sistemas PM + MDA (3,5:1). (a) PM -  $t = 0$ ; (b) PM + MDA -  $t = 0$ ; (c) PM + MDA -  $t = 4$  h; (d) PM + MDA -  $t = 8$  h



**Figura 1.3.** Termogramas DSC de los sistemas PM + MDA (2,3:1). (a) PM -  $t = 0$ ; (b) PM + MDA -  $t = 0$ ; (c) PM + MDA -  $t = 4$  h; (d) PM + MDA -  $t = 8$  h

En términos generales, podemos observar un cambio en la forma de los termogramas, principalmente en los picos correspondientes a miosina, para todos los tiempos de interacción, aunque la modificación se hizo más evidente en función del tiempo de incubación. Puede observarse la aparición de un pico más ancho para la miosina formado a su vez por varios "picos menores". A  $t = 0$ , no se observaron variaciones en las  $T_{m\acute{a}x}$  para las distintas relaciones PM : MDA con respecto al sistema control. Luego de 4 h de incubación, los sistemas no mostraron diferencias significativas en  $T_{m\acute{a}x}$  ( $p < 0,05$ ) con respecto a los sistemas control. Sin embargo, a pesar de presentar  $T_{m\acute{a}x}$  similares, los perfiles térmicos fueron diferentes, principalmente para el sistema PM + MDA (2,3:1). A  $t = 8$  h de incubación, el sistema PM + MDA (3,5:1) mostró termogramas con importantes cambios, donde puede identificarse una primera transición a menores temperaturas ( $38,9 \pm 1,6$  °C). La  $T_{m\acute{a}x}$  correspondiente a la segunda transición de la miosina no pudo determinarse dada la presencia de "pequeños picos" a distintas temperaturas. El sistema PM + MDA (2,3:1) presentó modificaciones similares en su perfil térmico. La temperatura de desnaturalización de la actina no presentó cambios relevantes en ninguno de los casos.

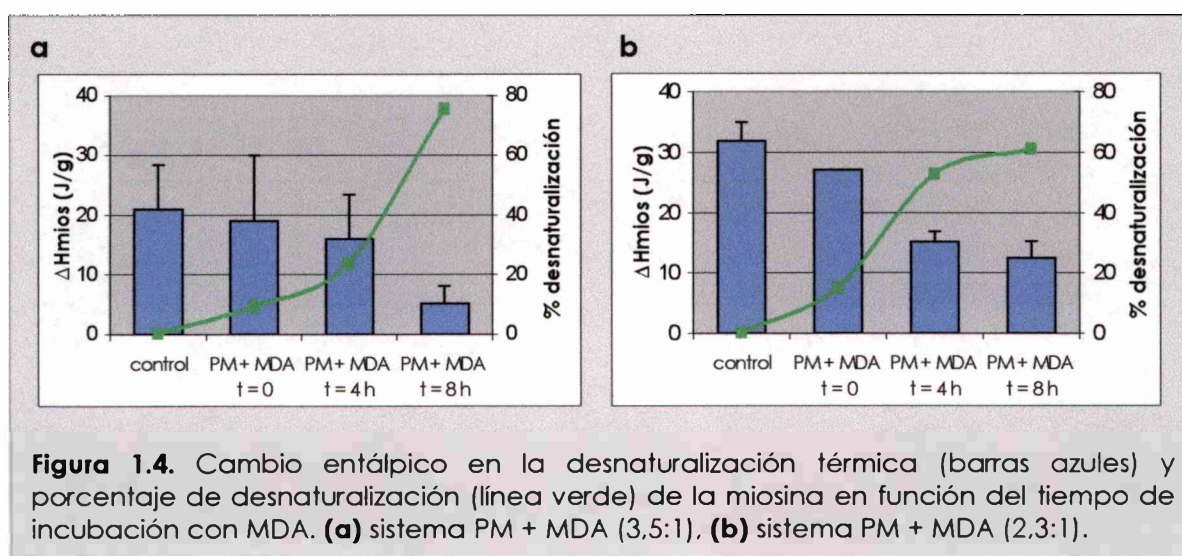
El corrimiento de la primera transición a menores temperaturas indica que la reacción con MDA indujo en la miosina de salmón de mar una disminución en su estabilidad térmica. Asimismo, la aparición de varios "pequeños picos" sugiere la presencia de distintas especies proteicas en las muestras con distintas estabilidades frente a la temperatura. Una posible explicación para este hecho podría ser la existencia de moléculas de miosina que pueden encontrarse en distintos estados de alteración y por lo tanto ser más o menos resistentes a la desestabilización por la temperatura. Por otra parte, la agudeza de un pico está relacionada con la cooperatividad del proceso de desnaturalización es decir, cuanto menor es el rango de temperatura en el que ocurre el proceso, más cooperativo es el mismo. Como se dijo anteriormente, en presencia de MDA se observa un mayor rango para las transiciones de la miosina, sugiriendo una pérdida de cooperatividad en el proceso de desnaturalización de esta proteína.

Otra información que puede obtenerse a partir de un termograma es el cambio entálpico ( $\Delta H$ ) involucrado en el proceso. En el caso de la

desnaturalización proteica, este parámetro es el resultado de la sumatoria de fenómenos endotérmicos y exotérmicos. El carácter endotérmico generalmente observado para este proceso es debido a un amplio predominio de la contribución dada por la ruptura de puentes de hidrógeno. Aunque también existe una contribución debida a la agregación térmica (exotérmica), ésta no es relevante, por lo cual se utiliza el parámetro  $\Delta H_d$  como indicador del grado de desnaturalización previo de la proteína (Arntfiel y col., 1990).

En este estudio se analizaron los valores de los cambios entálpicos de la miosina, la actina y del total ( $\Delta H_{mio}$ ,  $\Delta H_{act}$  y  $\Delta H_t$ ). Los sistemas control no presentaron cambios significativos en estos parámetros en función del tiempo de incubación a 27 °C, indicando que las proteínas no sufrieron cambios conformacionales en los tiempos estudiados.

La **Figura 1.4.** muestra la variación en el  $\Delta H_{mio}$  en función del tiempo de incubación con MDA para los sistemas 3,5:1 (**a**) y 2,3:1 (**b**). En ambos casos se observa una disminución en los valores de  $\Delta H_{mio}$  en función del tiempo de incubación. Para el caso de los sistemas con menor concentración de MDA (3,5:1), esta disminución fue significativa a  $t = 8$  h ( $p < 0,05$ ); en cambio para la mayor concentración de MDA (2,3:1) el cambio fue significativo para  $t = 4$  h ( $p < 0,05$ ) y no hubo disminución significativa entre  $t = 4$  y 8 h de incubación. Los  $\Delta H_{act}$  se mantuvieron prácticamente constantes en todos los casos y el  $\Delta H_t$  varió en correlación con la variación del  $\Delta H_{mio}$ .



Estos resultados muestran un cambio conformacional de la miosina por efecto del MDA. De esta manera, se calcularon los porcentajes de desnaturalización para la miosina, los cuales también se muestran en la **Figura 1.4**. Para el sistema PM + MDA (3,5:1) se obtuvo el 23,7 % de proteína desnaturalizada a  $t = 4$  h y el 75,5 % a  $t = 8$  h. En el caso del sistema PM + MDA (2,3:1) los porcentajes fueron 52,7 y 61,1 % respectivamente, evidenciando que el cambio más drástico se produce en las primeras 4 h de interacción para esta relación proteína : MDA y que además, es más importante al aumentar la relación MDA : proteína.

### 1.3.2. Electroforesis

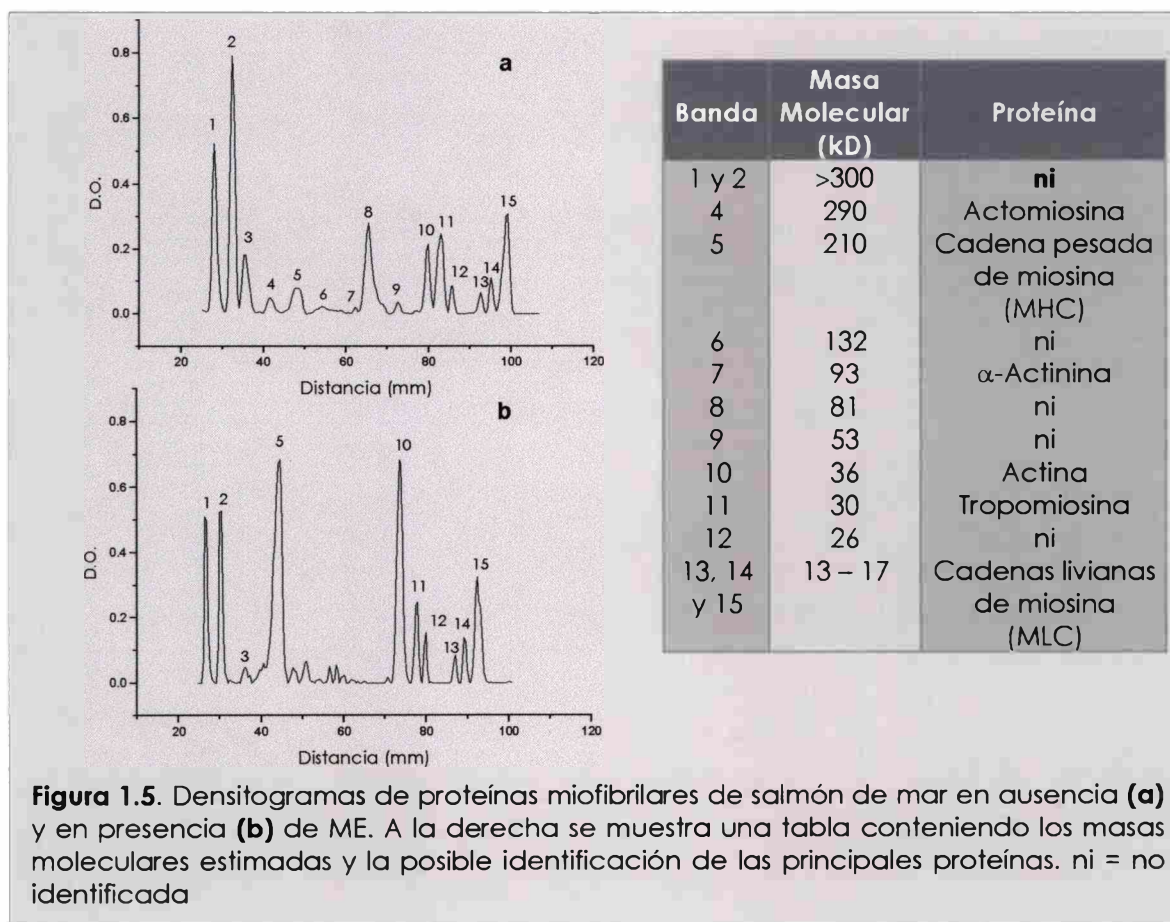
#### 1.3.2.1. SDS-PAGE de los sedlimentos

Se obtuvieron los perfiles electroforéticos de los sedimentos resuspendidos, tal como se indicó en la sección 1.2.4. (**Materiales y Métodos**), a fin de investigar posibles cambios en las proteínas miofibrilares por el tratamiento con MDA en sistemas PM + MDA (2,3:1).

**a. Perfil electroforético de las proteínas miofibrilares de salmón de mar.** En primer término se analizará el perfil correspondiente a una fracción soluble dado que permite una mejor visualización de todas las proteínas presentes. En la **Figura 1.5** se muestran los densitogramas (con y sin ME), con su identificación y las masas moleculares estimadas para las proteínas más relevantes.

Podemos observar que la banda correspondiente a la cadena pesada de miosina (*MHC*) (banda 5 -  $210 \pm 6$  kD) es poco intensa en la muestra sin ME (**Figura 1.5.a**), sin embargo su intensidad aumenta marcadamente cuando la muestra es tratada con ME (**Figura 1.5.b**). Lo mismo sucede con la banda de *actina* (banda 10 -  $36 \pm 2$  kD). Esto puede atribuirse a que la miosina aislada en una solución buffer se encuentra principalmente formando actomiosina a través de uniones disulfuro con la actina (Samejima y col., 1980; Matsumoto, 1980; Foegeding y col., 1996). En el caso de las muestras tratadas con SDS y urea se formaría un complejo

entre la cadena pesada de miosina y la actina, el cual estaría asociado a las bandas de alta masa molecular (Wagner y Añón, 1986b). Al romperse los puentes disulfuro con ME, puede observarse un notorio incremento en la intensidad de MHC y actina así como una disminución en la banda proteica que no ingresa al gel (*banda 2*). En el perfil sin ME se observa una banda bastante intensa correspondiente a  $81 \pm 3$  kD (*banda 8*), la cual no aparece en presencia de ME.

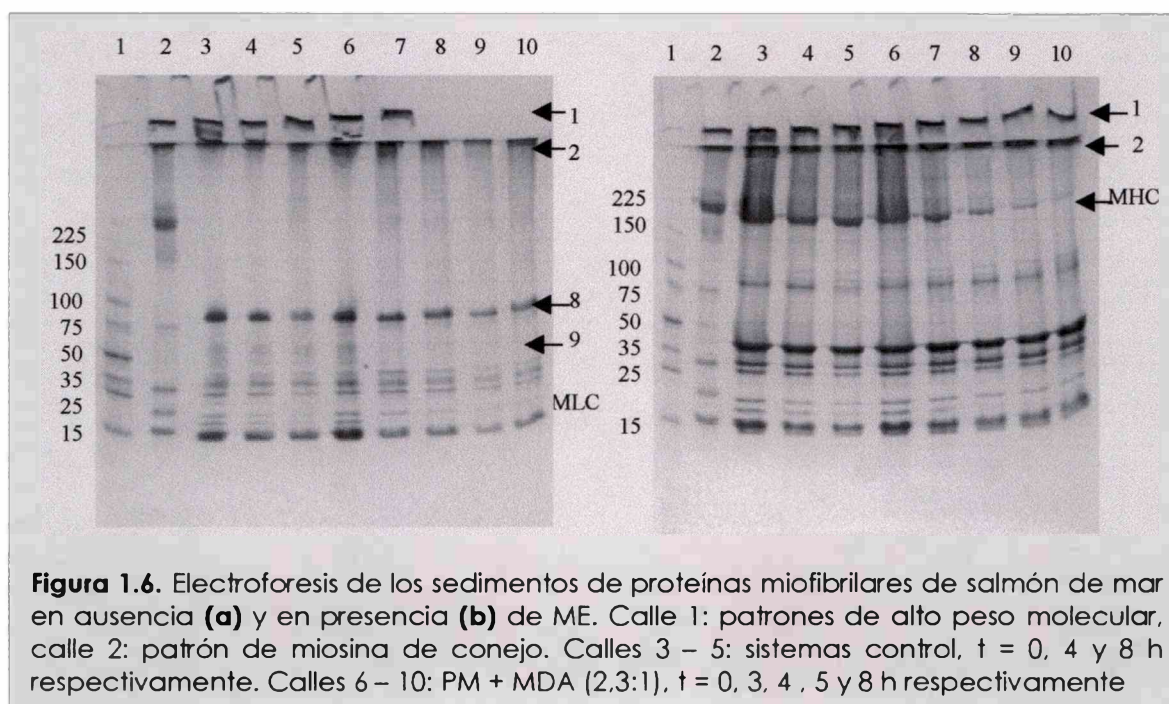


**b. Efecto de la incubación a 27°C:** No se observaron cambios significativos en los perfiles proteicos de los sistemas control en función del tiempo de incubación a 27°C, en ausencia y presencia de ME (**Figura 1.6.a y 1.6.b., calles 3, 4 y 5**).

**c. Efecto del tratamiento con MDA:** Es importante resaltar que los sistemas tratados con MDA presentaron una menor resuspensión de los sedimentos en función del tiempo de incubación. Dado que se esperaba un cambio en la concentración

final presente en dichas muestras, se decidió sembrar similares volúmenes de cada una de las muestras en cada calle (15  $\mu$ l).

La disminución en la cantidad de proteína en las muestras sin ME se produjo a expensas de una disminución en polipéptidos de muy alta masa molecular tales como la *banda 1* (no ingresa al gel apilador) y la *banda 2* (no ingresa al gel separador), así como también de la *bandas 8, 9* y las MLCs (**Figura 1.6.a, calles 6-10**). En el caso de las muestras con ME, se observó una leve disminución en la *banda 1* y un incremento de la *banda 2*. La cantidad de MHC resuspendida a partir del sedimento disminuyó notablemente en función del tiempo de incubación con MDA (**Figura 1.6.b, calles 6-10**).



### 1.3.2.2. SDS-PAGE bidimensional

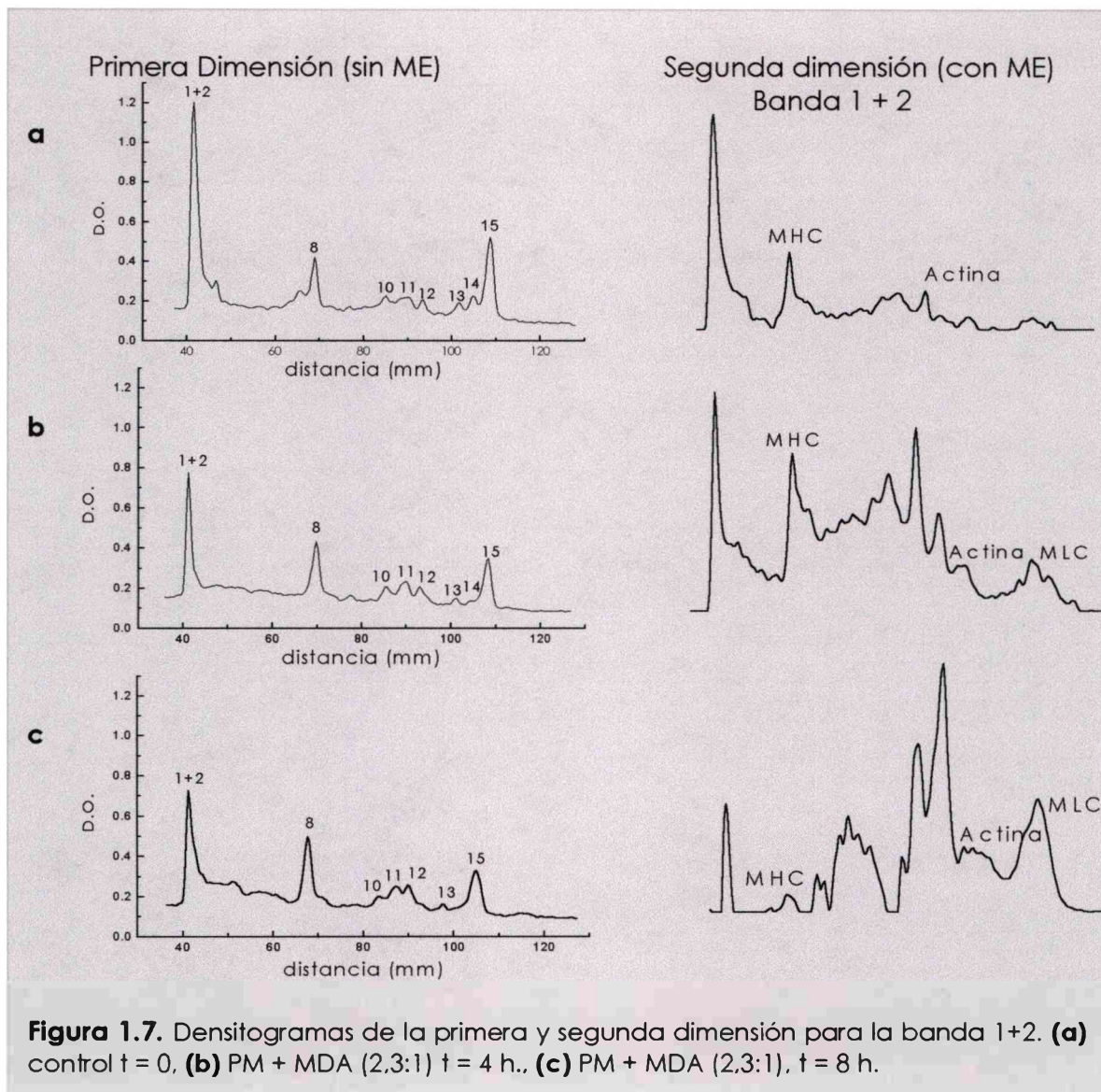
Se realizaron ensayos de electroforesis bidimensional a fin de analizar las proteínas que componían las bandas 1 y 2. La primera dimensión (sin ME) se corrió en un gel en gradiente (3-15% de acrilamida) sin gel apilador, por lo que las bandas 1 y 2 se transformaron en una sola banda ubicada en el borde superior de la primera dimensión. La segunda dimensión se corrió en presencia de ME.

Como ya fue mencionado en la sección anterior, las bandas 1 y 2 presentaron una menor intensidad en función del tiempo de incubación con MDA, lo cual puede observarse en los densitogramas correspondientes a la primera dimensión (**Figura 1.7.- banda 1+2**).

En el densitograma correspondiente a la segunda dimensión del sistema control ( $t = 0$ ) puede observarse que la banda 1+2 está constituida por proteínas de alto peso molecular, las cuales no pudieron ingresar al gel de la segunda dimensión (una gran proporción), miosina y actina –probablemente en forma de actomiosina- y algunas otras proteínas en baja proporción (**Figura 1.7.a**). Estos resultados sugieren la presencia en el músculo de salmón de mar de proteínas miofibrilares agregadas a través de interacciones probablemente de tipo covalente, distintas de puentes disulfuro, dado que el SDS, la urea y el ME no fueron capaces de romper dichas especies proteicas de alto peso molecular.

Luego de 4 h y 8 h de incubación con MDA, se observó un aumento en la proporción relativa de bandas con masa moleculares entre 35 y 100 kD (**Figura 1.7.b y 1.7.c.**). Estas proteínas podrían haberse agregado en presencia de MDA a través de la formación de puentes disulfuro por lo cual se encuentran formando parte de la banda 1+2. También puede observarse una disminución en la intensidad de la MHC, muy evidente a  $t = 8$  h.

Los estudios de electroforesis realizados sugieren que el MDA estaba afectando notablemente la solubilidad de las proteínas miofibrilares, lo cual podría ocurrir posiblemente a través de la formación de agregados. La MHC fue notoriamente afectada por estas alteraciones, su intensidad disminuyó aún en presencia de SDS, urea y ME, lo cual indicaría su participación en el proceso de insolubilización a través de interacciones covalentes, distintas de los puentes disulfuro. También pudo observarse que otras proteínas miofibrilares participaron en la formación de especies de alta masa molecular a través de puentes disulfuro, las cuales pudieron ser redisueltas a partir del sedimento. Estudios previos indican que el MDA produce entrecruzamientos y polimerización proteica (Chio y Tappel, 1969a y 1969b; Braddock y Dugan, 1973; Li y King, 1999), lo cual se correlaciona con los resultados expuestos.



### 1.3.3. Solubilidad proteica

#### 1.3.3.1. Solubilidad en buffer con KCl 0,6 M

La solubilidad de las proteínas es un parámetro de fundamental importancia ya que refleja posibles modificaciones estructurales tales como la desnaturalización con agregación, así como también es un indicador de la funcionalidad potencial de la proteína, ya que muchas veces se considera que la solubilización es un paso previo en procesos tales como la gelación y la emulsificación.

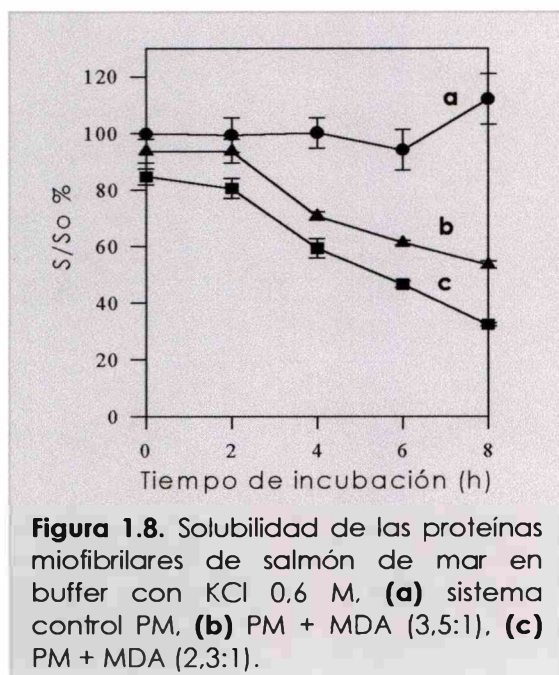


A fin de estudiar la evolución de este parámetro se analizó en primer término, la solubilidad de las proteínas miofibrilares de salmón de mar en solución buffer conteniendo KCl 0,6 M a 4°C, determinando posibles cambios debido a la interacción proteínas - MDA. La concentración de proteínas solubles en los sobrenadantes se determinó mediante el método de Biuret. Cabe señalar que no se tenían datos acerca de una posible interferencia del MDA en la determinación, por lo cual se realizaron curvas de calibración con seroalbúmina bovina en presencia de MDA, no obteniéndose diferencias con respecto a la curva obtenida sin MDA.

En las condiciones de este ensayo, las proteínas miofibrilares de salmón de mar presentaron valores relativamente bajos de solubilidad ( $52 \pm 2 \%$ ), no registrándose diferencias significativas para el sistema control en función del tiempo de incubación a 27°C (**Figura 1.8.a**).

**Efecto del tratamiento con MDA:** El efecto de la interacción con MDA sobre la solubilidad proteica puede observarse en la **Figura 1.8**. Los resultados obtenidos a cada tiempo de incubación se expresan como el porcentaje de solubilidad de las proteínas tratadas con MDA (S) con respecto al sistema control a  $t = 0$  ( $S_0$ ).

En términos generales, puede observarse que el MDA produjo una disminución de la solubilidad de las proteínas miofibrilares, lo que se correlaciona



con las observaciones mostradas en la sección 1.3.2.. En el caso del tratamiento con MDA en relación 3,5:1 (**Figura 1.8.b**), no se observaron diferencias significativas para  $t = 0$  y 2 h de incubación, produciéndose un brusco descenso de la solubilidad entre las 2 y 4 h. Posteriormente, dicho parámetro continuó descendiendo con una pendiente mucho menor, alcanzando un 53 % de la solubilidad del sistema inicial a las 8 h de incubación.

Además, los efectos del MDA se acentuaron con la concentración. Cuando la relación proteínas : MDA fue 2,3:1 (**Figura 1.8.c.**), pudo observarse una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en la solubilidad a  $t = 0$ , indicando que el tiempo transcurrido entre la preparación del sistema y la determinación de la solubilidad fue suficiente para la ocurrencia de algún tipo de interacción. Al igual que en el caso anterior, el descenso más importante se produjo entre las 2 y 4 h de incubación, pero entre las 4 y 8 h esta variación fue más rápida que en el caso del sistema con menor concentración de MDA. La solubilidad a  $t = 4$  h y 8 h fue 59 y 32 % del sistema original, respectivamente. Las diferencias entre los sistemas con distintas concentraciones de MDA fueron significativas ( $p < 0,05$ ) para todos los tiempos de incubación.

Estos cambios en la solubilidad de las proteínas miofibrilares sugieren que la reacción con MDA estaría induciendo la formación de agregados insolubles. Al igual que en los ensayos de DSC, puede observarse que los cambios más importantes ocurrieron en las primeras 4 h de incubación. Relacionando ambos estudios, puede plantearse una correlación entre la pérdida de la estructura nativa de las proteínas miofibrilares –principalmente de la miosina- y la agregación de las mismas, lo cual trae como consecuencia una importante pérdida de la solubilidad.

### **1.3.3.2. SDS-PAGE de las fracciones solubles en buffer con KCl 0,6 M**

Las fracciones solubles obtenidas en el punto anterior fueron analizadas mediante SDS-PAGE a fin de conocer cuáles eran las especies proteicas que permanecían solubles luego del tratamiento con MDA. Así, las muestras fueron tratadas con solución buffer muestra conteniendo SDS y urea (condiciones disociantes) en ausencia y en presencia de ME, siendo analizadas en geles en gradiente (3-15% de acrilamida). En todas las calles se sembraron 30  $\mu\text{g}$  de proteína. En la sección **1.3.2.** fue decripto el perfil típico de las proteínas miofibrilares.

**a. Efecto de la incubación a 27°C:** Las muestras control a  $t = 4$  y  $8$  h de incubación presentaron una disminución de la *MHC* y un aumento de la *banda 2* en ausencia de ME (**Figura 1.9.a, calles 2 y 3**, respectivamente). Sin embargo, en presencia de ME la intensidad de dichas bandas no varió en función del tiempo de incubación. Esto indicaría una interacción entre moléculas de miosina a través de puentes disulfuro durante la incubación a  $27$  °C, formando especies de mayor masa molecular, las cuales permanecen en la fracción soluble. Esta información se correlaciona con los datos de solubilidad mostrados anteriormente, ya que no se registraron cambios en la solubilidad a  $t = 0$ .

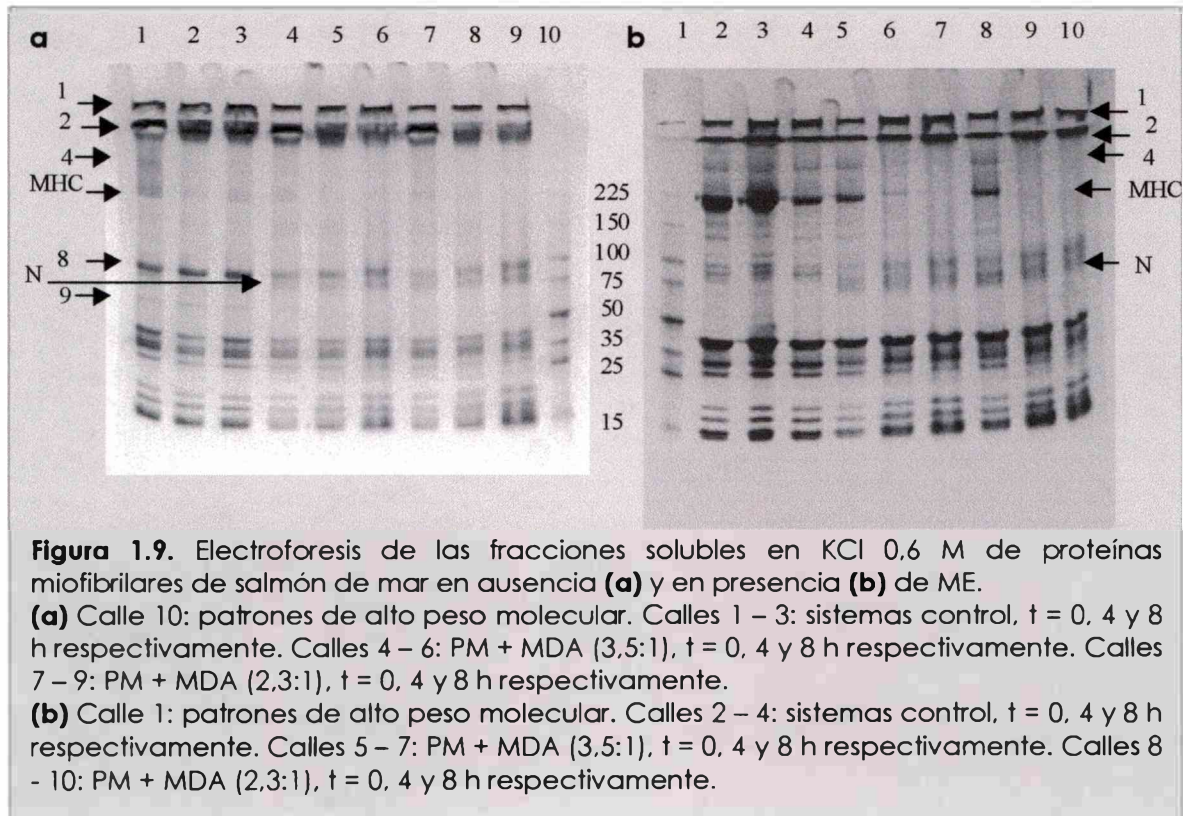
**b. Efecto del tratamiento con MDA:** Los perfiles electroforéticos de las muestras tratadas con MDA mostraron alteraciones con respecto a los sistemas control. Estas alteraciones fueron cualitativamente semejantes para ambas concentraciones de MDA, aunque cuantitativamente más importantes en las muestras con mayor concentración (2,3:1).

El cambio más evidente observado fue una disminución en la intensidad de la *MHC*. A  $t = 0$  ya fue posible registrar esta alteración en la muestra sin ME (**Figura 1.9.a, calle 4**). Sin embargo, cuando la misma fue tratada con ME apareció la banda de *MHC* con una intensidad apenas menor que la de su control (**Figura 1.9.b, calle 4**). Por otra parte, a  $t = 4$  y  $8$  h, la disminución de esta banda fue más evidente prácticamente desapareciendo del perfil electroforético (**Figura 1.9.a, calles 5 y 6**), ocurriendo aún en presencia de ME (**Figura 1.9.b, calles 5 y 6**).

También fue posible observar una disminución en la intensidad de otras bandas tales como la *banda 2*, la *banda 4* ( $292 \pm 6$  kD), la *banda 8* ( $81 \pm 3$  kD) y la *banda 9* ( $53 \pm 1$  kD), indicando que todos estos polipéptidos podrían estar participando en el proceso de agregación comentado previamente.

Otra alteración en las muestras con MDA fue la aparición de una banda nueva (*banda N*) con una masa molecular de alrededor de  $71$  kD, la cual se registra tanto en ausencia como en presencia de ME. Podrían plantearse dos hipótesis acerca de este hecho: 1) la agregación de moléculas de menor masa molecular, la cual debería darse a través de enlaces de tipo covalente no puentes disulfuro, dado que la banda aparece en ambos geles SDS-PAGE (sin y

con ME); 2) la fragmentación de algún polipéptido de masa mayor, generando esta especie de 71 kD.



### 1.3.3.3. Solubilidad en diferentes medios

A fin de profundizar el estudio de la solubilidad de las proteínas, se trataron las diferentes muestras con buffer KCl 0,6 M (pH 7,0) (*buffer 1*) conteniendo distintos agentes caotrópicos como SDS y urea (*buffer 2*) o bien SDS, urea y ME (*buffer 3*). Posteriormente, las mismas fueron centrifugadas, determinándose la concentración proteica en el sobrenadante tal como se indicó en la sección **1.2.5.2. de Materiales y Métodos.**

Cabe señalar que estos ensayos y otros posteriores se realizaron sólo sobre los sistemas con relación proteína : MDA 2,3:1, utilizando las condiciones más desfavorables a fin de poner de manifiesto las mayores alteraciones posibles en el tiempo del ensayo.

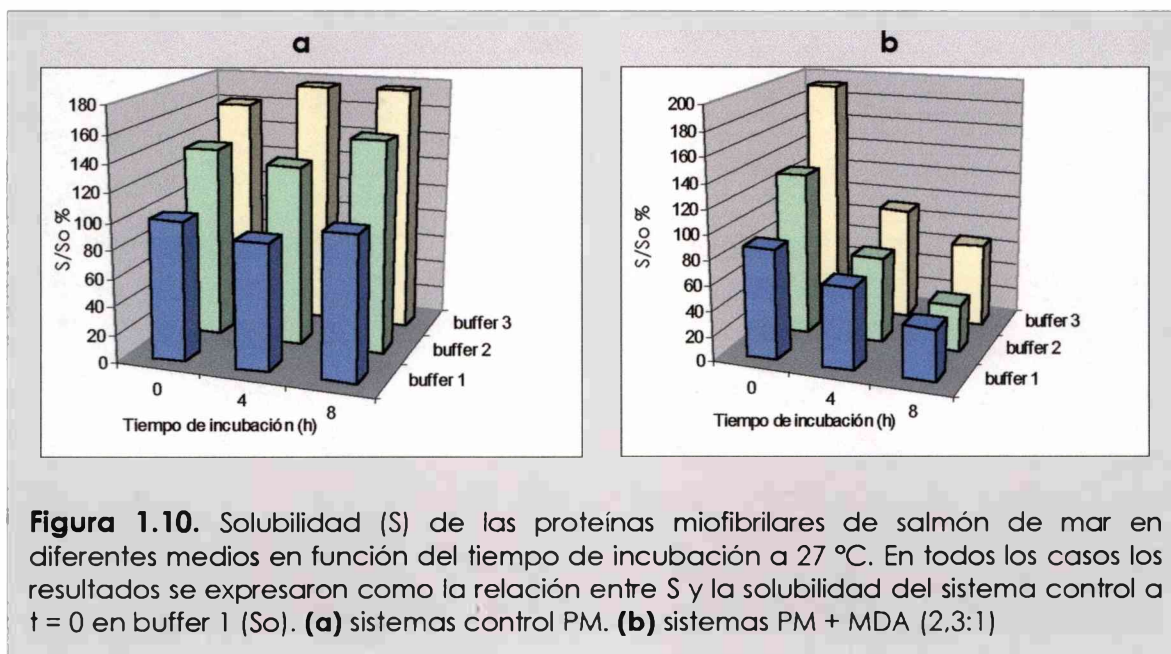
**Sistemas control:** La solubilidad de los sistemas control no se modificó en función del tiempo de incubación a 27°C, para ninguno de los sistemas buffer estudiados (**Figura 1.10.a**).

En presencia de SDS y urea (buffer 2), se registró un incremento significativo de la solubilidad ( $p < 0,05$ ) respecto al buffer 1. De la misma manera, fue posible observar un aumento adicional en presencia de ME (buffer 3). Estos datos indican que las proteínas miofibrilares aisladas y suspendidas en buffer 1 presentan agregados estabilizados por uniones no covalentes como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, las cuales pueden ser desestabilizadas por SDS y urea; así como también por puentes disulfuro que se rompen por acción del ME (como ya fue analizado en los perfiles electroforéticos).

**Efecto del tratamiento con MDA:**

- *Muestras tratadas con buffer 1:* Como ya fue informado en el ítem **1.3.3.1**, la solubilidad del sistema PM + MDA a  $t = 0$  mostró una disminución con respecto al sistema control. En función del tiempo de incubación, dicha disminución se hizo más importante, presentando una solubilidad a  $t = 8$  h de aproximadamente el 40 % de la solubilidad inicial ( $S_0$ ) (**Figura 1.10.b**).
- *Muestras tratadas con buffer 2:* Las muestras no incubadas a 27°C ( $t = 0$ ) mostraron un aumento en la solubilidad proteica debido al efecto del SDS y la urea, alcanzando un valor similar al sistema control. Para  $t = 4$  y 8 h de incubación, las solubilidades presentaron valores similares a los obtenidos en ausencia de los agentes caotrópicos (**Figura 1.10.b**), indicando que las proteínas insolubilizadas por efecto del MDA se encontraban formando parte de agregados a través de uniones covalentes, las cuales no pueden ser desestabilizadas por SDS y urea.
- *Muestra tratadas con buffer 3:* Al igual que en el caso anterior, a  $t = 0$ , la solubilidad fue similar a la del sistema control (**Figura 1.10.b**). En función del tiempo de incubación este valor fue disminuyendo, haciéndose significativamente menor que el del sistema control ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, a diferencia del tratamiento con buffer 2, los valores

alcanzados fueron algo superiores a los correspondientes al buffer 1, sugiriendo la presencia de algún tipo de agregado estabilizado por puentes disulfuro. Sin embargo, este tipo de uniones no explican el total de las alteraciones proteicas ocasionadas por el MDA, dado que la solubilidad en presencia de ME fue muy inferior a la de los sistemas control.



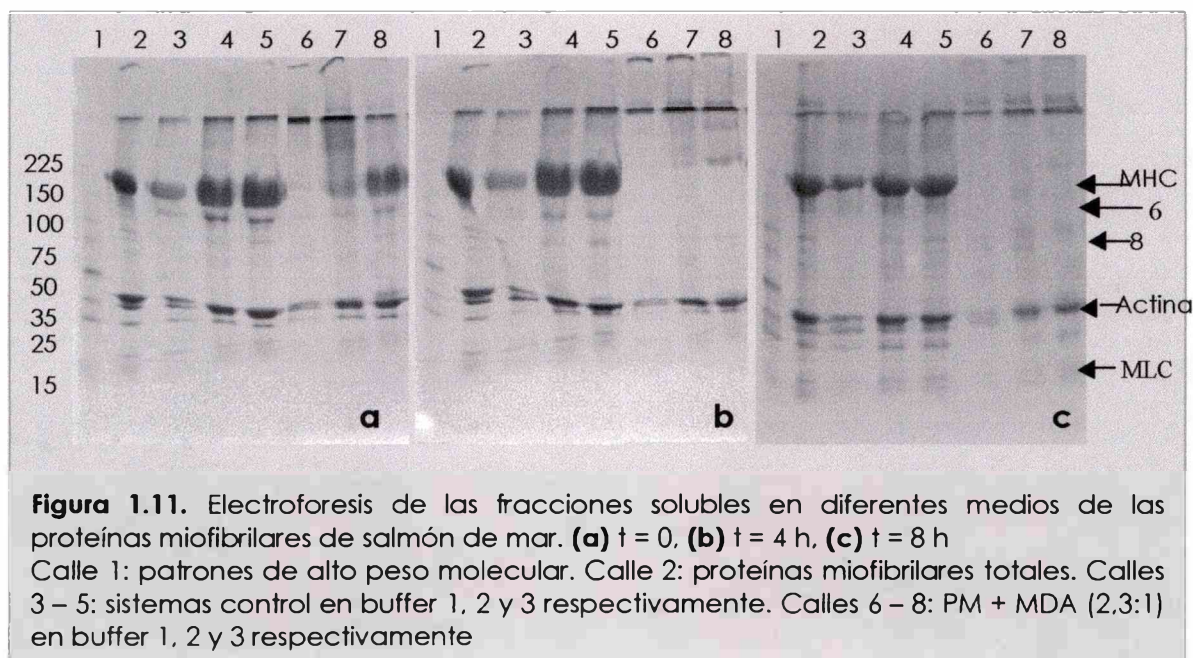
#### 1.3.3.4. SDS-PAGE de las fracciones solubles en diferentes medios

El estudio de las fracciones solubles mediante SDS-PAGE se realizó en forma similar a lo expuesto en el punto 1.3.3.2., aunque en este caso sólo se utilizó buffer muestra con ME (no se corrieron muestras con buffer muestra sin ME ya que en algunos casos ya habían sido previamente tratadas en estas condiciones).

**Sistemas control:** El tratamiento previo con agentes caotrópicos (SDS y urea) y ME produjo un importante aumento en la intensidad de la banda de MHC, así como también en las bandas 6, 8 y actina (Figura 1.11.a., calles 4 y 5) con respecto a la muestra en buffer 1 (Figura 1.11.a, calle 3). Estas especies proteicas podrían ser las que formarían parte de los agregados en ausencia de dichas sustancias, responsables del aumento de solubilidad en solución buffer 2 y 3, tal como se

mencionó anteriormente. Los perfiles electroforéticos para  $t = 4$  y  $8$  h fueron similares que para  $t = 0$ , para las tres soluciones buffer utilizadas (**Figura 1.11.b y 1.11.c, calles 3, 4 y 5**).

**Efecto del tratamiento con MDA:** Los sistemas PM + MDA a  $t = 0$  tratados con buffer 1 mostraron una disminución en la MHC, en la *banda 6* y en la *actina*, así como un incremento en la banda que no ingresa al gel separador (*banda 2*) (**Figura 1.11.a, calle 6**). Estas observaciones sugieren la formación de alguna especie proteica de alta masa molecular que permanece en la fracción soluble. Cuando estas muestras fueron tratadas con SDS y urea, se incrementó la intensidad de aquellas bandas que habían disminuido, aunque permanecieron con intensidades algo menores que las correspondientes a los sistemas control (**Figura 1.11.a, calle 7**). En presencia de ME, el perfil proteico fue similar al de la muestra control (**Figura 1.11.a, calle 8**). Por lo tanto, se puede sugerir que a  $t = 0$  en presencia de MDA, se produjo la formación de especies proteicas de alta masa molecular a través de interacciones de tipo no covalente y de puentes disulfuro.



Luego de 4 y 8 h de incubación a  $27^{\circ}\text{C}$ , la disminución en algunas bandas (MHC, 6, 8, *actina* y MLCs) fue muy notoria (**Figura 1.11.b y 1.11.c, calle 6**). El tratamiento con SDS y urea produjo un aumento de la intensidad de la *actina*

pero prácticamente no tuvo efecto sobre las otras proteínas (**Figura 1.11.b y 1.11.c, calle 7**). En presencia de ME se observó un pequeño incremento en la *MHC* (más evidente a  $t = 4$  h que a  $t = 8$  h) (**Figura 1.11.b y 1.11.c, calle 8**).

Estos resultados en conjunción con las determinaciones de la solubilidad en distintos medios, indican que en este sistema modelo, el MDA indujo la formación de agregados insolubles a través de algún tipo de entrecruzamiento de naturaleza covalente (no puentes disulfuro). En este proceso de agregación participó principalmente la *MHC* y además, otras proteínas tales como las especies 6 (132 kD) y 8 (81 kD). Por otra lado, la *actina* y una pequeña fracción de la *MHC* no estarían involucradas en la formación de los agregados insolubles ya que aparecen en las muestras tratadas con ME.

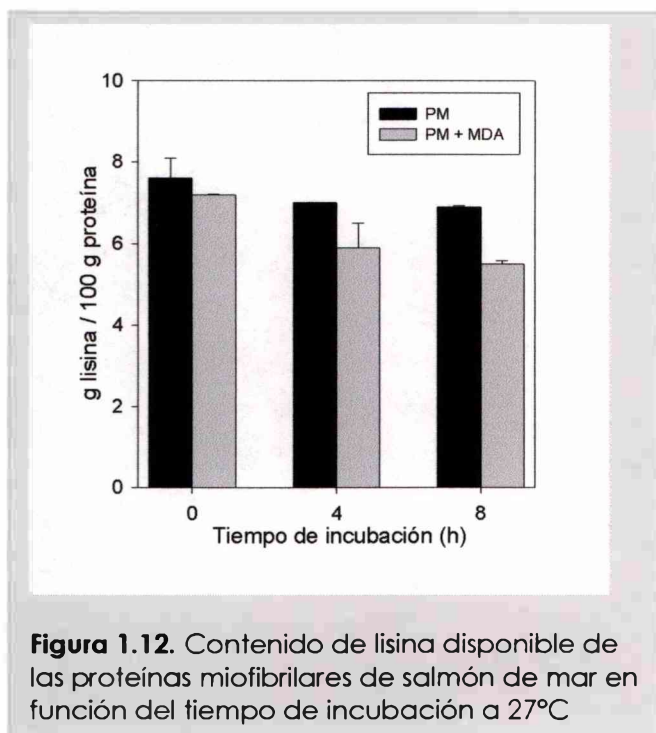
#### **1.3.4. Lisina disponible**

Es conocido que las sustancias de naturaleza carbonílica como el MDA pueden participar en un ataque nucleofílico sobre grupos amino libres, tal como puede ser el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina. Por lo tanto, se realizaron estudios a fin de comprobar si este tipo de reacción ocurría en el sistema modelo en estudio y en qué medida afectaba a las proteínas miofibrilares de salmón de mar, dadas las consecuencias que tiene a nivel nutricional.

Para realizar las determinaciones del contenido de lisina disponible se utilizaron sistemas con una relación proteína : MDA 5:1 (ver sección **1.2.6. – Materiales y Métodos**). En este caso, los sistemas fueron preparados por pesada de la suspensión proteica, a efectos de conocer la cantidad exacta de proteína en cada sistema -a través de la determinación de la densidad de la suspensión y de su concentración por Biuret-, debido a la dificultad de medir volúmenes exactos de suspensiones tan viscosas de proteínas miofibrilares como las usadas en estos ensayos. Por otra parte, la mayor relación de proteína : MDA empleada en este ensayo estuvo dada por la dificultad de obtener sistemas con la concentración proteica requerida y con relaciones más bajas.



Los resultados se expresaron como g de lisina/100 g de proteínas, tal como se muestra en la **Figura 1.12**.



Los sistemas control no mostraron diferencias significativas en el contenido de lisina disponible en función del tiempo de incubación a 27°C. El valor promedio obtenido para estos sistemas fue de  $7,2 \pm 0,6$  g lisina / 100 g de proteínas miofibrilares.

De la misma manera, el sistema PM + MDA sin incubación previa a 27°C no presentó diferencias significativas con respecto a su sistema control. Estos resultados estarían de acuerdo

con el hecho de que este sistema no presentó formación de agregados vía uniones covalentes (distintas de puentes disulfuro), tal como fue demostrado en los ensayos de solubilidad y electroforesis previamente comentados.

En cambio, las muestras incubadas durante 4 y 8 h evidenciaron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en su contenido de lisina disponible, con una reducción de aproximadamente el 16 y el 20 % a  $t = 4$  y 8 h, respectivamente. Análogamente a lo expuesto con anterioridad, podemos observar que la alteración más importante ocurre dentro de las primeras 4 h en las presentes condiciones de ensayo acelerado.

La reducción en la cantidad de grupos  $\epsilon$ -amino libres de la lisina puede explicar –al menos parcialmente– la formación de agregados insolubles previamente descrita. Buttkus (1967) informó que el MDA modificaba entre el 50 y el 60 % de los grupos  $\epsilon$ -amino de miosina de trucha a temperatura ambiente, reaccionando alrededor del 40 % dentro de las primeras 8 h. La diferencia entre este porcentaje y el del presente trabajo podría deberse a que en este caso los sistemas de estudio están constituidos por el extracto total de proteínas

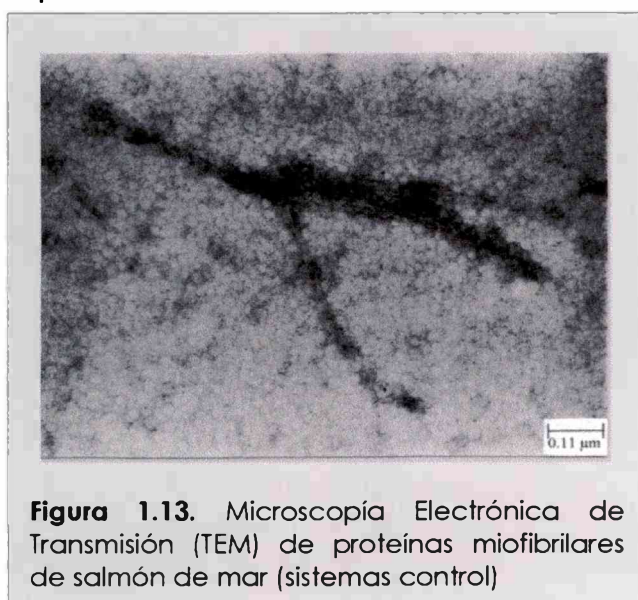
miofibrilares, mientras que el mencionado autor centró su investigación sobre miosina aislada, la cual es, probablemente, la proteína más afectada. Más recientemente, Li y King (1999) observaron una disminución (22,5 %) en los grupos amino libres del subfragmento 1 de miosina de conejo tratada con MDA durante 4 h a 37°C.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el MDA también podría reaccionar con otros residuos aminoacídicos tales como histidina, tirosina, arginina y metionina (Buttkus, 1967; Braddock y Dugan, 1973), los cuales podrían también estar involucrados en la formación de los agregados.

Es importante notar que este estudio se realizó con sistemas que tenían una mayor proporción de proteínas que en los otros casos, por lo que los efectos cuantitativos del MDA podrían no correlacionarse exactamente con los observados en los otros ensayos. Sin embargo, existe una correlación cualitativa entre los resultados de este estudio y el resto de los mismos; como se mencionó anteriormente, menores concentraciones de MDA producirían los mismos efectos pero en tiempos mayores.

### 1.3.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Los resultados hasta aquí expuestos demostraron que el MDA induce importantes alteraciones estructurales en las proteínas miofibrilares de salmón de mar, siendo una alteración fundamental, la agregación. Por



ello, se investigó la posibilidad de obtener información acerca de la microestructura de los distintos sistemas ensayados mediante microscopía electrónica de transmisión.

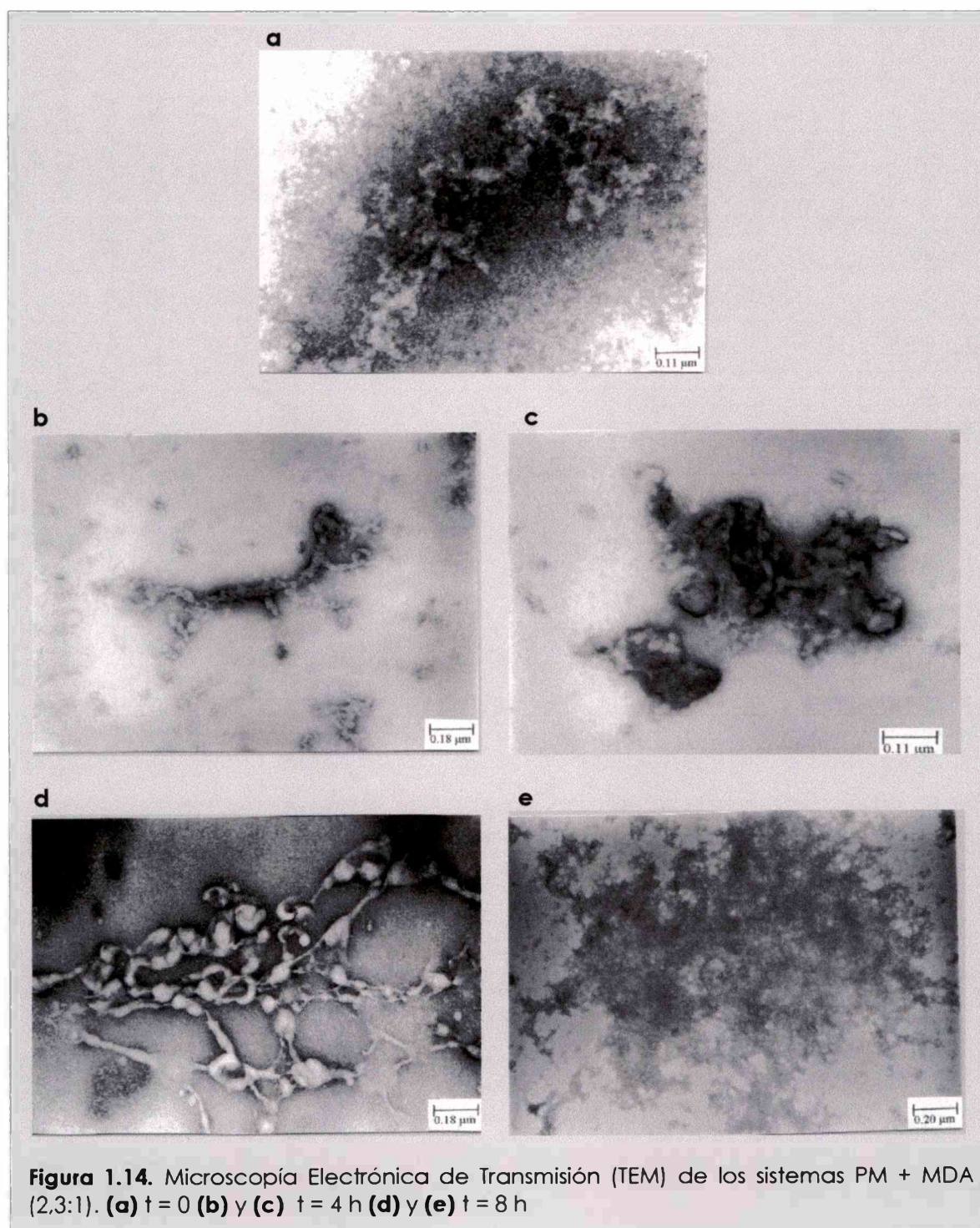
Los sistemas de proteínas miofibrilares control presentaron -a

todos los tiempos de incubación- estructuras filamentosas (**Figura 1.13.**). A partir de las micrografías pudieron estimarse las dimensiones de dichos filamentos, siendo los mismos de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de largo y 0,01  $\mu\text{m}$  de ancho. Los filamentos observados pueden vincularse con la presencia de actomiosina en las muestras, la cual presenta al microscopio electrónico típicas estructuras filamentosas en cabeza de flecha (Roura y col.,1992; Sano y col., 1994).

En el caso de los sistemas tratados con MDA, se observaron cambios importantes en la estructura de los filamentos, los cuales se acentuaron con el tiempo de incubación. A  $t = 0$  ya se observaron alteraciones: los filamentos no mostraban la forma lineal típica y eran más anchos que los presentados por los sistemas control (**Figura 1.14.a**). Como fue determinado mediante los estudios de solubilidad y electroforesis, a  $t = 0$ , el MDA indujo la formación de especies de alto peso molecular, lo cual podría estar vinculado con los cambios observadas en la estructura de los filamentos.

Luego de 4 h de incubación, se hizo muy evidente la formación de agregados. Las **Figuras 1.14.b.** y **1.14.c** muestran dos de los diferentes tipos de estructuras encontradas en esta muestra. En el primer caso puede observarse una estructura larga filamentosa (aproximadamente 0,02  $\mu\text{m}$  de ancho) unida a otras porciones más pequeñas y en el otro caso, un agregado constituido por estructuras deformadas y plegadas sobre sí mismas. Es importante hacer notar que a  $t = 4$  y 8 h se observaron varias estructuras diferentes en distintos campos, lo cual evidenciaría la presencia de proteínas con distintos grados de alteración.

A  $t = 8$  h, fue posible visualizar aún mayores modificaciones. La **Figura 1.14.d.** presenta una estructura tipo red constituida por zonas irregulares con regiones ensanchadas. Por otra parte, la **Figura 1.14.e.** muestra una imagen obtenida con menor magnificación, donde puede apreciarse la formación de un agregado de dimensiones muy importantes.



## **B. ASPECTOS FUNCIONALES: GELACIÓN TÉRMICA**

La gelación térmica de las proteínas miofibrilares es una propiedad funcional muy importante, especialmente en el caso de pescado, dada la gran variedad de alimentos obtenidos a partir de surimi. La formación de la red del gel contribuye a las características texturales, así como también a la retención de agua y de grasa por parte del producto. Dadas las implicancias de este proceso en la tecnología de los alimentos de origen marino, se propuso estudiar la gelación térmica de las proteínas miofibrilares de salmón de mar y el efecto de la interacción con MDA, utilizando los sistemas modelo. En los estudios anteriores pudo demostrarse que la miosina es altamente afectada por la reacción con MDA, causando su desnaturalización y agregación. Teniendo en cuenta que la miosina es la proteína miofibrilar responsable del proceso de gelación, las alteraciones causadas por el MDA en su estructura podrían tener consecuencias sobre dicho proceso.

El proceso de gelación térmica de las proteínas miofibrilares de salmón de mar y las implicancias de su interacción con MDA fueron estudiados bajo diferentes aspectos. En primer término, se realizaron experiencias a fin de seleccionar la concentración proteica necesaria para la formación de los geles. Así, las suspensiones conteniendo distintas concentraciones de proteínas se sometieron a calentamiento (80 °C, 45 min). De esta manera pudo determinarse que concentraciones proteicas de 10, 12 y 15 mg/ml producían geles pequeños y de escasa consistencia, seleccionándose una concentración de 20 mg/ml para la realización de los estudios posteriores. La temperatura de gelación (80°C) fue seleccionada teniendo en cuenta las temperaturas de desnaturalización térmica de la miosina y actina, previamente determinadas mediante DSC (sección **1.3.1. – Resultados y Discusión**).

Cabe aclarar que gran parte de los estudios que se desarrollarán a continuación fueron realizados con sistemas que tenían una relación proteína : MDA de 5:1 en virtud de los comentarios detallados en las secciones **1.2.9.** y **1.2.10- Materiales y Métodos.**

### **1.3.6. Formación de estructuras tipo gel por efecto del MDA sin tratamiento térmico.**

Durante el desarrollo de las distintas experiencias realizadas con sistemas modelo, se observaron cambios macroscópicos en la viscosidad y consistencia de las suspensiones proteicas. En los sistemas con altas concentraciones de proteínas (20 mg/ml), este hecho se hizo muy evidente, observándose la formación de estructuras "tipo gel" en las muestras tratadas con MDA e incubadas a 27°C. Este fenómeno también ha sido informado por Buttkus (1967), al afirmar que la miosina adquiría una consistencia tipo gel debido a su reacción con MDA.

Teniendo en cuenta estas observaciones, se realizó una experiencia a fin de poner en evidencia la formación de esas estructuras y además, analizar si concentraciones más bajas de MDA eran capaces de inducirlos. Así, se prepararon sistemas modelo con distintas relaciones proteína : MDA : 5:1, 50:1, 100:1, 500:1 y el sistema control sin MDA, incubándose cada uno de ellos a 27 °C.

#### **1.3.6.1. Efecto de la concentración de MDA : observación macroscópica**

Los sistemas fueron observados macroscópicamente en función del tiempo de incubación. La **Tabla 1.2.** muestra un resumen de las observaciones realizadas. Se visualizaron dos eventos importantes durante la incubación: en primer término la formación de una "masa sólida" continua y posteriormente, la separación de dos fases: una sólida (estructura tipo gel) y un líquido exudado. Los sistemas control no mostraron alteraciones durante el período de incubación.

En la tabla puede observarse que todos los sistemas presentaron la misma secuencia de modificaciones. Sin embargo, dichos cambios ocurrieron a distintos tiempos de incubación en función de la concentración de MDA presente en el sistema. Estos resultados evidencian que, aún en presencia de bajas concentraciones de MDA, puede ocurrir una modificación de las proteínas miofibrilares aunque se requerirá un mayor tiempo de interacción.

**Tabla 1.2.** Formación de estructuras "tipo gel" con distintas relaciones proteína : MDA

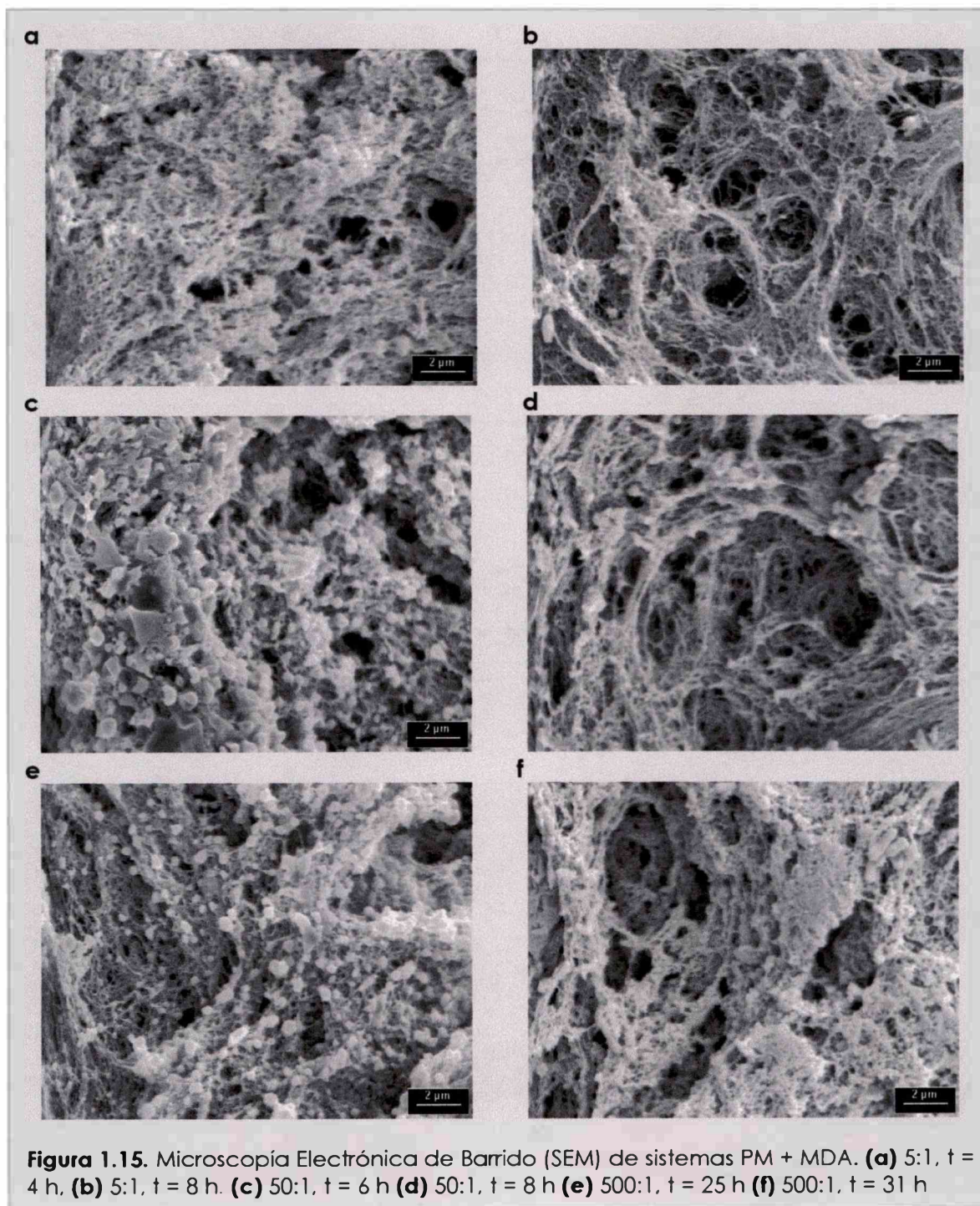
Tiempo (h)	Relación proteína : MDA			
	500:1	100:1	50:1	5:1
2	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	Masa sólida tipo gelatina
4	Sin cambios	Sin cambios	Masa sólida incipiente	Masa sólida (consistente) + líquido
6	Sin cambios	Aumento de Viscosidad	Masa sólida poco consistente	
8	Aumento de Viscosidad	Masa sólida incipiente	Masa sólida (consistente) + líquido	
25	Masa sólida poco consistente	Masa sólida poco consistente		
31	Masa sólida (consistente) + líquido	Masa sólida (consistente) + líquido		

### 1.3.6.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las estructuras tipo gel

A fin de conocer la microestructura de las "masas sólidas" formadas, se tomaron muestras de los diversos sistemas a distintos tiempos de incubación y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

La **Figura 1.15** muestra imágenes correspondientes a distintas condiciones concentración de MDA – tiempo. En general, podemos decir que se trata de redes muy similares a las obtenidas por calentamiento de las proteínas miofibrilares de salmón de mar tal como se mostrará en la sección 1.3.8.3. Para cada nivel de concentración, es posible observar modificaciones en las estructuras en función del tiempo de incubación. Así, las matrices fueron compactas, con poca presencia de huecos a tiempos cortos de incubación (**Figura 1.15 a , c y e**). En el caso de los sistemas 50:1 y 500:1, las masas sólidas recién formadas (6 y 25 h de incubación respectivamente) presentaron en su estructura formaciones de tipo globular (**Figura 1.15. c y e**). Las matrices obtenidas

a mayores tiempos estaban constituidas por filamentos más finos y presentaron mayor cantidad y tamaño de huecos, sugiriendo estructuras más ordenadas (**Figura 1.15. b, d y f**).

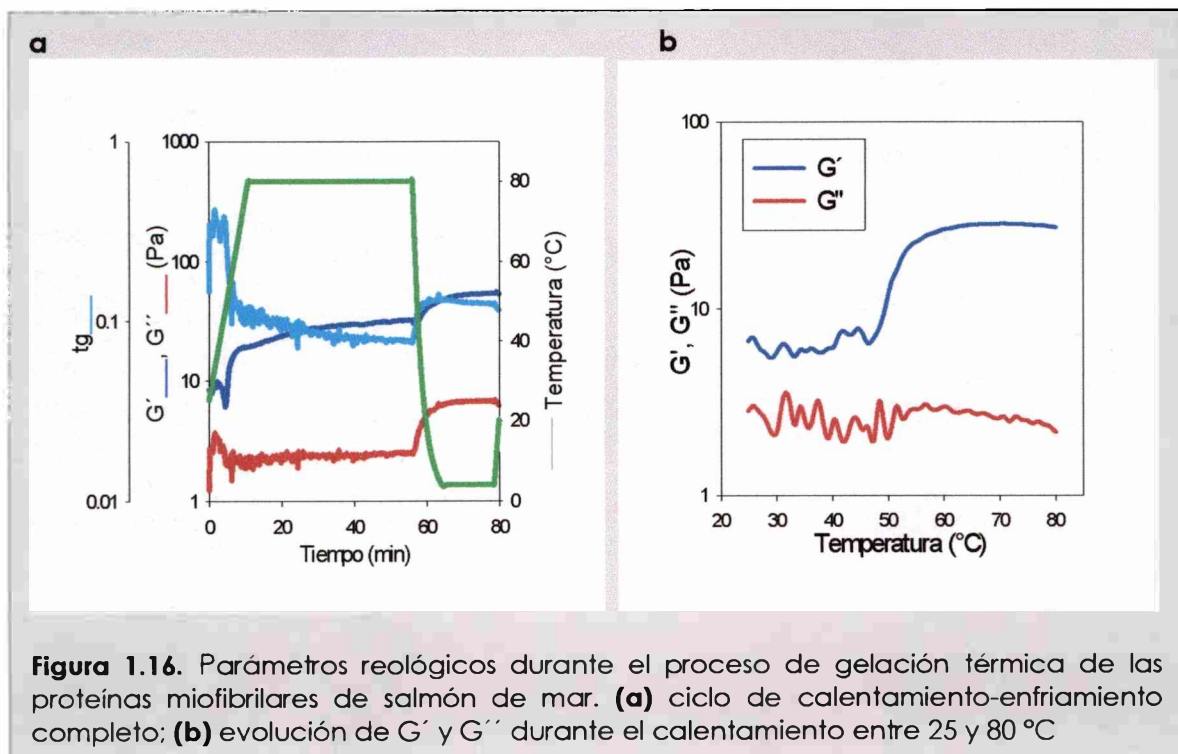




### 1.3.7. Seguimiento del proceso de gelación térmica mediante ensayos de viscoelasticidad lineal

Se estudió el proceso de gelación térmica de las proteínas miofibrilares de salmón de mar mediante la evolución de sus parámetros reológicos. Para ello, se sometió a las muestras a un programa de temperatura en el reómetro, de acuerdo con las siguientes etapas: a) calentamiento (25 - 80 °C a 5 °C/min), b) 80 °C - 45 min, c) enfriamiento (80 - 4 °C a 20 °C/min), d) 4 °C - 30 min. Las mediciones fueron realizadas a deformación ( $\gamma = 0,01\%$ ) y frecuencia ( $\omega = 1$  Hz) constantes. Cabe aclarar que el valor de  $\gamma$  utilizado corresponde a una situación de no destrucción de la muestra.

**Sistemas control:** La **Figura 1.16.a.** muestra la evolución de  $G'$ ,  $G''$  y  $\text{tg}(\delta)$  para las proteínas miofibrilares a  $t = 0$ . La medición de dichos parámetros antes de la aplicación del tratamiento térmico, mostró valores bajos de  $G'$  y  $G''$ , con valores de  $G'$  apenas por encima de  $G''$  siendo, por lo tanto, la  $\text{tg}(\delta)$  algo inferior a 0,5. Este comportamiento corresponde al de un sistema tipo gel "débil" (Steffe, 1996). Por lo tanto, la suspensión de proteínas miofibrilares en concentración de 20



**Figura 1.16.** Parámetros reológicos durante el proceso de gelación térmica de las proteínas miofibrilares de salmón de mar. **(a)** ciclo de calentamiento-enfriamiento completo; **(b)** evolución de  $G'$  y  $G''$  durante el calentamiento entre 25 y 80 °C

mg/ml no presenta un comportamiento propio de una solución sino de un sistema tipo gel, sugiriendo la existencia de interacciones entre las moléculas proteicas.

La evolución del módulo de almacenamiento  $G'$  permite analizar el proceso de gelación térmica. Durante la etapa de calentamiento -detallada en la **Figura 1.16.b.**- pudieron observarse pequeños aumentos en el parámetro  $G'$  entre 30 y 45 °C (temperaturas inferiores a la temperatura de desnaturalización térmica de la miosina). Dichos aumentos podrían estar relacionados con el fenómeno denominado "suwari" o "gel setting" observado en otras especies (Roussel y Chefftel, 1990). Según estos autores, este proceso podría ser producido por interacciones proteína-proteína dadas por un desplegamiento parcial de la miosina cuando es incubada a temperaturas entre 0 y 40 °C durante diferentes tiempos. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que esos pequeños cambios se deban simplemente a dispersiones en las mediciones, las cuales podrían deberse a inhomogeneidades en la muestra. A partir de 47-48 °C -temperatura intermedia entre la primera y segunda transición térmica de la miosina (ver **DSC - sección 1.3.1.**)- se observa un marcado incremento de  $G'$  hasta los 65°C, variando muy poco después de esta temperatura. Al llegar a 80 °C, el parámetro  $G'$  alcanzó valores entre 2,5 - 4 veces superiores a los iniciales. Durante la etapa de mantenimiento a 80°C, se produjo un incremento adicional de  $G'$ . Los mayores valores de  $G'$  en función del aumento de temperatura pueden atribuirse a un aumento en el número de interacciones hidrofóbicas entre las proteínas que están formando la matriz del gel, así como también a la formación de puentes disulfuro (Sano y col., 1994).

Al aplicar una etapa de enfriamiento y posterior mantenimiento a 4 °C, se observó un nuevo incremento en el parámetro  $G'$  (**Figura 1.16.a.**), sugiriendo una estabilización de la red mediante la formación de puentes de hidrógeno.

El módulo  $G''$  no presentó variaciones relevantes durante la etapa de calentamiento y mantenimiento constante a 80 °C, aunque sufrió un aumento importante al disminuir la temperatura desde 80 hasta 4 °C. El aumento en  $G''$  fue proporcionalmente mayor al aumento de  $G'$  durante el enfriamiento, por lo que se observa un aumento en la  $\tan(\delta)$ , indicando una disminución en la elasticidad de los geles (**Figura 1.16.a.**). Este comportamiento sugiere reestructuraciones de la

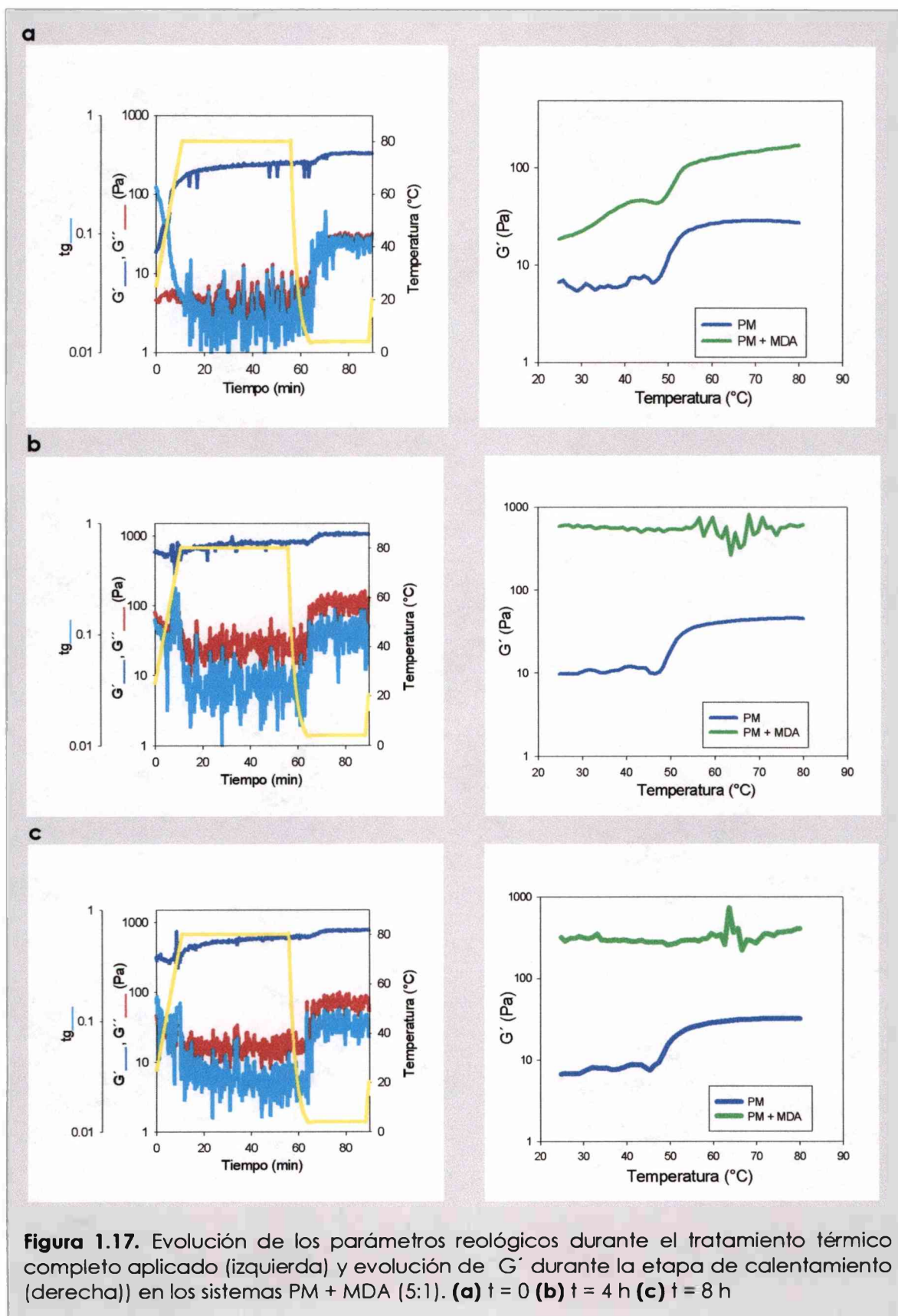
matriz durante la etapa de enfriamiento, posiblemente relacionadas, como se mencionó anteriormente, con la formación de puentes de hidrógeno.

Por otra parte, no se observaron diferencias en el comportamiento de los sistemas control a distintos tiempos de incubación a 27 °C (resultados no mostrados).

**Efecto del tratamiento con MDA:** Este estudio fue llevado a cabo en sistemas modelo con dos relaciones proteína : MDA diferentes (5:1 y 50:1), por lo que se expondrán los resultados obtenidos para cada uno de los mismos.

- *Sistemas PM + MDA 5:1:* Se encontraron notorias diferencias entre el sistema correspondiente a  $t = 0$  y los de  $t = 4$  y  $8$  h de incubación. Para  $t = 0$  (**Figura 1.17.a**) el valor inicial de  $G'$  fue superior al del sistema control, observándose luego un aumento progresivo de este módulo desde 25 hasta 43-44 °C. Este comportamiento sugiere algún tipo de interacción entre las proteínas inducida por la presencia del MDA, favorecida por el aumento de la temperatura. Al igual que en el sistema control, se observó un notorio incremento en  $G'$  a partir de los 48 °C, alcanzando a los 80°C un valor aproximadamente 8 veces mayor que el inicial (superior al control). Al mantenerse el sistema a 80°C durante 45 min se produjo un leve incremento del módulo de almacenamiento. Durante la etapa de enfriamiento, el valor de  $G'$  fue prácticamente constante aumentando levemente cuando el sistema se mantuvo a 4°C, 30 min. Esto sugiere una pobre estabilización de la matriz del gel a través de la formación de puentes de hidrógeno.

Luego de 4 y 8 h de incubación a 27°C, los valores iniciales de  $G'$  fueron significativamente superiores que los de los respectivos sistemas control, en correlación con la formación de estructuras tipo gel por efecto del MDA observadas. Durante la aplicación del programa de temperatura se observaron muy pequeñas variaciones, probablemente debidas a

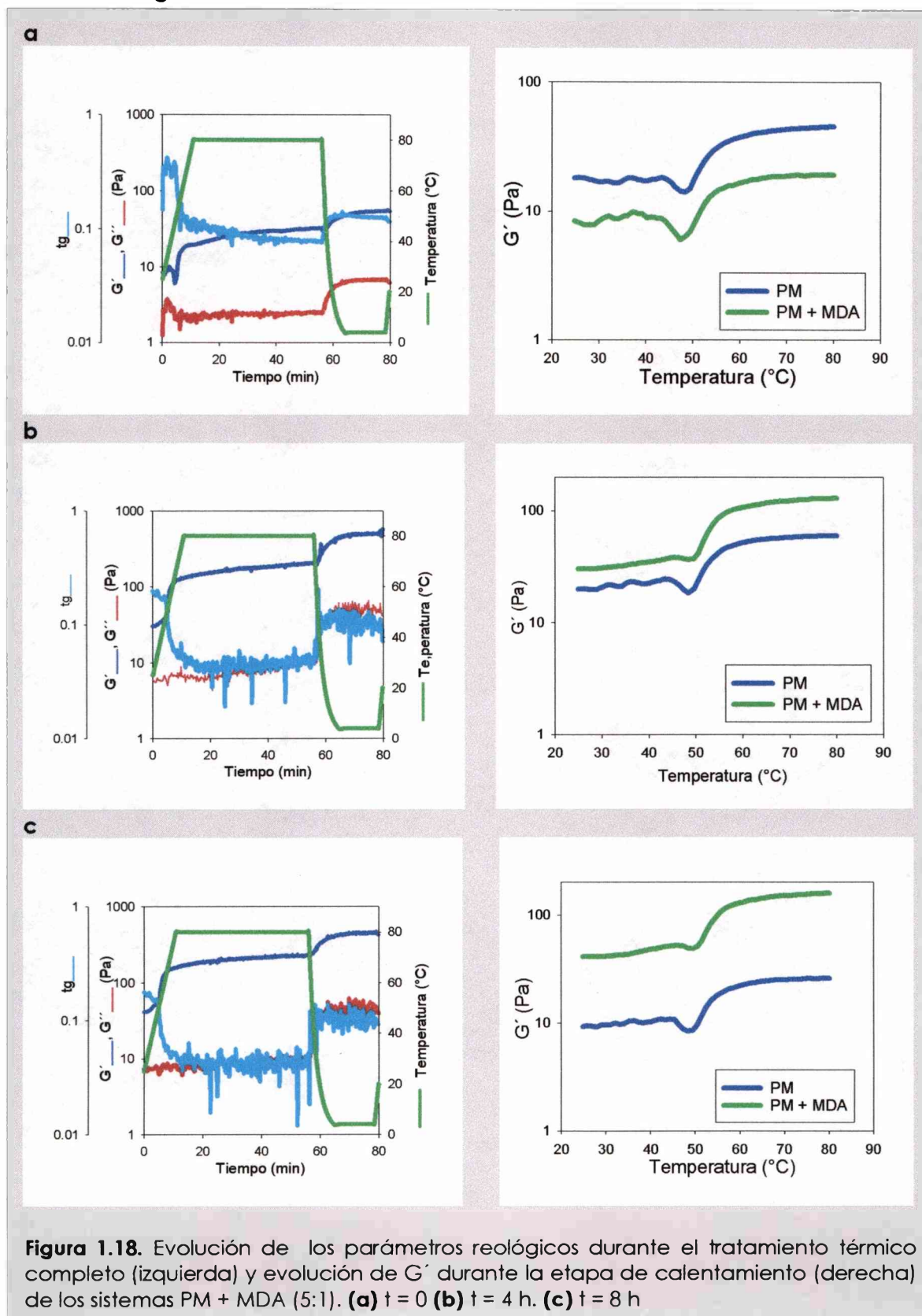


inhomogeneidades de la muestra (**Figuras 1.17.b y 1.17.c**). Por lo tanto, podemos decir que la matriz formada durante la incubación con MDA no experimentaría una estabilización adicional importante por interacciones hidrofóbicas, puentes disulfuro y/o puentes de hidrógeno durante las distintas etapas del tratamiento térmico aplicado. Los valores de  $G''$  fueron superiores a los de los sistemas control para  $t = 4$  y  $8$  h, manteniéndose aproximadamente constantes a lo largo del calentamiento, aumentando durante el enfriamiento hasta  $4$  °C, aunque en menor proporción que en el caso de los sistemas control.

- *Sistemas PM + MDA 50:1*: En este caso, la forma de los perfiles correspondientes a los sistemas con MDA fue similar a la de sus respectivos controles para todos los tiempos de incubación. Para  $t = 0$ ,  $G'$  y  $G''$  fueron menores que para los controles tanto los valores iniciales como los registrados luego de cada etapa de tratamiento térmico aplicada (**Figura 1.18.a**). Por otra parte, luego de  $4$  y  $8$  h de incubación a  $27$  °C, los sistemas presentaron valores iniciales superiores de  $G'$  y  $G''$  con respecto a los sistemas control, acentuándose la diferencia con el tiempo de incubación (**Figura 1.18. b y c**). Estos valores iniciales mayores podrían correlacionarse con la presencia de interacciones entre las proteínas dadas por la reacción con MDA.

A lo largo de la aplicación del tratamiento térmico,  $G'$  mantuvo valores superiores aunque su evolución fue similar a la del sistema control. Este comportamiento sugiere distintas posibles explicaciones; podría ocurrir que una fracción de las proteínas no se encuentre afectada por el MDA, formando y estabilizando la matriz de manera normal, mientras que otra fracción modificada por el MDA fuera la responsable de los mayores valores de  $G'$  en estos geles. De otra manera, podría pensarse que el MDA alteró a todo el conjunto de proteínas miofibrilares, pero dicha alteración no fue lo

suficientemente importante como para afectar el comportamiento global del sistema.



Los menores valores de  $G'$  y  $G''$  para  $t = 0$  indicarían que en ese caso, la presencia de MDA –que aún no reaccionó ampliamente con las proteínas– podría estar alterando la correcta formación de la red del gel.

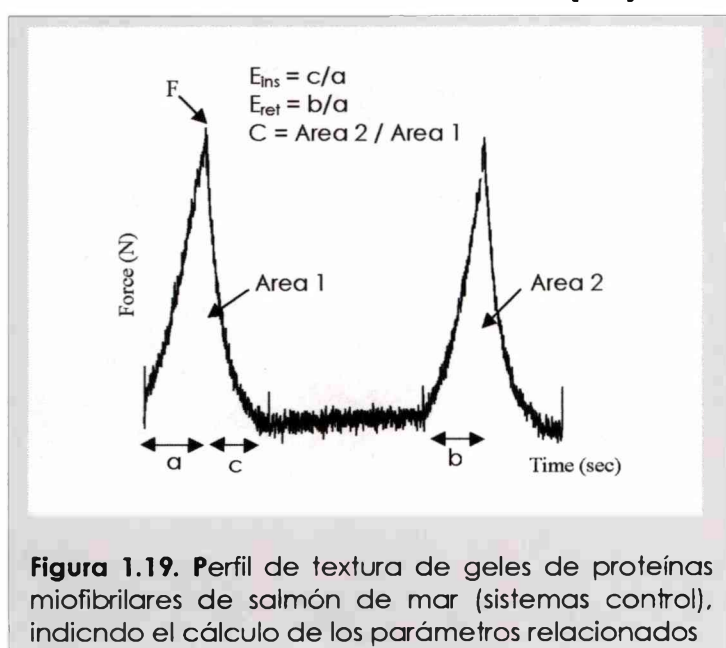
Cabe resaltar nuevamente, el efecto de la concentración del MDA en las modificaciones producidas sobre las proteínas miofibrilares.

### 1.3.8. Caracterización de los geles obtenidos por tratamiento térmico

En otra serie de experiencias se prepararon geles a partir de los sistemas previamente incubados a 27°C, por tratamiento térmico a 80°C durante 45 min. En este caso, las muestras se colocaron directamente en un baño a la temperatura de gelación elegida. Los geles obtenidos se sometieron a distintos análisis a fin de estudiar sus estructuras y propiedades, tratando de analizar el efecto de la interacción con MDA sobre sus características.

#### 1.3.8.1. Textura de los geles

- **Análisis de Perfil de Textura (TPA).** Se determinaron los parámetros



relacionados con la textura de los geles de proteínas miofibrilares de salmón de mar mediante un análisis de perfil de textura en el modo de compresión. En la **Figura 1.19** se observa una curva de fuerza vs. tiempo de doble ciclo correspondiente a geles de proteínas miofibrilares de salmón de mar (sistema control). En ella

se muestra cómo fueron obtenidos los diferentes parámetros de textura evaluados

en este trabajo: Firmeza (F), Elasticidad Instantánea ( $E_{ins}$ ), Elasticidad Retardada ( $E_{ret}$ ) y Cohesividad (C). Como puede observarse, se evaluaron dos parámetros relacionados con la elasticidad de los sistemas. La elasticidad instantánea deriva del primer ciclo de compresión y corresponde a una recuperación instantánea de la muestra relacionada con el componente elástico de la misma (Fizman y col., 1998). Por otra parte, la elasticidad retardada -más comúnmente utilizada- corresponde al parámetro de elasticidad definido por Bourne (1978), incluyendo la recuperación elástica inicial más la recuperación alcanzada por la muestra durante el tiempo transcurrido entre los dos ciclos de compresión (componente viscoso). En la **Tabla 1.3.** se resumen los datos obtenidos a partir de dichos estos ensayos.

Es importante mencionar que en ninguno de los sistemas se registró adhesividad, representada por el área correspondiente a una fuerza negativa al final del primer ciclo.

**Sistemas control.** En primer término, analizaremos el efecto de la incubación a 27°C sobre las propiedades de los geles obtenidos a partir de los sistemas control. Si bien no se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en parámetros tales como la firmeza y cohesividad en función del tiempo de incubación, un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la elasticidad retardada del sistema control fue observado luego de 8 h de incubación a 27 °C (con respecto al sistema de  $t = 0$ ).

**Efecto del tratamiento con MDA.** La firmeza de los sistemas PM + MDA no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en ninguno de los tiempos de incubación. La elasticidad instantánea aumentó en función del tiempo de incubación, siendo su valor estadísticamente diferente con respecto a su correspondiente sistema control a  $t = 8$  h ( $p < 0,05$ ). Los resultados obtenidos indican la presencia de un mayor componente elástico en los geles dado por la interacción de las proteínas con el MDA. La elasticidad retardada mostró un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en función del tratamiento con MDA a  $t = 0$  y 4 h, aunque la diferencia con respecto al sistema control no fue significativa a  $t = 8$  h.



**Tabla 1.3.** Parámetros obtenidos a partir del Análisis de Perfil de Textura (TPA)

Sistema	Tiempo (h)	F(N)	E <sub>inst</sub>	E <sub>ret</sub>	E <sub>ret</sub> - E <sub>inst</sub>	C
PM	0	0,20 ± 0,03	0,55 ± 0,04	0,86 ± 0,02	0,31 ± 0,05	0,77 ± 0,03
	4	0,22 ± 0,02	0,64 ± 0,03	0,88 ± 0,02	0,23 ± 0,04	0,78 ± 0,03
	8	0,19 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,92 ± 0,02	0,34 ± 0,04	0,79 ± 0,03
PM + MDA	0	0,16 ± 0,04	0,67 ± 0,05	0,96 ± 0,03	0,28 ± 0,06	0,84 ± 0,03
	4	0,22 ± 0,02	0,69 ± 0,03	0,96 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,88 ± 0,03
	8	0,21 ± 0,03	0,74 ± 0,03	0,96 ± 0,02	0,22 ± 0,04	0,88 ± 0,03

La diferencia entre la elasticidad retardada y la instantánea representa el componente viscoso de la recuperación de los sistemas, el cual fue significativamente menor para los sistemas PM + MDA - t = 8 h.

La cohesividad de los sistemas tratados con MDA fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) a la de los respectivos controles para todos los tiempos de incubación. Este incremento podría atribuirse a la presencia de fuerzas internas más importantes entre las moléculas por efecto del MDA, en correlación con la formación de enlaces de tipo covalente entre las cadenas polipeptídicas, tal como ha sido expuesto en secciones anteriores.

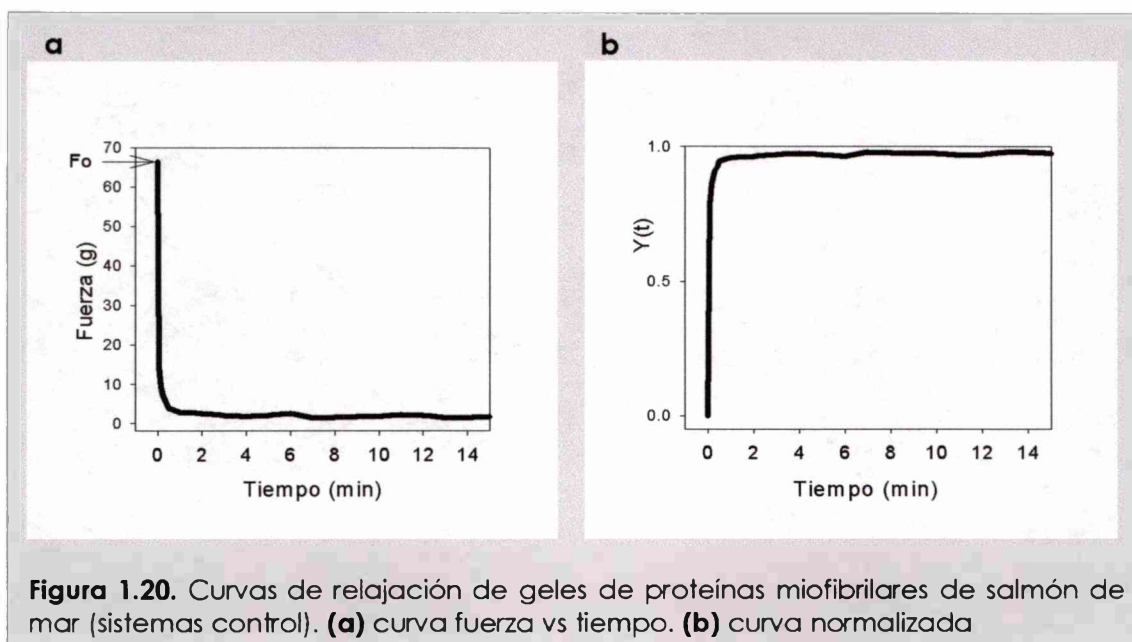
- **Test de Relajación.** Los geles fueron también caracterizados a través de sus respectivas curvas de relajación. La **Figura 1.20.a** muestra un ejemplo de estas curvas para el sistema control a t = 0. Dado que la fuerza disminuye a valores cercanos a 0 podemos decir que estos geles se comportan como líquidos elástico-viscosos.

Para facilitar la comparación entre los distintos sistemas, las curvas fueron normalizadas calculando un parámetro de decaimiento Y(t) según la siguiente ecuación (Peleg, 1979):

$$Y(t) = (F(t) - F_0) \times 100/F_0 \quad (\text{Ec. 1.5.})$$

donde  $F_0$  y  $F(t)$  son las fuerzas registradas a  $t = 0$  y  $t$  min, respectivamente. La correspondiente curva normalizada puede observarse en la **Figura 1.20.b**.

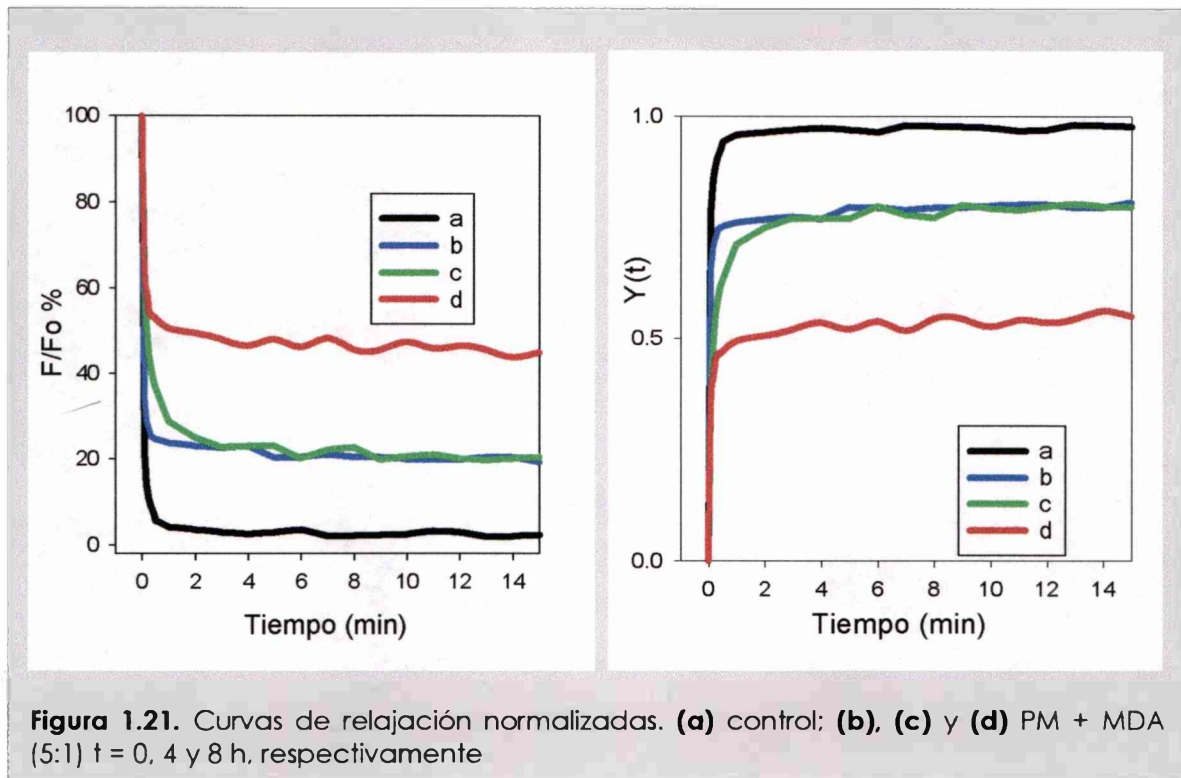
Los geles obtenidos a partir de sistemas control incubados durante 4 y 8 h a 27°C no presentaron diferencias con respecto a  $t = 0$  en su comportamiento de relajación (datos no mostrados).



**Efecto del tratamiento con MDA.** Los geles formados a partir de proteínas tratadas con MDA evidenciaron una respuesta diferente a la de los sistemas control frente el test de relajación. En la **Figura 1.21** se observan las curvas correspondientes a un sistema control y a los sistemas PM + MDA ( $t = 0, 4$  y  $8$  h). En esta figura se muestran las representaciones de  $F(t)/F_0$  % en función del tiempo a fin de lograr una mejor comparación de los sistemas. Los resultados obtenidos permiten observar un menor decaimiento (mayor fuerza residual) en función del tiempo de incubación con MDA. Paralelamente, los valores de  $Y(t)$  para estos sistemas resultaron ser mayores que los correspondientes al sistema control.

Obteniendo el valor de  $Y(t)$  para  $t = 15$  min y calculando la diferencia ( $100 - Y_{15}\%$ ), podemos considerar este valor como un índice de elasticidad (Roussel y Cheffel, 1988). De esta manera, puede apreciarse nuevamente un aumento en la elasticidad de los geles en presencia de MDA. Este índice presentó un valor de 1 % para los sistemas control, alrededor de 23 % para los sistemas PM + MDA,  $t = 0$  y

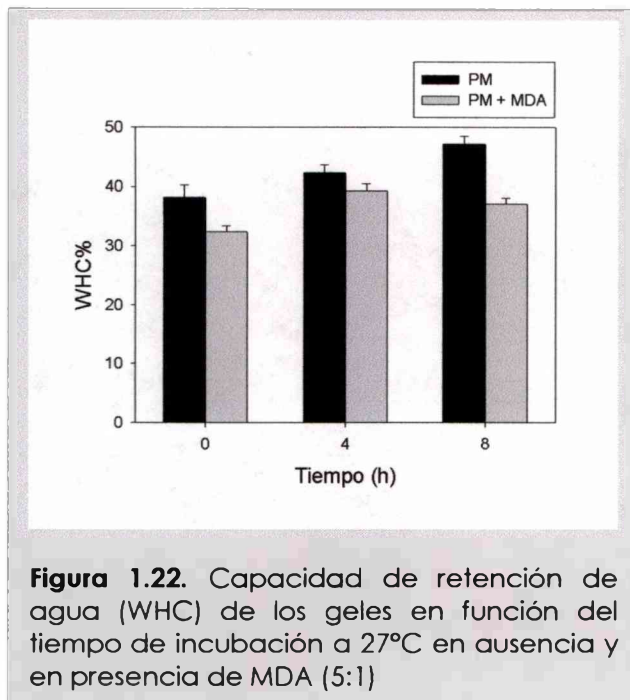
4 h y aproximadamente 46 % para PM + MDA,  $t = 8$  h. Por lo tanto, podemos decir que debido a la interacción de las proteínas miofibrilares con el MDA, los geles evidenciaron un mayor carácter sólido que sus respectivos controles.



### 1.3.8.2. Capacidad de retención de agua de los geles (WHC)

La capacidad de retención de agua es una propiedad sumamente importante en los productos gelificados.

**Sistemas control.** Los geles obtenidos a partir de proteínas miofibrilares de salmón de mar presentaron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de WHC en función del tiempo de incubación a  $27^{\circ}\text{C}$  (Figura 1.22.), lo cual podría indicar que la incubación mejoraría la formación de la matriz del gel, haciéndola más ordenada, comportamiento que podría estar relacionado vinculado con el fenómeno de “suwarí” o “gel setting” previamente comentado.



**Efecto del tratamiento con MDA.** Los geles obtenidos a partir de proteínas tratadas con MDA presentaron WHC menores que sus correspondientes controles para todos los tiempos de incubación (**Figura 1.22.**), aunque las diferencias fueron significativas ( $p < 0,05$ ) a  $t = 0$  y  $8$  h. En los estudios estructurales antes descritos, se concluyó que el MDA produjo agregación proteica y disminución en el contenido de grupos  $\epsilon$ -amino

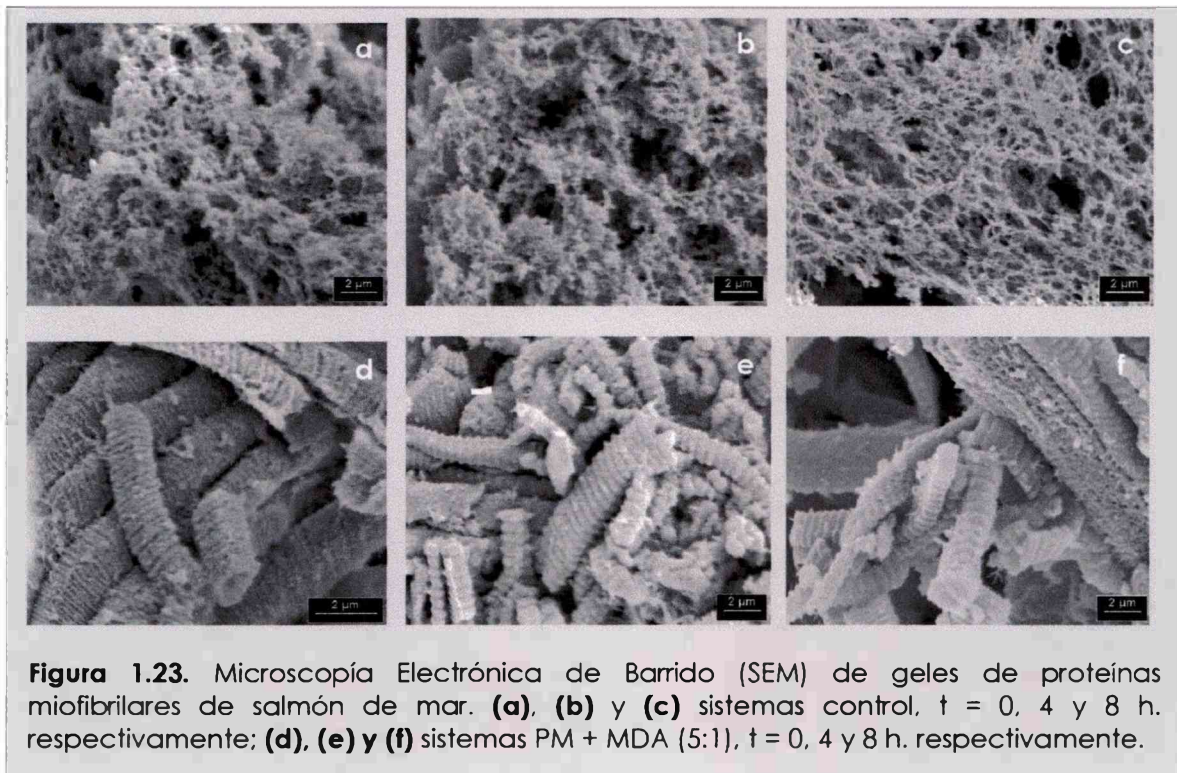
libres, los cuales son capaces de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Por lo tanto, esta podría ser una posible causa de la reducción en la capacidad de retención de agua observada, ya que hay menor cantidad de grupos capaces de ligar moléculas de agua disponibles.

### 1.3.8.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La ultraestructura de las matrices de los distintos geles fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las **Figuras 1.23.a, 1.23.b y 1.23.c.** muestran imágenes de los geles correspondientes a los sistemas control a  $t = 0, 4$  y  $8$  h, respectivamente. En este caso, pueden observarse redes tridimensionales típicas, similares a las mostradas por otros autores para geles de proteínas miofibrilares (Samejina y col., 1981; Smith, 1987; Lefèvre y col., 1998). Asimismo, pueden apreciarse algunas pequeñas modificaciones en función del tiempo de incubación a 27°C dadas por la presencia de una estructura más fina y más porosa. Estos cambios podrían vincularse con el aumento en la capacidad de retención de agua que presentaron los geles por efecto de la incubación a 27°C. Una de las formas de retención de agua por parte de la matriz del un gel es a través de fuerzas capilares, quedando retenida en los poros de la estructura

(Damodaran, 1996), por lo cual cambios en la estructura de la red pueden traducirse en cambios en la retención de agua por medio de este mecanismo.

**Efecto del tratamiento con MDA:** Los geles formados a partir de proteínas tratadas con MDA presentaron cambios relevantes en sus estructuras (**Figuras 1.23.d, 1.23.e. y 1.23.f.**). Las matrices mostraron la presencia de estructuras similares a "grandes filamentos", de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  de ancho. Estos filamentos presentaron una serie de "bandas" transversales claras y oscuras. Se encontraban unidos entre sí de una forma desorganizada, la cual no se asemeja a la red organizada típica de un gel, sugiriendo haber sufrido predominantemente un proceso de agregación más que de gelificación por la temperatura. Esto estaría de acuerdo con su aspecto más opaco y la menor capacidad de retención de agua observada en estos geles.



Si comparamos las imágenes obtenidas para los geles formados por MDA sin tratamiento térmico (sección 1.3.6.2. – **Resultados y Discusión**) con las presentes, vemos que los primeros presentaron estructuras típicas, similares a las

obtenidas por gelificación térmica de los sistemas control. Por lo tanto, el tratamiento térmico estaría induciendo en las proteínas modificadas por el MDA la formación de esos "grandes filamentos" y la agregación de los mismos. Las matrices correspondientes a  $t = 4$  y  $8$  h presentan una mayor desorganización que las de  $t = 0$ . Cabe señalar que para los sistemas de  $t = 0$ , el MDA estaba presente durante el proceso de gelación térmica, pudiendo haber ocurrido interacción entre las proteínas y dicha sustancia en ese lapso.

#### 1.3.8.4. Electroforesis del líquido exudado de los geles

A fin de obtener información acerca de cuáles eran las proteínas miofibrilares intervinientes en la formación de la matriz del gel, se realizaron estudios electroforéticos del líquido exudado por los diversos geles, para poder inferir -dadas las proteínas no detectadas en dichos líquidos- las especies proteicas que estarían formando parte del gel.

Dado que en ninguna de las muestras analizadas se observó la banda correspondiente a MHC (**Figura 1.24**), pudo corroborarse que la miosina es la



**Figura 1.24.** SDS-PAGE (con ME) de los líquidos exudados por los geles. Calle 1: patrones de alto peso molecular. Calles 2 – 4: sistemas control,  $t = 0$ , 4 y 8 h respectivamente. Calles 5 – 7: PM+ MDA (5:1),  $t = 0$ , 4 y 8 h respectivamente

proteína fundamental formadora de la matriz del gel. Análogamente, no se registró la aparición de la banda de la actina en el líquido exudado de los geles, ya que probablemente se encuentra involucrada en la formación de la actomiosina, la cual también tiene capacidad para formar la matriz del gel. Además, es notoria la menor intensidad de la banda que no ingresa al gel, con respecto a los perfiles electroforéticos de las

proteínas miofibrilares analizados anteriormente (sección 1.3.2. y 1.3.3.2),

sugiriendo que estos agregados solubles -constituídos por miosina, actina y otros polipéptidos como fue previamente determinado (sección 1.3.2.)- también se encontrarían formando parte de la matriz del gel.

Los sistemas control no mostraron diferencias en función del tiempo de incubación a 27°C (Figura 1.24, calles 2, 3 y 4).

**Efecto del tratamiento con MDA.** A  $t = 0$  (Figura 1.24, calle 5) aparecen en el perfil electroforético del líquido exudado, polipéptidos similares a los de los respectivos controles, aunque con una disminución en la intensidad de la banda 6 (81 kD) A  $t = 4$  y 8 h (Figura 1.24, calles 6 y 7) se observa una notoria disminución en las bandas 6, 8, 11, 12 y 13 (MLC) lo cual sugiere que una proporción importante de estas proteínas han quedado retenidas en la matriz del gel. Dichos polipéptidos serían los que, según se confirmó anteriormente, participarían con la miosina en la agregación proteica inducida por el MDA, por lo que al estar unidos a la miosina en la incubación previa, es esperable su permanencia en la matriz del gel. Por otra parte, a  $t = 0$  no hubo una interacción previa con el MDA, por lo que, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, puede sugerirse un cierto grado de interacción durante el proceso de gelación, involucrando al polipéptido de 81 kD y ejerciendo notables efectos la estructura y propiedades de los geles, tal como fue explicitado anteriormente.

#### 1.3.8.5. Solubilidad de los geles en distintos medios

Los geles fueron tratados con las siguientes soluciones: buffer KCl 0,6 M (pH 7,0) (*buffer 1*), buffer conteniendo SDS y urea (*buffer 2*) y buffer conteniendo SDS, urea y ME (*buffer 3*) con el objeto de profundizar el estudio acerca de la naturaleza química de las interacciones que estabilizan los mismos. Dicho estudio fue realizado sobre geles obtenidos a partir de sistemas con relaciones proteína : MDA 5:1 y 50:1 y de sus respectivos controles.

**Sistemas control.** La solubilidad de los geles no presentó modificaciones en función del tiempo de incubación a 27°C, en ninguno de los sistemas buffer

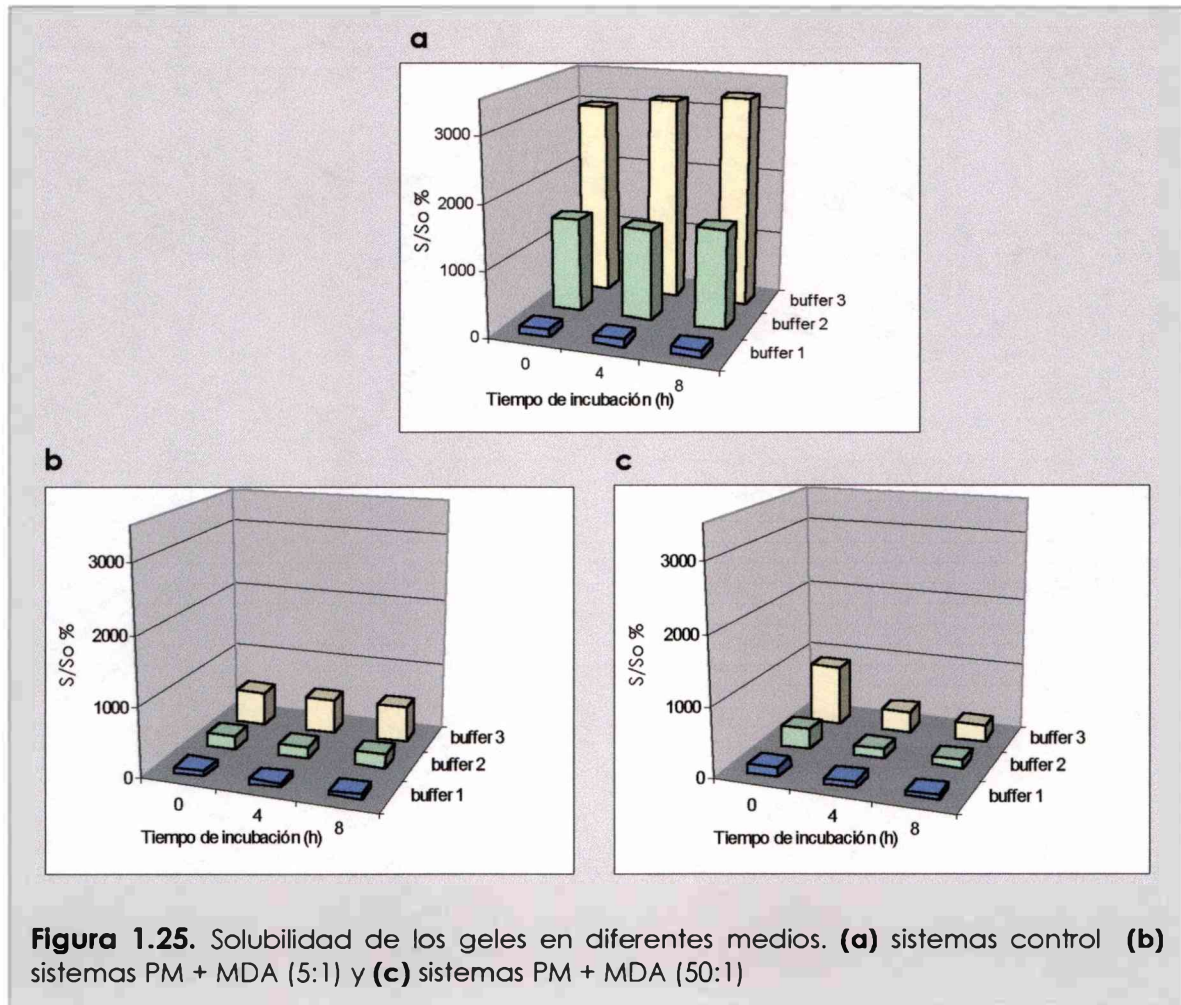
estudiados (**Figura 1.25.a**). La solubilidad en buffer 1 fue muy baja, cercana al 1 %. En presencia de SDS y urea, la solubilidad aumentó marcadamente, alcanzando valores alrededor de 15 veces superiores a los del buffer 1, mientras que con el agregado de ME, el incremento fue aún mayor (S alrededor de 30 veces mayor a  $S_0$ ). En función de estos resultados puede inferirse un importante aporte de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno estabilizando la estructura de los geles -tal como se había mencionado en los estudios de reología- así como también de puentes disulfuro.

### **Efecto del tratamiento con MDA (Figuras 1.25.b y 1.25.c)**

- *Geles tratados con buffer 1:* A  $t = 0$  no se encontraron diferencias significativas entre los sistemas. Ambos sistemas con MDA (5:1 y 50:1) presentaron una disminución de la solubilidad en buffer 1 con respecto al correspondiente sistema control para  $t = 4$  y 8 h, no existiendo diferencia entre ellos.
- *Geles tratados con buffer 2:* Los sistemas con distinta relación proteína : MDA presentaron idénticos valores de solubilidad a todos los tiempos de incubación, siendo éstos muy inferiores a los de los correspondientes sistemas control. Por lo tanto, casi la totalidad de las proteínas no pudieron ser solubilizadas con SDS y urea, lo cual muestra la presencia de uniones de tipo covalente en estos geles.
- *Geles tratados con buffer 3:* El sistema 50:1 presentó valores similares de solubilidad a todos los tiempos de incubación, los cuales fueron alrededor de 5 veces el valor de  $S_0$ , mientras que para el sistema control dicha solubilidad fue 30 veces mayor que  $S_0$ . El sistema formulado con la relación 5:1 mostró un valores de solubilidad similares a los anteriores, con una leve disminución en función del tiempo de incubación. Por lo tanto, sólo una pequeña fracción de las proteínas pudieron ser redisueltas a partir de los geles por ruptura de puentes disulfuro, indicando una pobre participación de estas uniones -al igual que de las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno- entre las moléculas que se encuentran formando la matriz proteica.



Estos estudios demuestran nuevamente, la presencia de uniones de tipo covalente -distintas de puentes disulfuro- entre las proteínas miofibrilares de salmón de mar debidas a la interacción con MDA.



## 1.4. CONCLUSIONES

En esta primera parte del trabajo de Tesis se realizó un estudio de la interacción entre las proteínas miofibrilares de salmón de mar y el malonaldehído - uno de los productos secundarios de la oxidación lipídica-, en un sistema modelo. Los sistemas modelo han sido ampliamente utilizados en este tipo de estudios por su simplicidad con respecto a un sistema real como podría ser el músculo y por la posibilidad de realizar ensayos acelerados, los que permiten obtener resultados en tiempos cortos. En este caso, se utilizó un sistema algo más complejo que los utilizados en otros trabajos, en los cuales se ha empleado una proteína aislada (miosina) o incluso un fragmento de la misma. La utilización de la fracción total de proteínas miofibrilares brinda una información más representativa desde el punto de vista de su extrapolación a los fenómenos que podrían registrarse en el músculo entero.

Los principales conclusiones que podemos extraer del análisis de los sistemas modelo son las siguientes:

- Se comprobaron importantes alteraciones estructurales de las proteínas miofibrilares a través de diferentes estudios: mediante calorimetría diferencial de barrido se observó desnaturalización y cambios en la estabilidad térmica de la miosina, mediante determinaciones de solubilidad proteica se demostró la formación de agregados moleculares de alta masa molecular insolubles, mediante microscopía electrónica de transmisión pudieron visualizarse los agregados formados. El entrecruzamiento entre las proteínas también pudo ponerse en evidencia a través de la formación de estructuras "tipo geles" sin la necesidad de un tratamiento térmico.
- Se analizaron cuáles eran los tipos de uniones químicas involucradas en las modificaciones proteicas mediante el uso de soluciones conteniendo distintos agentes caotrópicos, concluyéndose que se trata de uniones de tipo covalente, principalmente distintas de puentes disulfuro aunque con una baja

participación de estas últimas. Se comprobó la presencia de uniones covalentes a través de grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina mediante las determinaciones de lisina disponible.

- Se pusieron en evidencia las proteínas afectadas por la interacción con MDA mediante la obtención de perfiles electroforéticos. La especie proteica más afectada fue la cadena pesada de miosina aunque también participaron en la interacción otras proteínas (81 y 132 kD).
- Se analizó el efecto del MDA sobre aspectos funcionales de las proteínas miofibrilares de salmón de mar tales como la gelación térmica. Se obtuvieron geles con una microestructura totalmente diferente, que refleja una agregación proteica mas que la formación de una red ordenada, con cambios en los parámetros de textura y una menor capacidad de retención de agua. Estos estudios tienen importancia desde el punto de vista tecnológico, ya que podría verse modificada la funcionalidad de estas proteínas en la formulación de productos que impliquen un proceso de gelación térmica.
- Pudo comprobarse una combinación de los factores concentración de MDA - tiempo de interacción para producir similares efectos en las proteínas, lo cual podría indicar que en presencia de menores concentraciones de malonaldehído pueden ocurrir estas modificaciones proteicas si existe un tiempo de interacción adecuado.

Es importante notar que los sistemas estudiados se encuentran alejados de las condiciones en un sistema real (músculo), dado que:

- Las concentraciones de MDA utilizadas fueron muy superiores a las que pueden encontrarse en el músculo almacenado sufriendo un proceso de oxidación.
- Las proteínas y el MDA se encontraban en una solución acuosa donde no existen barreras físicas como las que pueden encontrarse en un tejido.

- En los sistemas no se encontraban presentes otras sustancias que también podrían reaccionar con el MDA y de esa forma disminuir la cantidad disponible para reaccionar con las proteínas miofibrilares (como por ejemplo aminoácidos libres y otros compuestos con grupos amino).
- La temperatura de incubación de los sistemas fue alta, incompatible con cualquier proceso de conservación del músculo de pescado.

Por lo tanto, el objetivo del análisis de estos sistemas modelo fue inducir posibles alteraciones de las proteínas por un producto de la oxidación lipídica a través de ensayos acelerados, sin la interferencia de otros procesos de deterioro simultáneos que ocurren en un músculo durante un almacenamiento (crecimiento microbiano, autólisis, etc). La extrapolación de los resultados encontrados en sistemas modelo a un sistema real no puede realizarse en forma directa dado que el sistema real es mucho más complejo, existen diversos factores que podrían causar alteraciones en las proteínas, siendo el resultado final un efecto combinado de todos ellos. Es importante tener en cuenta también que en estos sistemas se utilizó solo uno de todos los posibles productos de oxidación, mientras que en el músculo pueden ocurrir interacciones tanto con los productos primarios de oxidación (radicales libres, hidroperóxidos) como con los secundarios (aldehídos, cetonas, ácidos, alcoholes y muchos otros). Sin embargo, el presente estudio es un primer paso en la investigación de la interacción entre las proteínas miofibrilares y productos de oxidación, que da indicios de las potenciales modificaciones que podrían sufrir dichas proteínas, sirviendo como base de comparación con las alteraciones que puedan registrarse en el músculo almacenado en diversas condiciones.

# Capítulo 2. Almacenamiento refrigerado



## 2.1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

A través de la historia, la preferencia del hombre ha estado dirigida al consumo de pescado fresco, antes que a otro tipo de producto pesquero. Datos del año 1992 muestran que aproximadamente un 37 % de las capturas anuales totales se destinan al consumo humano como pescado fresco (Huss, 1998). Sin embargo, en condiciones de refrigeración el pescado se deteriora rápidamente.

Tanto la actividad enzimática como la microbiana están altamente influenciadas por la temperatura. Sin embargo, en el rango de temperaturas de refrigeración, la actividad microbiana es relativamente más importante (Huss, 1998). Por lo tanto, ésta es la principal responsable del deterioro de la mayoría de los productos pesqueros frescos. En los peces vivos y recién capturados los microorganismos se encuentran en todas las superficies externas (piel y branquias) y en los intestinos. La flora bacteriana depende principalmente del medio ambiente de captura más que de la especie; los recuentos varían con la temperatura y la contaminación del agua. En peces de aguas templadas, las bacterias presentes son predominantemente psicrótrofas y psicrófilas, según el rango de temperatura de crecimiento.

El músculo de un pez es estéril ya que el sistema inmológico previene el crecimiento de bacterias en él. Cuando el pez muere, el sistema inmunológico colapsa y las bacterias proliferan. Así, durante el almacenamiento refrigerado un cierto número de bacterias invaden el músculo y lo deterioran (Huss, 1998).

Ehira y Uchiyama (1987) definieron la evolución de la calidad en el pescado refrigerado, llamando fase de *frescura bioquímica* a la fase entre la captura y el fin del *rigor mortis*, con los cambios físicos y químicos (autolíticos) comentados en la **Introducción General**; y fase de *frescura microbiológica* a la fase *post-rigor* donde el deterioro está dado fundamentalmente por la actividad microbiana.

Una gran parte de los compuestos volátiles generados durante el deterioro del pescado son producidos por bacterias, dentro de ellos podemos mencionar la trimetilamina (TMA), los compuestos sulfurosos, aldehídos, cetonas, ésteres, hipoxantina y otros compuestos de bajo peso molecular. Muchas bacterias del

deterioro del pescado emplean el óxido de trimetilamina (OTMA) –el cual se encuentra formando parte de los tejidos y vísceras de las especies de agua salada- como aceptor terminal de electrones en la respiración anaeróbica, reduciéndolo a TMA. Este compuesto imparte el olor típico del pescado; el nivel necesario para que el pescado sea rechazado por un panel sensorial varía según la especie, generalmente se encuentra alrededor de los 10 a 15 mg N/100 g de músculo (Huss, 1998), aunque en varios países se considera un valor de 4 mg N/100 g de músculo como límite de frescura para consumo humano (Contreras Guzmán, 2002).

Dentro de la flora encontrada en un pescado almacenado en refrigeración, solo algunas bacterias están relacionadas con el deterioro del mismo, produciendo olores y sabores desagradables. *Shewanella putrefaciens* ha sido identificada como la bacteria específica del deterioro del pescado de aguas templadas almacenado aeróbicamente en hielo (Shewan, 1977; Huss, 1998). Estas bacterias son productoras de ácido sulfhídrico a partir del aminoácido azufrado cisteína y de TMA.

El nitrógeno básico volátil total (NBV-t) ha sido utilizado como índice de descomposición del pescado desde hace mucho tiempo. Representa la suma de varias contribuciones, ya que algunos de los compuestos constituyentes provienen de la reducción del OTMA y otros de la desaminación de aminoácidos libres por diferentes mecanismos. El nivel de NBV-t límite utilizado como índice de frescura en varios países -dentro de los cuales se encuentra Argentina- es de 30 mg N/100g de muestra (Decreto 4238/68, capítulo XXIII, inciso 23.12.12.).

Según lo expuesto anteriormente, es evidente que el deterioro microbiológico y organoléptico del pescado almacenado en refrigeración es de suma importancia para la industria pesquera. Sin embargo, dadas las características de la fracción lipídica de estos productos, la oxidación de los lípidos también puede afectar la calidad del pescado refrigerado, tanto desde el punto de vista organoléptico, por la formación de compuestos volátiles que imparten olores indeseables; como funcional, por afectar no solo la fracción lipídica sino también otros componentes tales como las proteínas; nutricional y de

la salud, por la modificación de su composición de ácidos grasos afectando fundamentalmente la fracción omega 3.

En función de estas observaciones, se plantean los siguientes objetivos para el desarrollo del presente capítulo:

- *Analizar los cambios en la calidad del músculo de salmón de mar durante el almacenamiento refrigerado, particularmente aquéllos relacionados con la oxidación lipídica y sus consecuencias sobre otros constituyentes tales como las proteínas, teniendo en cuenta otros factores que determinan la vida útil del pescado refrigerado.*
- *Evaluar el efecto del agregado de extracto de romero como antioxidante de origen natural al músculo almacenado en refrigeración.*



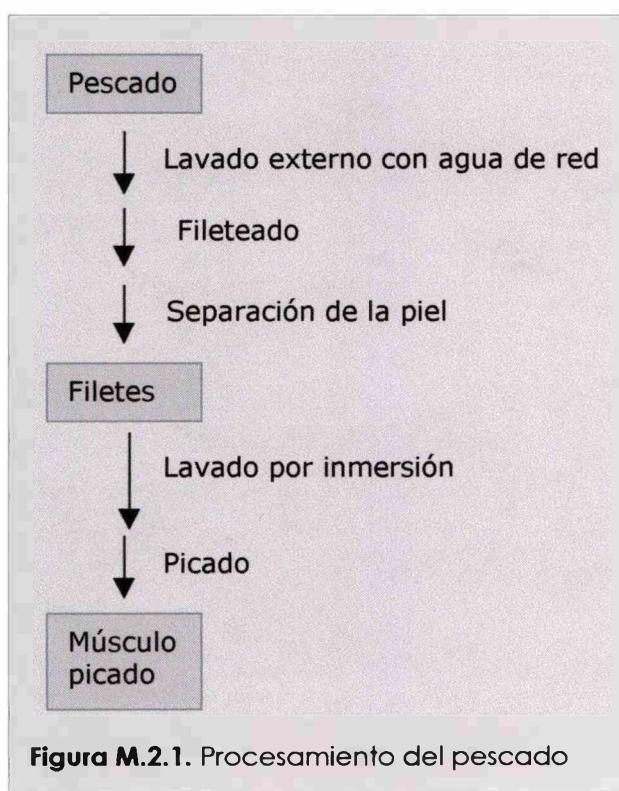
## 2.2. MATERIALES Y METODOS

### 2.2.1. Material utilizado

Se utilizaron ejemplares de salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*), capturados por barcos de media altura frente a las costas de Mar del Plata (Pcia. de Buenos Aires), los cuales fueron mantenidos en hielo hasta la llegada al laboratorio. Los individuos estudiados fueron capturados en distintas épocas del año siendo de ambos sexos y de diferentes edades.

### 2.2.2. Procesamiento y almacenamiento del pescado

Los ejemplares de salmón de mar fueron procesados de acuerdo al diagrama de flujo mostrado en la **Figura M.2.1.**, siendo previamente pesados y medidos.



El primer paso en el procesamiento del pescado fue un lavado con agua de red a fin de retirar el mucus y cualquier residuo presente en la superficie externa. Posteriormente, fueron separadas las masas musculares a cada lado del cuerpo y retirada la piel para obtener dos filetes. Los filetes fueron lavados por inmersión durante 1 min, en algunos casos con agua de red y en otros con agua clorada (agua de red con agregado de 1 ppm de cloro) a fin de disminuir la carga microbiana inicial. Cabe señalar que este procedimiento es habitualmente

empleado en las plantas de procesamiento de pescado. Asimismo, se procedió a la desinfección del instrumental empleado durante el procesamiento.

La carne fue picada en una multiprocesadora (ULTRACOMB), siendo el músculo picado posteriormente envasado y almacenado.

**Envasado de las muestras:** Muestras de músculo picado (30 - 50 g) fueron envasadas en bolsas de polietileno de baja densidad (50 y 100  $\mu\text{m}$  de espesor), siendo éste un material de alta permeabilidad al oxígeno.

**Almacenamiento refrigerado:** Las muestras fueron almacenadas en cámara a  $1 \pm 1^\circ\text{C}$ . por distintos períodos de tiempo.

### 2.2.3. Aplicación del antioxidante

Dado que uno de los objetivos de este trabajo fue analizar la efectividad del extracto de romero como antioxidante en el sustrato en estudio, se almacenaron muestras en presencia del mismo.

Se utilizó el extracto comercial *Guardian Rosemary extract 09* (DANISCO). Según sus especificaciones, el producto contiene diterpenos fenólicos (5%), monooleato de polioxi-etilen sorbitan (E433), propilenglicol y extracto natural de romero (95%). En Estados Unidos ha sido aprobado como GRAS para el uso en alimentos (21 CFR 182.20) y es denominado como "extracto natural de especie" o "flavour natural" (101.22) .

El extracto Guardian 09 se aplica en forma de dispersión acuosa. Para su aplicación se preparó una dispersión consistente en 1 g de extracto cada 9 g de agua, agitando vigorosamente en agitador magnético hasta lograr la completa dispersión. Se calculó el volumen necesario de dispersión para lograr la concentración deseada en el músculo picado.

A una parte representativa del músculo picado se aplicó la dispersión del extracto de romero mediante un vaporizador procediendo a su homogeneización.

#### **2.2.4. Composición proximal del músculo de salmón de mar**

Se determinaron los siguientes componentes del músculo:

- *Proteína total*: por el método de Kjeldhal, utilizando un equipo un Buchi 427 como unidad de digestión y un Buchi 320 como unidad de destilación. Se utilizó el factor 6,25 para transformar el nitrógeno total en proteína total.
- *Lípidos totales*: por el método gravimétrico a partir del extracto clorofórmico de Bligh y Dyer (1959).
- *Agua*: determinación de humedad por el método indirecto, secando en estufa a 105 °C durante 24 h.
- *Cenizas*: mediante calcinación y tratamiento en mufla a 550 °C hasta obtención de cenizas blancas.

#### **2.2.5. Composición de la fracción lipídica**

Las fracciones de triglicéridos y de fosfolípidos fueron separadas a partir de un extracto de Bligh y Dyer (1959) mediante cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílica gel G (Merck) preparativas. El sistema de solventes utilizado fue hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:2) para separación de TG y AGL, recuperando la fracción de PL del origen. La extracción de lípidos de la sílica se realizó de la siguiente manera: los lípidos se extrajeron de la sílica luego de su resolución, mediante tres extracciones sucesivas con una mezcla de cloroformo:metanol:ácido acético:agua (50:39:1:10 en vol.) seguido de una partición con agua amoniacal y centrifugación, en caso de PL totales y TG (Arvidson, 1968). Para la extracción de compuestos acídicos (como AGL) se reemplazó la partición amoniacal por una acídica para favorecer su pasaje a la fase orgánica clorofórmica.

**Perfil de ácidos grasos:** Se analizó el perfil de ácidos grasos de la fracción lipídica total y de ambas fracciones por separado mediante cromatografía gaseosa. A tal fin, se prepararon los metil ésteres (ME) de los ácidos grasos por transesterificación en presencia de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2% (Christie, 1982) o  $\text{BF}_3$  14% en metanol como catalizador a  $45^\circ\text{C}$  durante toda la noche (Morrison y Smith, 1964), bajo atmósfera de nitrógeno. Ambos procedimientos permiten recuperar los AG derivatizados con el mismo patrón composicional además de similar rendimiento. Los ME así obtenidos se extrajeron mediante una partición agregando al metanol cloroformo y agua en proporción (1:1:0.9, en vol.), y se secaron bajo  $\text{N}_2$ . Antes de su análisis los ME se purificaron por TLC sobre placas de sílica gel G previamente lavadas con metanol:éter (75:25 en vol.). Para su purificación se utilizó hexano/éter (95:5, en vol.). Las manchas se localizaron por revelado con diclorofluoresceína 0,05% en metanol, seguido de inspección bajo luz ultravioleta y se eluyeron de la sílica por partición en un sistema de fases entre agua, metanol y hexano (1:1:1, en vol.).

Para el análisis composicional se utilizó un cromatógrafo Varian provisto de 2 columnas de vidrio (2 m de longitud x 2 mm de diámetro) empaquetadas con una fase estacionaria polar, 10% SP2330 (Supelco), empleando  $\text{N}_2$  como gas portador (30 ml/ min). Se aplicó un gradiente de temperatura entre  $155^\circ\text{C}$  y  $230^\circ\text{C}$  ( $5^\circ\text{C}$  por minuto). La detección se realizó por medio de dos detectores de ionización de llama. Las temperaturas del inyector y del detector fueron  $220^\circ\text{C}$  y  $230^\circ\text{C}$ , respectivamente. Los ME fueron identificados en función de sus tiempos de retención, cuantificando por integración electrónica (Varian Workstation).

### **2.2.6. Ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)**

El seguimiento del proceso de oxidación lipídica en las muestras almacenadas se realizó mediante la determinación del Número de TBA, el cual está relacionado con la cantidad de malonaldehído y otros productos de oxidación presentes en la muestra.

Se utilizó un método de extracción ácida basado en metodologías llevadas a cabo por otros autores (Raharjo y col., 1993; Botsoglou y col., 1994; Alasnier y col., 2000).

Se pesaron alrededor de 2,00 g de muestra (en balanza con precisión  $\pm$  0,01 g), se agregaron 16,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5 % p/v y se homogeneizó. Los extractos se dejaron en reposo durante 30 min en hielo, siendo posteriormente filtrados.

Se tomaron 2,00 ml del filtrado y se agregaron 2,00 ml de solución de TBA 0,5 % p/v. Las mezclas se incubaron a 70°C durante 30 min en tubos cerrados. Se leyó en un espectrofotómetro Beckman DU 650 a 532 nm.

El Número de TBA se expresó como los mg de malonaldehído presentes en un kg de músculo, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{N}^\circ \text{ de TBA (mg MDA/kg músc)} = \frac{\text{Abs} \times M \times V_a \times V_e \times 1000}{\epsilon \times l \times m}$$

(Ec. 2.1.)

donde: Abs : absorbancia a 532 nm

M : masa molecular del malonaldehído (72 g)

V<sub>a</sub> : volumen de la alícuota (2,00 ml)

V<sub>e</sub> : volumen de extracto (16,0 ml)

$\epsilon$  : coeficiente de extinción molar del complejo coloreado ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ )

l : camino óptico (1 cm)

m : masa de muestra

### 2.2.7. Determinación de compuestos fluorescentes

La interacción de productos de oxidación lipídica con grupos amino de proteínas y otros componentes celulares llevan a la formación de compuestos fluorescentes, lo cual permite el seguimiento de esta interacción mediante la determinación de los mismos.

Se realizó una extracción de acuerdo a la técnica descrita por Bligh y Dyer (1959) sobre muestras de 5,00 g ( $\pm 0,01$  g), obteniéndose las correspondientes fases acuosa y orgánica.

Las determinaciones de compuestos fluorescentes fueron llevadas a cabo en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS 50 B acoplado a un software Flwinlab. Se obtuvieron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia en ambas fases, determinándose los correspondientes máximos. Se utilizó como patrón una solución de sulfato de quinina 1  $\mu\text{g/ml}$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05M, determinando su fluorescencia a 350/450. La fluorescencia relativa F fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula (Smith y col., 1990; Aubourg y col., 1992a):

$$FR = \frac{F_x V}{F_{st} \times m}$$

(Ec. 2.2.)

donde: F : fluorescencia de la muestra

V : volumen del extracto (orgánico o acuoso)

$F_{st}$  : fluorescencia del standard

m : masa de muestra

### 2.2.8. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los perfiles térmicos de las proteínas de músculo de salmón de mar fueron obtenidos en forma análoga a la descrita para las proteínas miofibrilares aisladas (ver sección 1.2.3. - **Materiales y Métodos - Capítulo 1**). En este caso, se analizaron muestras de 18 - 22 mg de músculo de salmón de mar durante distintos tiempos de almacenamiento refrigerado.

### 2.2.9. Proteína total extraíble y proteínas miofibrilares solubles

A fin de cuantificar la cantidad de **proteína extraíble total** del músculo almacenado se utilizó el método de Dyer y col. (1950) (Awad y col., 1969), con algunas modificaciones. Se homogeneizaron 2,50 g de músculo con 50,0 ml de buffer Tris-HCl 0,03 M, KCl 0,6 M, pH = 7. Se centrifugó durante 30 min a 1500 g (4

°C) separándose el sobrenadante, donde se determinó la cantidad de proteína extraíble total mediante el método de Biuret (Robson y col., 1968).

A partir del extracto de proteína total, se obtuvo un extracto de la **fracción miofibrilar soluble**. Para ello, se tomaron 10,00 ml del sobrenadante, se agregaron 90,0 ml de agua destilada y se dejó durante 16 - 24 h a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó durante 30 min a 2100 g a 4 °C, descartando el sobrenadante. El sedimento conteniendo las proteínas miofibrilares se resuspendió con 5,00 ml de solución buffer Tris-HCl 0,03M, KCl 0,6 M, (pH = 7). La concentración de proteínas miofibrilares solubles se determinó mediante el método de Biuret.

Las especies proteicas presentes en ambas fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE, en condiciones similares a las detalladas en la sección **1.2.4. (Materiales y Métodos - Capítulo 1)**

### **2.2.10. Lisina disponible**

Se analizaron posibles variaciones en el contenido de lisina disponible en muestras de músculo almacenado. A diferencia del estudio realizado en sistemas modelo, en este caso se utilizó un método más sencillo que permitió un seguimiento de este parámetro en función del tiempo de almacenamiento. Dicho método se basa en la reacción del ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) con grupos amino libre. Este compuesto puede reaccionar también con grupos sulfhidrilos (metionina), si bien esta reacción es más lenta, no revistiendo importancia en el tiempo de reacción empleado. Posteriormente, se determina la cantidad de TNBS que ha reaccionado por diferencia entre el total y el remanente sin reaccionar (Contreras Guzmán, 2003).

En el caso del músculo es necesaria una etapa previa de obtención de un sedimento de proteínas, a fin de eliminar la lisina que pueda encontrarse libre en el músculo.

**Obtención del precipitado de proteínas:** Se pesó 1,00 g de músculo picado y se agregaron 6,40 ml de etanol absoluto (para tener una concentración final de 80 % de etanol). Se centrifugó a 1500 g, 10 min, 4 °C, descartándose el

sobrenadante. El coágulo proteico resultante se trató con 5,00 ml de acetona, agitando para resuspender y se centrifugó nuevamente en iguales condiciones. Esta operación se repitió dos veces eliminándose la fase acetona. El sedimento resultante fue esparcido en un papel de filtro, a fin de eliminar la acetona remanente.

**Determinación de lisina disponible:** Se pesaron alrededor de 20 mg del precipitado de proteínas. Se agregaron 1,50 ml de metanol, 1,50 ml de buffer borato (0,5 M – pH = 9,2) y 0,20 ml de TNBS (20 mg/ml) a dos tubos muestra, dos tubos blanco de reactivos (sin muestra) y un tubo blanco agitándose durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 0,20 ml de solución saturada de alanina a todos los tubos excepto al blanco (a éste se le agregaron 0,20 ml de agua destilada). Se agitó durante 20 min. Posteriormente, se agregaron 2,00 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % p/v, se dejó 10 min y se centrifugó a 1500 g (10 min, 15 °C) (para precipitar las proteínas).

Se tomaron 0,50 ml del sobrenadante, se agregaron 9,50 ml de agua destilada (dilución 1/10) y se leyó la absorbancia a 345 nm de los tubos blanco de reactivo (Abs r) y de los tubos muestra (Abs m) contra el tubo blanco.

El porcentaje de lisina disponible presente en el precipitado se calculó según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ lisina (sedimento)} = \frac{(\text{Abs r} - \text{Abs m}) \times m_{\text{TNBS}} \times M_{\text{Lisina}} \times 100}{\text{Abs r} \times M_{\text{TNBS}} \times m_p} \quad (\text{Ec. 2.3.})$$

donde:  $m_{\text{TNBS}}$  = masa de TNBS en el tubo de reacción (4 mg)

$M_{\text{Lisina}}$  = masa molecular de la lisina = 146,2 g

$M_{\text{TNBS}}$  = masa molecular del TNBS = 293,2 g

$m_p$  = masa de sedimento colocada en el tubo de reacción

Conociendo el porcentaje de proteínas en el precipitado (determinado por Kjeldhal), se calculó el porcentaje de lisina disponible con respecto a la masa de proteínas totales.



### **2.2.11. Textura del músculo**

Se obtuvieron discos de músculo picado (tipo hamburguesa) de 1 cm de espesor utilizando un aro de acrílico de 10 cm de diámetro. Se realizó un análisis de perfil de textura (TPA) de los discos, tal como se ha detallado en la sección **1.2.10.1. (Materiales y Métodos - Capítulo 1)**

### **2.2.12. Gelación térmica**

Se obtuvieron geles por tratamiento térmico a partir de "surimi" obtenido manualmente.

**Obtención de surimi a nivel de laboratorio:** El músculo picado fue lavado 3 veces con agua destilada (4 °C) (5 partes de agua por cada parte de músculo, agitación suave, 10 min por cada lavado), separando el líquido mediante un colador de malla fina entre lavado y lavado. Luego del último lavado, el músculo fue prensado mediante una tela de gasa triple por torsión. Se agregó 2,5 % p/p de NaCl y se homogeneizó la pasta con espátula, manteniéndola a 4 °C hasta el día siguiente. La pasta obtenida contenía un 75 - 80 % de humedad. (Roussel y Cheffel, 1988)

**Obtención de los geles:** Se colocó la pasta en tubos de vidrio como fue detallado en la sección **1.2.10.** y se trató a 80 °C durante 45 min, enfriándose primero a temperatura ambiente y luego a 4 °C.

**Análisis de los geles:** Se realizó un análisis de perfil de textura (TPA) según ha sido explicado en la sección **1.2.10.1.**

### **2.2.13. Determinación del pH del músculo**

Se obtuvo un extracto acuoso colocando 10,00 g de músculo picado en 30 ml de agua destilada. Se dejó en reposo durante 1 a 2 h, se filtró y se midió el pH en el filtrado mediante un pHmetro.

### **2.2.14. Determinaciones de Nitrógeno Básico Volátil total (NBV-t) y Trimetilamina (TMA)**

Se preparó un extracto a partir de 5,00 g de músculo picado y 20,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 7 % p/v, dejando en reposo durante 30 min. Se filtró en papel y se realizaron las determinaciones sobre el filtrado.

NBV-t y TMA fueron determinados por el método de microdifusión de Conway (Conway y Byrne, 1933), mediante la técnica de Maciolek (1962) modificada por el Instituto de Biología Marina (Mar del Plata).

### **2.2.15. Recuento de microorganismos aerobios totales**

Se homogeneizaron 10,00 g de músculo picado con 90 ml de agua peptonada (0,1 % p/v). Se realizaron diluciones decimales progresivas del homogenato inicial en agua peptonada y se sembró 1 ml en profundidad en agar para recuento en placa (PCA). Se incubó a 25-30 °C durante 3-4 días (Gram, 1992, Huss, 1998).

### **2.2.16. Determinación de parámetros de color**

Se utilizó un colorímetro triestímulo Minolta CR300. Se determinaron los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$  en muestras correspondientes a distintos tiempos de almacenamiento, tomando 2 muestras y realizando 5 mediciones en cada muestra, cubriendo todas las zonas de la misma.

### **2.2.17. Análisis estadístico**

Se analizó el efecto de distintas variables (tiempo de almacenamiento, agregado de cloro al agua de lavado, agregado de antioxidante) sobre las diversas determinaciones mediante un análisis de varianza (ANAVA). La comparación de las medias se realizó mediante el test de la menor diferencia significativa (LSD) de Fisher, considerándose que dos medias eran significativamente diferentes cuando la probabilidad determinada era menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Estos análisis se realizaron utilizando el programa SYSTAT (Wilkinson, 1990)

## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSION

### A. MODIFICACIONES DURANTE EL ALMACENAMIENTO REFRIGERADO DEL MÚSCULO DE SALMÓN DE MAR

#### 2.3.1. Composición proximal del músculo de salmón de mar

El salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*) es una especie que no ha sido suficientemente estudiada desde el punto de vista alimenticio, por lo cual se encuentra disponible en literatura poca información acerca de la composición del músculo y menos aún sobre las variaciones estacionales de estos componentes. Por esta razón, se decidió determinar los principales componentes del músculo de la especie en estudio en individuos capturados en distintas épocas del año. Los componentes determinados fueron: proteínas, lípidos, agua y cenizas. En la **Tabla 2.1** se muestra un promedio del contenido de cada uno de estos componentes, sin discriminar los individuos según su sexo, edad o época de captura. Las determinaciones se realizaron sobre material proveniente de todas las zonas del cuerpo, el cual fue picado y mezclado, por lo que la información obtenida corresponde a datos promedio del músculo total.

**Tabla 2.1.** Composición del músculo de salmón de mar

Componente	g/100 g músculo
Proteínas	18,26 ± 0,72
Lípidos	0,56 ± 0,36
Humedad	80,50 ± 0,69
Cenizas	1,28 ± 0,07

Estos resultados difieren, fundamentalmente en cuanto al contenido de lípidos, de otros informados en bibliografía donde dicho contenido alcanzaba un valor de 2,2% (Fundación Atlántica, 1984). Según los datos obtenidos, el salmón de mar se ubicaría en la Categoría F previamente definida (ver sección 1.1.2.2. - **Introducción**), con un valor intermedio de proteínas y bajo de lípidos en

concordancia con lo esperado para una especie demersal. También podemos caracterizarla como una especie magra.

Es importante remarcar que el contenido de proteínas no sufrió modificaciones importantes en función de la época de captura ni del tamaño de los ejemplares, en concordancia con lo que sucede en la mayoría de las especies, salvo en aquellas que realizan largas migraciones por desove (Huss, 1998).

En cambio, los lípidos sufrieron variaciones en función de la época de captura y, de manera notable, en función de su tamaño, variando en un rango entre 0,28 % (valor obtenido en el mes de noviembre, ejemplar hembra de 2,750 kg) y 1,08 % (mes de agosto, ejemplar macho de 11 kg). En general, el menor contenido de lípidos en este tipo de peces se da en el período de pre-desove y desove. Según exámenes macroscópicos realizados por Elías y Burgos (1988), la época de desove para esta especie comienza en noviembre y prosigue hasta diciembre. Sin embargo, ejemplares pequeños capturados en épocas de post-desove presentaron contenidos lipídicos bajos. Por ejemplo, individuos de alrededor de 1,8 kg capturados en marzo presentaron un 0,32 % de lípidos.

Con el objetivo de obtener una mayor información, el análisis de las posibles alteraciones durante el almacenamiento refrigerado se llevaron a cabo por un período superior al correspondiente a la vida útil del sustrato en estudio, considerando que el deterioro limitante corresponde al crecimiento microbiano.

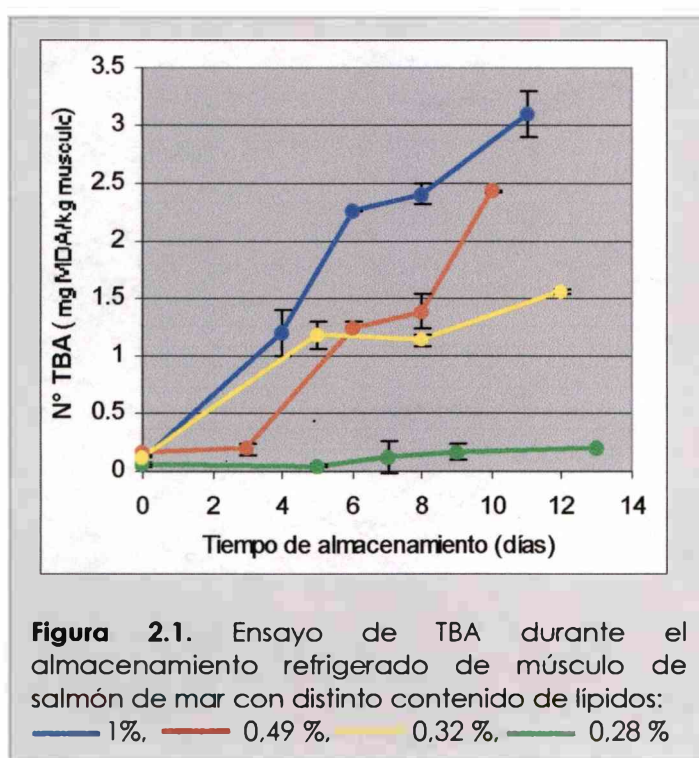
### **2.3.2. Seguimiento de la oxidación lipídica: Número de TBA**

En el presente trabajo se utilizó un método de extracción ácida (ver sección **I.II.1.3.- Introducción General**) para evaluar la evolución de la oxidación lipídica durante el almacenamiento refrigerado del músculo picado de salmón de mar. A distintos tiempos de almacenamiento se tomaron dos muestras al azar obteniéndose los correspondientes extractos y se realizó la determinación por duplicado sobre cada extracto. Los resultados se expresaron como número de TBA = mg malonaldehído (MDA)/kg de músculo.

### a. Efecto del contenido lipídico sobre el número de TBA

Se realizaron experiencias con pescados en distintos estadios biológicos, capturados en distintas épocas del año, los que presentaron diferentes contenidos de materia grasa. Los niveles de oxidación iniciales fueron similares en todos los casos ( $N^{\circ}$  TBA = 0,11 – 0,15 mg MDA/kg de músculo), excepto en el caso del menor contenido lipídico encontrado (0,28 %) donde el valor inicial del TBA fue de 0,05 mg MDA/kg de músculo.

El número de TBA aumentó significativamente en función del tiempo hasta el sexto día de almacenamiento. Entre el día 6 y el 9 permaneció constante,



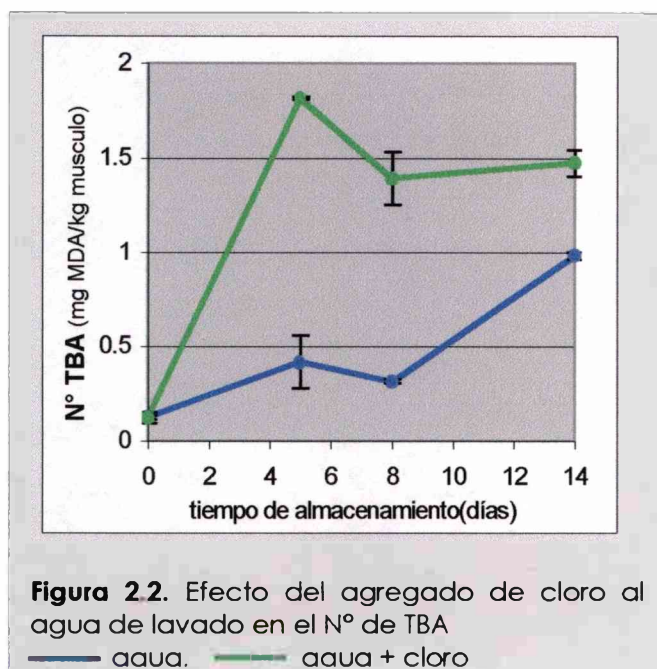
aumentando nuevamente en la última etapa del almacenamiento (Figura 2.1.). Dicho comportamiento fue similar en todos los casos, excepto en el músculo con muy bajo contenido lipídico. Además, los niveles de oxidación alcanzados fueron dependientes del contenido lipídico, a mayor porcentaje de lípidos, mayor fue el número de TBA determinado.

El músculo de salmón de mar con el menor contenido de lípidos no mostró variaciones en

el número de TBA en la primera etapa del almacenamiento, presentando un leve aumento a partir del séptimo día, aunque los valores alcanzados luego de 13 días fueron muy bajos ( $0,20 \pm 0,05$  mg MDA/kg de músculo). En este caso, se trataba de un ejemplar hembra capturado en noviembre, mes en el cual comienza el desove y los peces tienen el menor nivel de compuestos de reserva lipídica. Es posible que los lípidos encontrados en este músculo correspondan, en una proporción muy grande, a fosfolípidos presentes en las membranas celulares.

### b. Efecto del agregado de cloro en el agua de lavado sobre el número de TBA

Tal como se mencionó en **Materiales y Métodos**, se ensayaron dos condiciones de lavado de los filetes -sin y con agregado de cloro (1 ppm) al agua de red- a fin de evaluar una posible disminución en la carga microbiana inicial. Dado el carácter oxidante del cloro, se evaluó su efecto sobre la oxidación de los lípidos del músculo almacenado.



En la **Figura 2.2.** se compara la evolución del número de TBA para ambas condiciones de lavado, en un músculo con un contenido lipídico promedio de 0,32 %. Es posible observar un importante aumento en la generación de productos reactivos al TBA en las muestras tratadas con mayor concentración de cloro, principalmente en los primeros 5 días de almacenamiento,

alcanzando los valores máximos en este tiempo. Las muestras provenientes de filetes lavados con agua sin agregado de cloro mostraron un menor aumento en los primeros 8 días de almacenamiento, con una mayor pendiente entre los días 8 y 14.

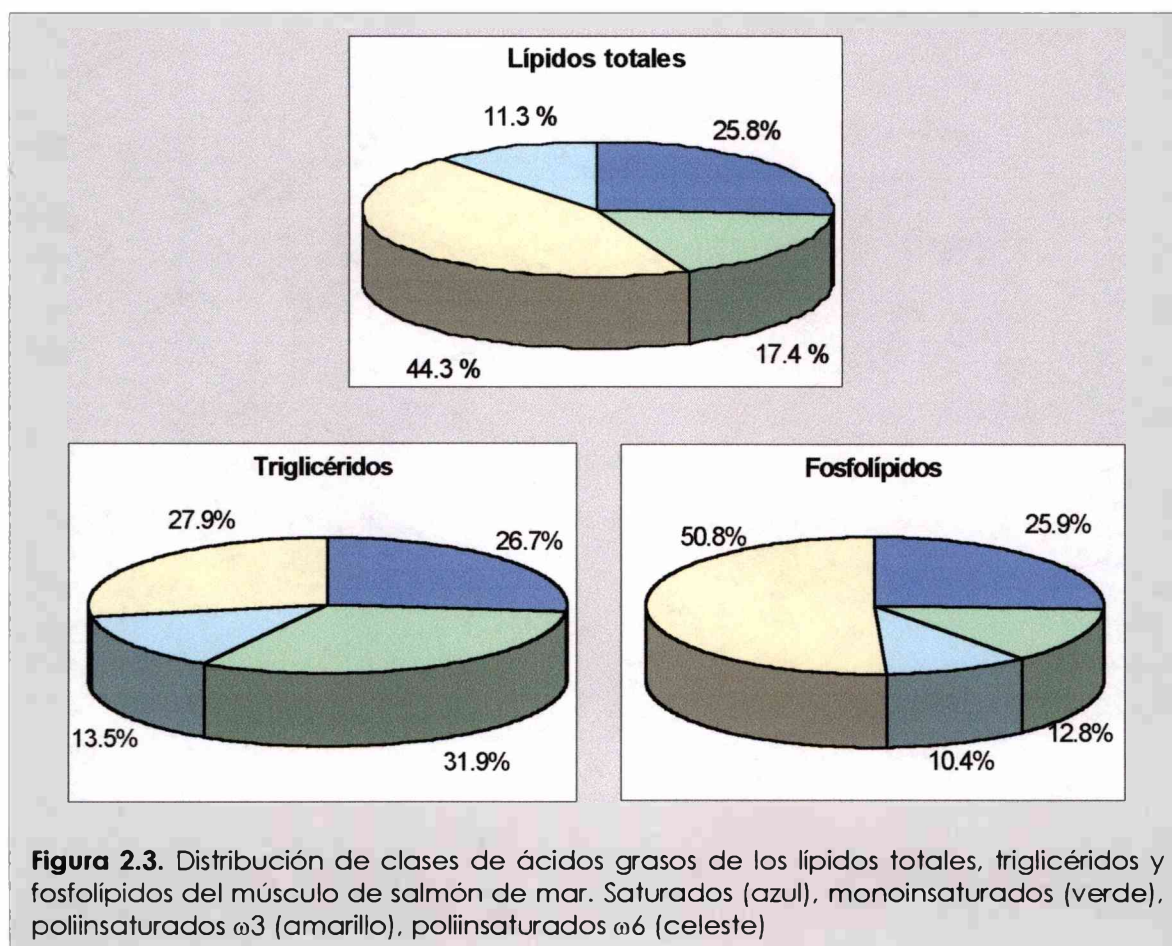
En función de estos resultados podemos decir que la presencia de una mayor concentración de cloro en el agua de lavado de los filetes, aceleraría de manera muy importante el proceso de oxidación lipídica en el músculo. Por lo tanto esta es una variable a tener en cuenta en el procesamiento del pescado, a fin de lograr el balance más adecuado entre la calidad higiénica y otros parámetros de calidad relacionados con las características funcionales, nutricionales y de inocuidad del producto.

### 2.3.3. Modificaciones en la composición de la fracción lipídica

Se estudió la composición de la fracción lipídica y el perfil de ácidos grasos del músculo de salmón de mar, a partir de extractos de lípidos totales obtenidos por el método de Bligh y Dyer (1959). Los resultados mostrados a continuación corresponden a músculos con un contenido de lípidos entre 0,32 y 0,38 %.

Las principales fracciones constituyentes de los lípidos de salmón de mar fueron: triglicéridos (TG) = 16,8 % p/p y fosfolípidos (FL) = 83,2 % p/p. Por lo tanto, en los ejemplares analizados la mayor proporción de los lípidos corresponden a los fosfolípidos constituyentes de las membranas celulares.

Se analizó el perfil de ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa, tanto del extracto de lípidos totales como de las fracciones de fosfolípidos y triglicéridos. Los ácidos grasos pueden ser divididos en las siguientes clases: saturados (sat), monoinsaturados (mono), poliinsaturados subdivididos a su vez en





$\omega$ 3 (o n-3) y  $\omega$ 6 (o n-6). En la **Figura 2.3.** se muestra la proporción de las clases de ácidos grasos en las fracciones de los lípidos totales, triglicéridos y fosfolípidos.

Como muestra la figura, más de un 55 % de los ácidos grasos totales del músculo de salmón de mar corresponden a ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), con una gran proporción de ácidos  $\omega$ 3 (44,3 %) y una muy alta relación  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 (3,9:1).

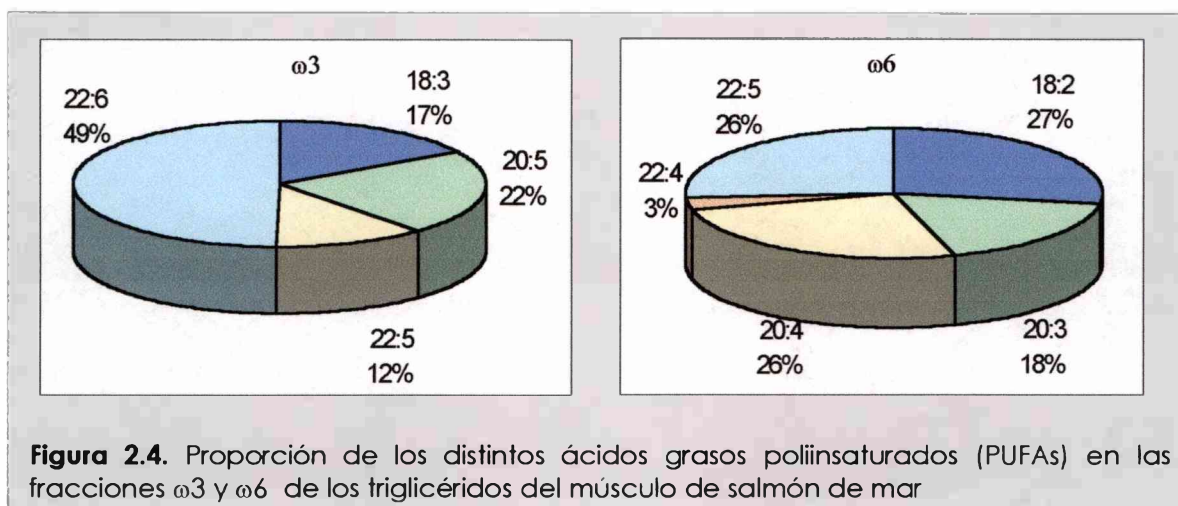
La proporción de cada clase de ácidos grasos es diferente en las distintas fracciones. En los triglicéridos, la fracción más importante (31,9 %) correspondió a los ácidos grasos monoinsaturados, con predominio de ácido oleico (18 : 1) y ácido palmitoleico (16 : 1). La fracción de ácidos saturados representó el 26,7 % de los triglicéridos, siendo el ácido palmítico (16 : 0) y el ácido esteárico (18 : 0) los más importantes. Dentro de los PUFAs, los  $\omega$ 3 se encontraron en mayor proporción (27,9 %), mientras que los  $\omega$ 6 representaron un 13,5 %.

En el caso de los fosfolípidos, la proporción de ácidos grasos monoinsaturados (12,8 %) fue sensiblemente menor que la encontrada en los triglicéridos, mientras que la proporción de los ácidos saturados fue prácticamente similar. La proporción de PUFAs  $\omega$ 3 (50,8 %) fue casi el doble de la registrada en los triglicéridos, mientras que la de  $\omega$ 6 disminuyó del 13,5 al 10,4 %. Por lo tanto, en función de dicha distribución de ácidos grasos y de la proporción de fosfolípidos a triglicéridos anteriormente mencionada, un alto porcentaje de los ácidos grasos  $\omega$ 3 del músculo del salmón de mar se encontrarían formando parte de los fosfolípidos.

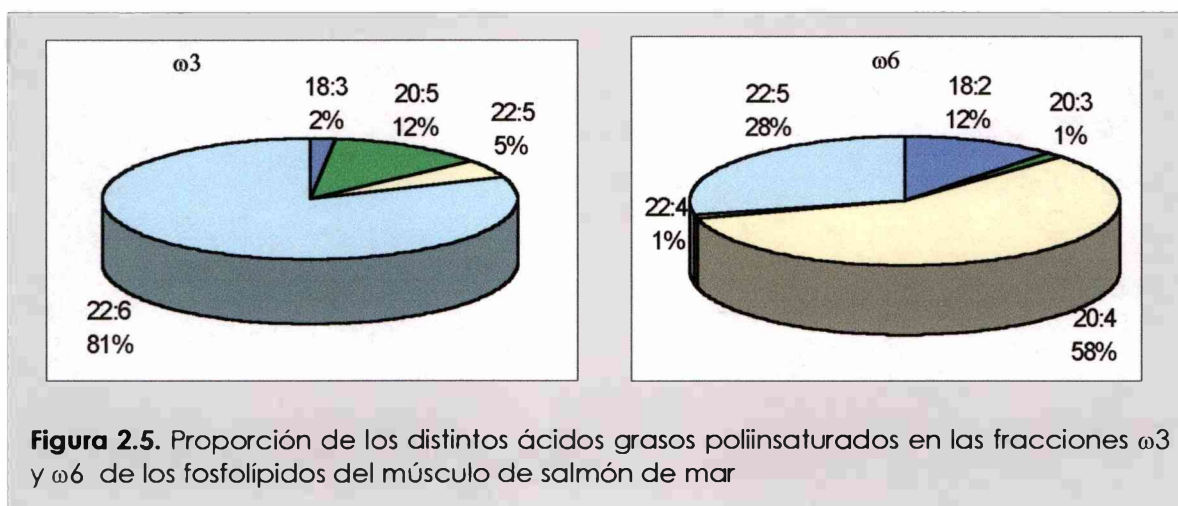
Dada la importancia de los PUFAs en el proceso de oxidación, se analizó la composición de las fracciones  $\omega$ 3 y  $\omega$ 6 presentes en cada una de las fracciones.

La fracción de los triglicéridos (**Figura 2.4.**) contiene una alta proporción del ácido docosahexaenoico (DHA) (22 : 6  $\omega$ 3) (49 %) y menores proporciones de ácido eicosapentaenoico (EPA) (20 : 5  $\omega$ 3), ácido linolénico (18 : 3) y ácido docosapentaenoico (DPA) (22 : 5  $\omega$ 3) (22, 17 y 12 % respectivamente). Dentro de la fracción de los  $\omega$ 6, los ácidos 18:2, 20:4 y 22:5 se encontraron en mayor y similar proporción (26-27 %), seguidos por el ácido 20:3 (18 %) y el 22:4 (3 %).

La **Figura 2.5.** muestra la composición de ácidos  $\omega$ 3 y  $\omega$ 6 correspondiente a la fracción de los fosfolípidos. Dicha fracción presentó una composición de ácidos

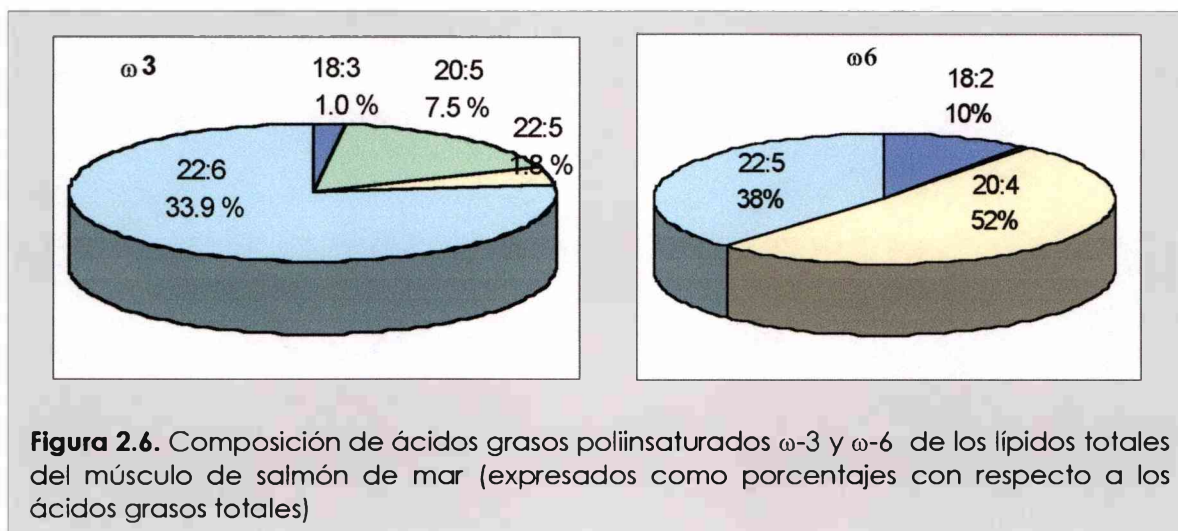


grasos poliinsaturados cuantitativamente diferente a la de los triglicéridos. En cuanto a los  $\omega 3$ , la proporción de DHA fue notablemente mayor (81 %), disminuyendo en gran medida los ácidos 18:3 y 22:5. En el caso de los  $\omega 6$  se encontró un alto porcentaje de ácido araquidónico (20:4) (58 %), disminuyendo sensiblemente el porcentaje del ácido 20:3 y en menor medida el 18:2.



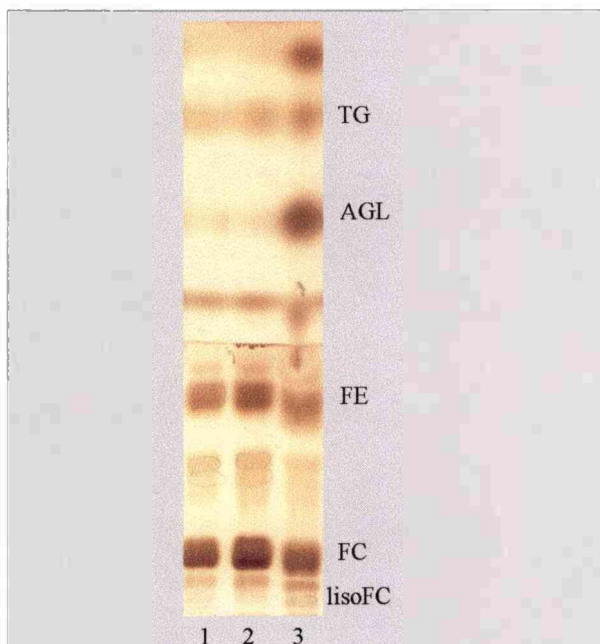
Finalmente, la **Figura 2.6.** muestra la composición de los ácidos grasos  $\omega 3$  y  $\omega 6$  del extracto de lípidos totales, expresados como porcentaje de los ácidos grasos totales. Dicha composición refleja principalmente la composición de los fosfolípidos, dada la baja cantidad de triglicéridos encontrados en el músculo de salmón de mar. Es notable la alta proporción del ácido docosahexaenoico (DHA) (22 : 6  $\omega 3$ ). Este ácido graso es indispensable para el desarrollo del sistema

nervioso central y de las células fotorreceptoras del sistema visual, siendo crítica su deficiencia durante el crecimiento fetal y post natal (Valenzuela y col., 1999).



### Cambios en la fracción lipídica debidos al almacenamiento refrigerado

Se analizaron las modificaciones que ocurrieron en la fracción lipídica durante el almacenamiento refrigerado del músculo de salmón de mar. En primer



**Figura 2.7.** Cromatografía en capa fina (TLC) de los lípidos totales de músculo de salmón de mar en función del tiempo de almacenamiento refrigerado: 0 (calle 1), 6 días (calle 2) y 9 días (calle 3)

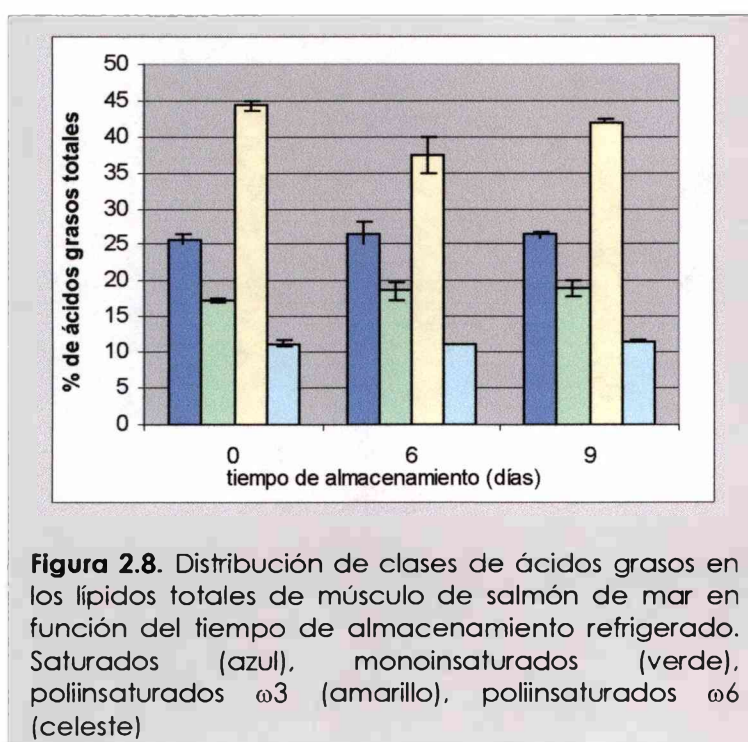
término, se investigaron los cambios que podrían ocurrir en las distintas fracciones lipídicas mediante cromatografía en capa fina (TLC), separando los componentes presentes en la fracción de los lípidos polares (fosfolípidos) y en la de los lípidos neutros.

Al inicio del almacenamiento, la fosfatidilcolina (FC) y la fosfatidiletanolamina (FE) fueron los componentes principales de los fosfolípidos (Figura 2.7. - calle 1), aunque se registraron, en esta fracción, otros componentes minoritarios, entre los cuales puede

mencionarse el fosfatidilinositol (PI), identificado mediante la realización de TLC bidimensional (resultado no mostrado). La banda correspondiente a los triglicéridos (TG) presentó una baja intensidad, de acuerdo con la cantidad presente en el músculo en el día 0 del almacenamiento. No se registró la presencia de ácidos grasos libres (AGL) en el día 0 del almacenamiento.

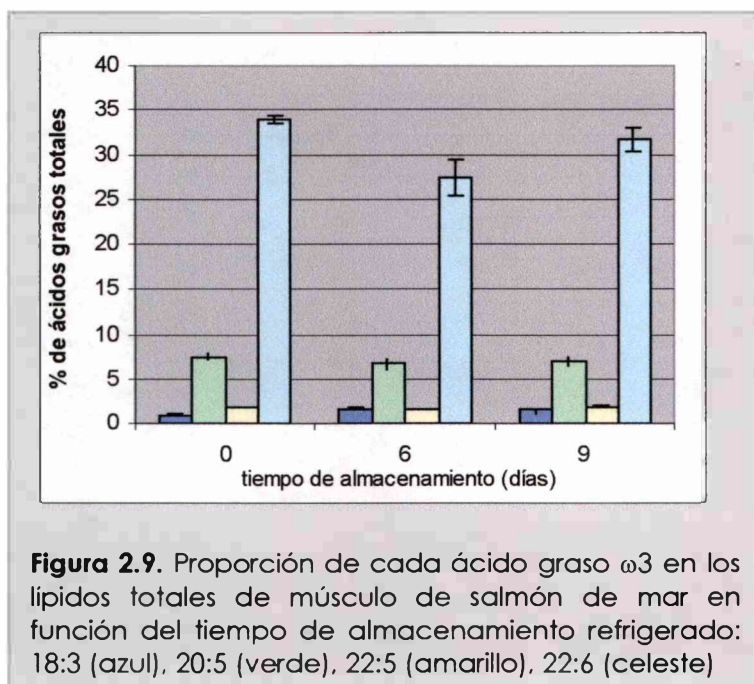
Luego de 6 días de almacenamiento refrigerado, no se observaron diferencias importantes (**Figura 2.7. - calle 2**). Sin embargo, luego de 9 días de almacenamiento se registró la aparición de una banda muy intensa correspondiente a AGL y la aparición de pequeñas cantidades de lisofosfatidilcolina (lisoFC) simultáneamente con una disminución de la FC y la FE y un aumento en la intensidad relativa de los triglicéridos (**Figura 2.7. - calle 3**). Estos resultados indican una hidrólisis de los fosfolípidos, generando ácidos grasos libres, muy intensa a los 9 días del almacenamiento refrigerado.

Por otra parte, se investigaron posibles modificaciones en el perfil de ácidos grasos de los lípidos totales en función del tiempo de almacenamiento refrigerado mediante cromatografía gaseosa. Analizando la proporción de cada una de las clases de ácidos grasos presentes, pudo observarse una disminución significativa

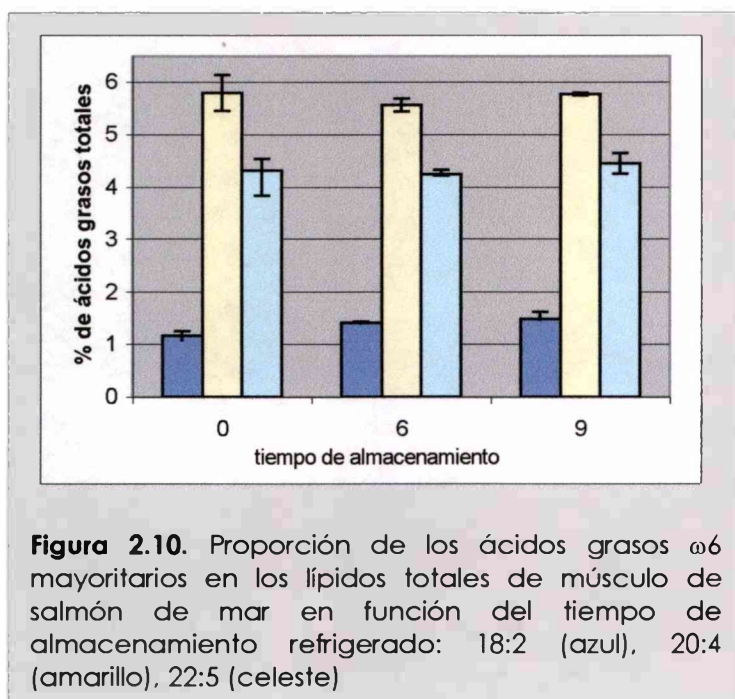


( $p < 0,05$ ) en la proporción de ácidos poliinsaturados  $\omega_3$  luego de 6 días de almacenamiento (**Figura 2.8.**). Dicha disminución fue de aproximadamente un 7 % con respecto a los ácidos grasos totales. Sin embargo, luego de 9 días de almacenamiento, la proporción de los ácidos  $\omega_3$  fue algo mayor a la registrada a los 6 días, aunque menor que la

inicial.



almacenamiento refrigerado. Dicha evolución fue similar a la registrada para la fracción  $\omega 3$ , siendo además similar el porcentaje de reducción en ambos casos (aproximadamente 7 %). Estos hechos sugieren que el ácido 22:6  $\omega 3$  es el principal responsable de los cambios registrados en la fracción  $\omega 3$ .



También se analizó la variación en la composición cuantitativa de las fracciones  $\omega 3$  y  $\omega 6$ . Los resultados obtenidos en la fracción  $\omega 3$  se muestran en la **Figura 2.9**. El ácido graso 22:6  $\omega 3$  (DHA) presentó una disminución significativa en su porcentaje a los 6 días, aumentando levemente en el día 9 del

La fracción  $\omega 6$  no presentó modificaciones significativas en función del tiempo de almacenamiento refrigerado (**Figura 2.10.**).

Los resultados obtenidos sugieren que el principal ácido graso involucrado en la oxidación lipídica sería el DHA (22:6  $\omega 3$ ). El porcentaje de reducción registrado para dicho ácido fue bajo (7 % de los ácidos grasos totales). Una posible

explicación a este hecho podría ser que el proceso de oxidación estuviera afectando solo a la fracción de triglicéridos.

#### **2.3.4. Determinación de compuestos de interacción de carácter fluorescente**

Dado que los productos secundarios de la oxidación lipídica pueden reaccionar con grupos amino presentes en proteínas, péptidos, aminoácidos libres y fosfolípidos (Aubourg, 1999a), los ensayos asociados con su determinación, pueden presentar dificultades, especialmente cuando el proceso se encuentra en una etapa avanzada. Por lo tanto, se han desarrollado métodos para detectar los compuestos de interacción en los que el análisis de fluorescencia constituye una herramienta para la determinación de la calidad de un producto en lo que se refiere a las consecuencias del deterioro oxidativo.

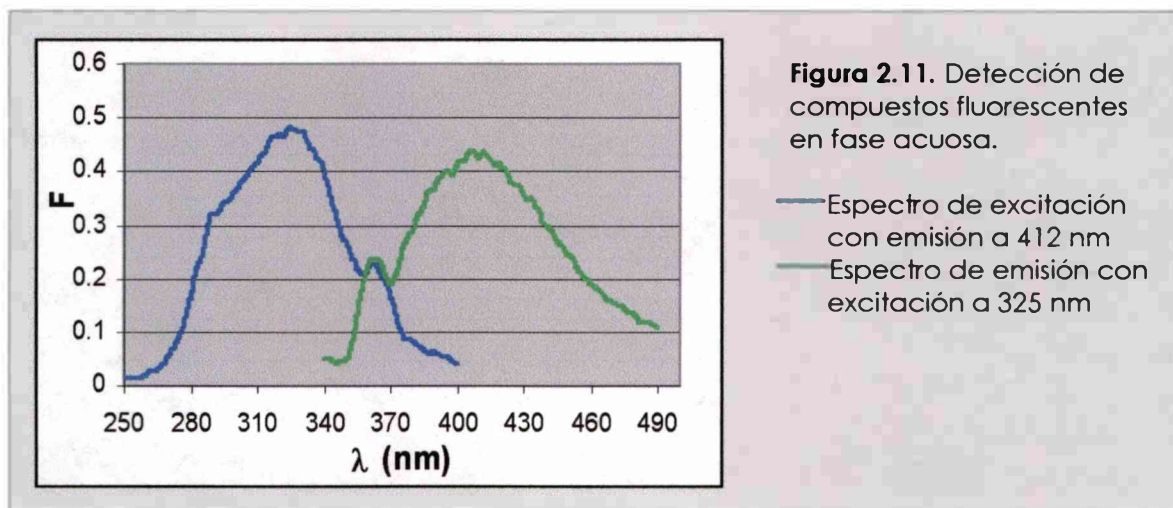
En función de las diversas investigaciones realizadas, pueden identificarse tres grupos de fluoróforos según sus máximos de excitación y emisión (Wold y Mielnik, 2000). Un grupo con máximo de excitación entre 320 y 360 nm y máximo de emisión entre 410 y 460 nm, el cual estaría relacionado con reacciones de metil linoleato oxidado, hidroperóxidos de metil linoleato y aldehídos (distintos de malonaldehído) con distintos compuestos amino (Kilugawa y col., 1985). Un segundo grupo de fluoróforos con máximo de excitación entre 370 y 405 nm y de emisión entre 450 y 470 nm que resultaría de la interacción entre malonaldehído y grupos amino (Chio y Tappel, 1969b; Kilugawa y col., 1981; Kilugawa y Beppu, 1987). Por último, un tercer grupo con máximos de excitación entre 425 y 455 nm y de emisión entre 500 y 525 nm ha mostrado ser un buen indicador de deterioro oxidativo en alimentos deshidratados de origen animal, siendo asociados a proteínas unidas a fluorocromos (Hasegawa y col., 1992)

En el presente trabajo, se evaluó la formación de compuestos de interacción en el músculo de salmón de mar mediante la determinación de fluorescencia en las fases orgánica y acuosa (Bligh y Dyer, 1959). Para ello, el primer paso fue la determinación de los máximos de excitación y emisión del sistema en estudio.

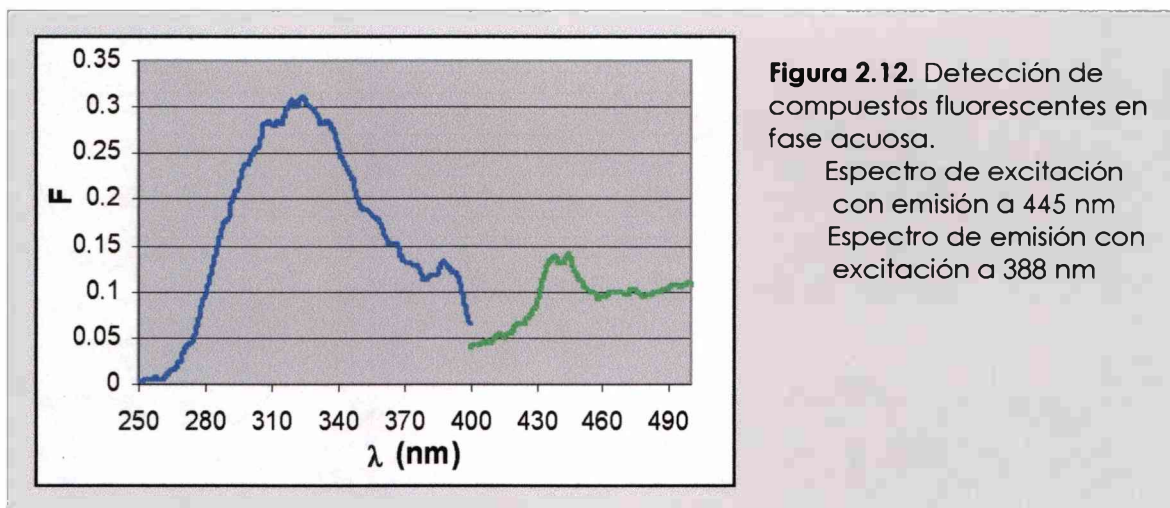
### 2.3.4.1. Determinación de los máximos de excitación y emisión de fluorescencia

Se realizaron experiencias a partir de muestras almacenadas en refrigeración, obteniéndose los respectivos extractos orgánicos y acuosos para finalmente registrar los distintos espectros de excitación y emisión y así poder determinar los correspondientes máximos.

En fase acuosa se encontraron 3 pares principales de máximos de excitación/emisión a las siguientes longitudes de onda: 289/341, 325/412 y 388/445. El primer par (289/341) puede correlacionarse con la excitación y emisión de fluorescencia de aminoácidos aromáticos, por lo cual no serán considerados en adelante como indicadores de compuestos de interacción. En la **Figura 2.11.** pueden observarse los espectros de excitación con emisión a 412 nm y de emisión con excitación a 325 nm, mientras que en la **Figura 2.12.** pueden observarse los espectros de excitación con emisión a 445 nm y de emisión con excitación a 388 nm.



El espectro de excitación con emisión a 445 nm presentó un pico con valor máximo a 325 nm y otro pico menor con máximo a 388 nm. Por lo tanto, se podría pensar en la existencia de dos especies diferentes (con diferentes máximos de excitación) que emiten a 388 nm. De acuerdo con sus valores de intensidad de fluorescencia (F), la especie cuyo máximo de excitación se encuentra en 325 nm estaría en mayor concentración que la especie con máximo de excitación a 388



nm en las muestras analizadas. Por otra parte, el compuesto con excitación máxima a 325 nm presentó su máxima emisión a 412 nm, tal como se observa en la **Figura 2.11**.

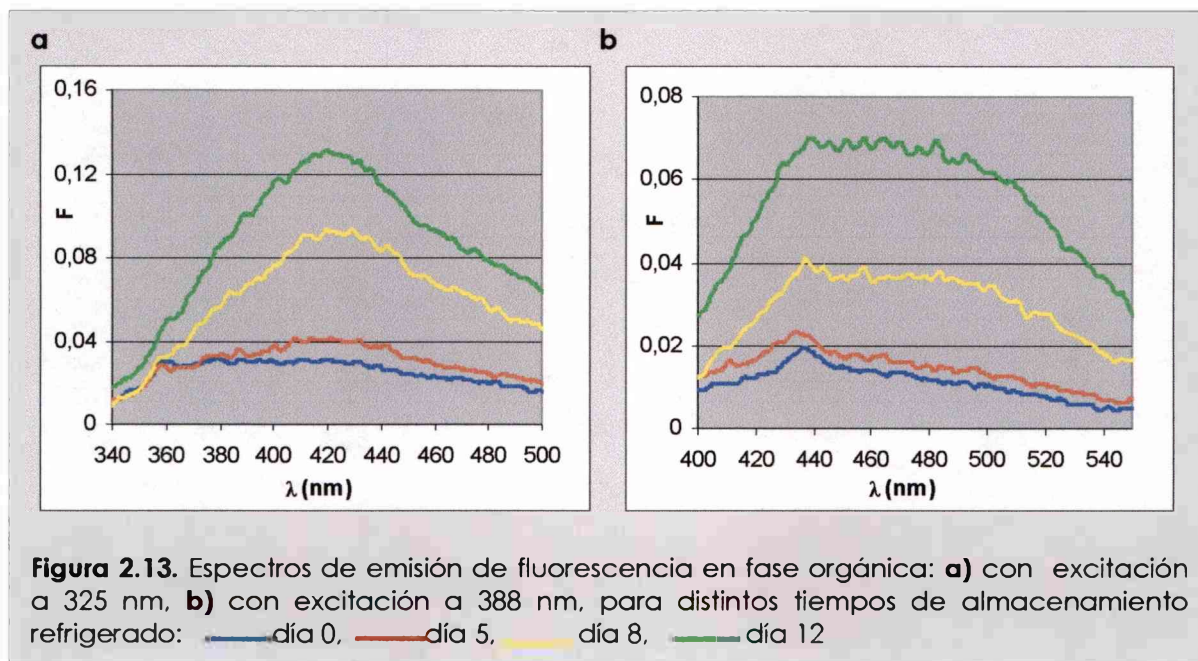
En función de estos resultados y dado que, en fase orgánica se hallaron espectros similares cuyos máximos se encontraban desplazados en unos pocos nm con respecto a los de la fase acuosa, se decidió realizar el seguimiento de la formación de compuestos de interacción mediante la obtención de espectros de emisión con excitación a 325 nm y 388 nm, tanto en fase acuosa como orgánica. Por otra parte, estos máximos de excitación se correlacionan con los determinados por Aubourg y col. (1992a) (327 y 393 nm).

#### **2.3.4.2. Seguimiento de los compuestos de interacción durante el almacenamiento refrigerado**

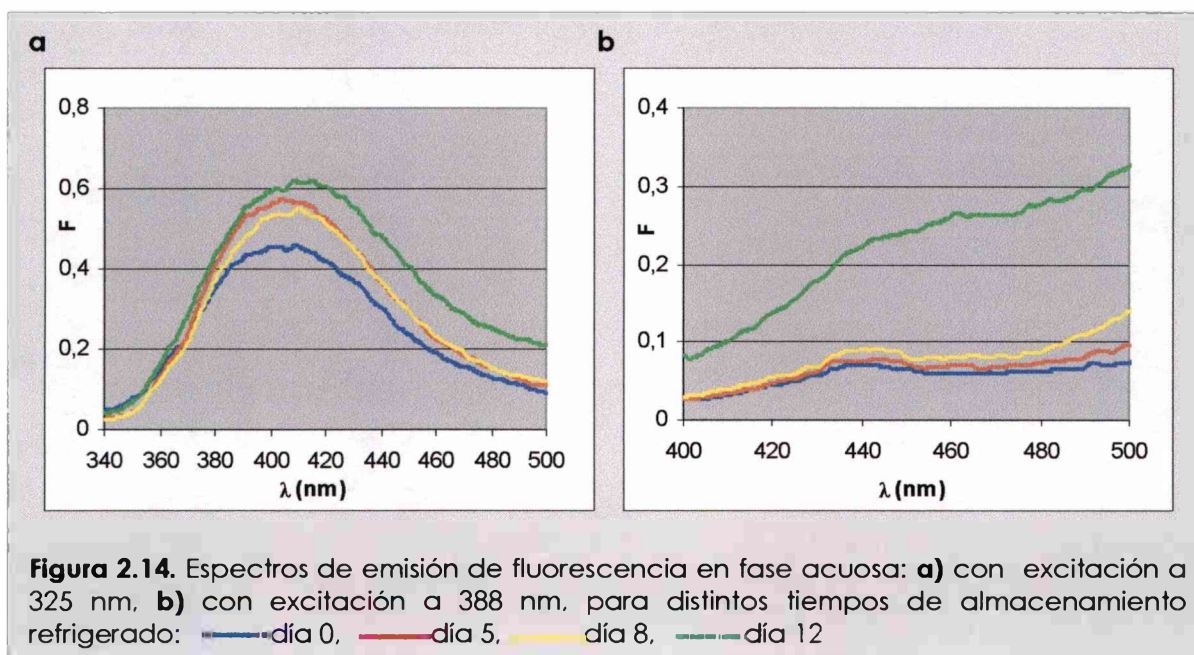
##### **a. Evolución de los compuestos fluorescentes durante el almacenamiento**

La **Figura 2.13**. muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la fase orgánica, obtenidos para distintos tiempos de almacenamiento refrigerado del músculo de salmón de mar. De la misma manera, la **Figura 2.14**. muestra los espectros de emisión obtenidos en la fase acuosa. En todos los casos, la intensidad de fluorescencia relativa  $F$  fue calculada tal como se indicó en la sección **2.2.7**. de **Materiales y Métodos** correspondiente a este capítulo.



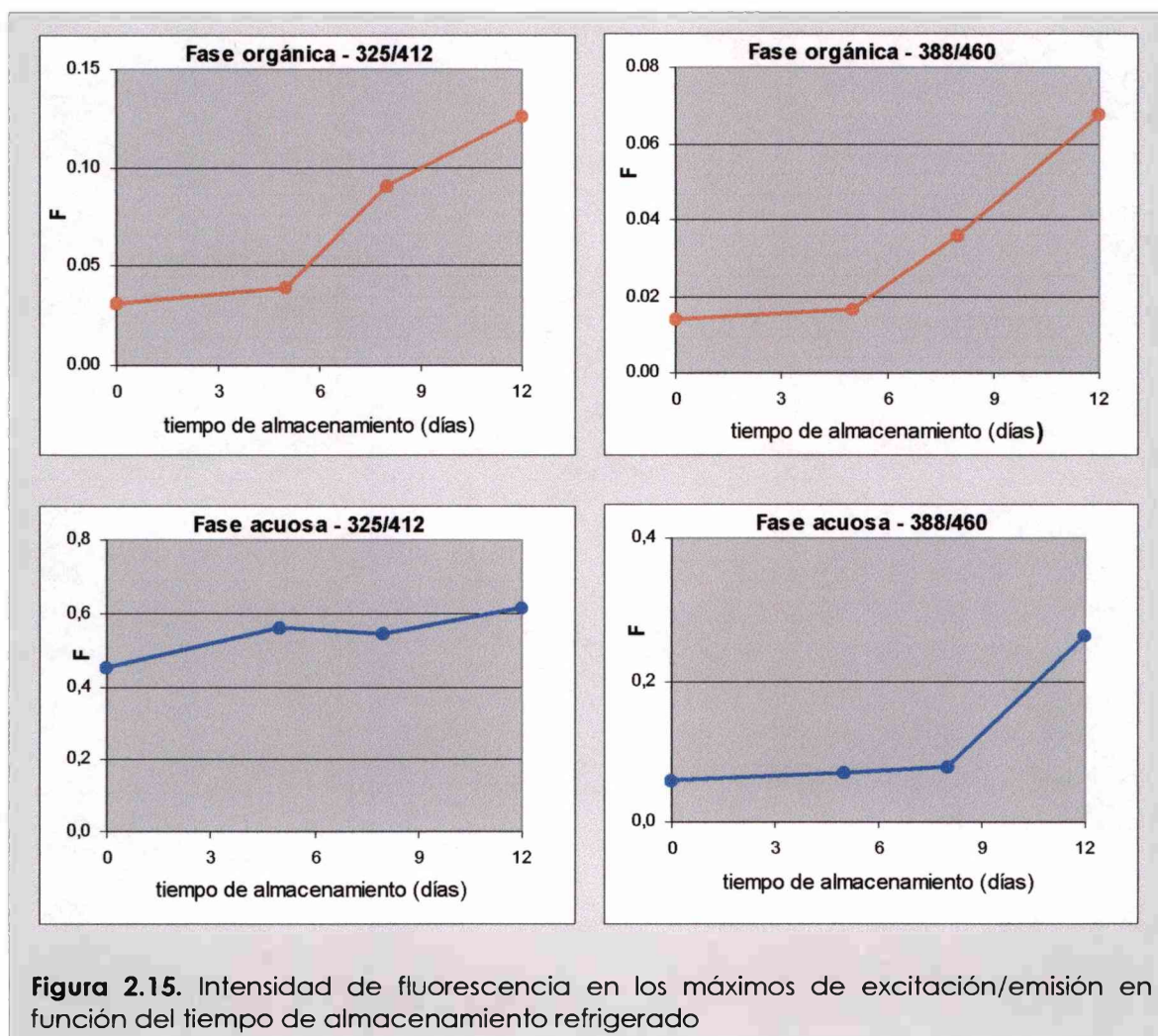


Los espectros de emisión presentados fueron obtenidos en músculos con un contenido lipídico promedio de 0,32 %, provenientes de pescados capturados en el mes de marzo. Similar evolución de los compuestos fluorescentes fue registrada en otras experiencias con pescados capturados en otras épocas del año, con diferente contenido de lípidos.



A partir de los espectros de emisión se obtuvieron los valores de la intensidad de fluorescencia,  $F$ , en los máximos de emisión/excitación (325/412 y 388/460) en función del tiempo de almacenamiento. En el caso de la excitación a 388 nm, se consideró la máxima emisión a una longitud de onda de 460 nm, en lugar de 445 nm como se había obtenido en las experiencias preliminares, ya que se observó un corrimiento hacia esa mayor longitud de onda en las muestras más deterioradas. Igualmente, el análisis considerando la fluorescencia a 388/445 arrojó resultados similares a los obtenidos a 388/460. En la **Figura 2.15**, se muestra la evolución de los máximos de excitación/emisión en ambas fases en función del tiempo de almacenamiento refrigerado.

La fluorescencia a 325/412 y a 388/460 en fase orgánica presentó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) a los 8 días de almacenamiento en el caso mostrado (**Figura 2.15**, - panel superior). En otros músculos analizados el aumento



**Figura 2.15.** Intensidad de fluorescencia en los máximos de excitación/emisión en función del tiempo de almacenamiento refrigerado

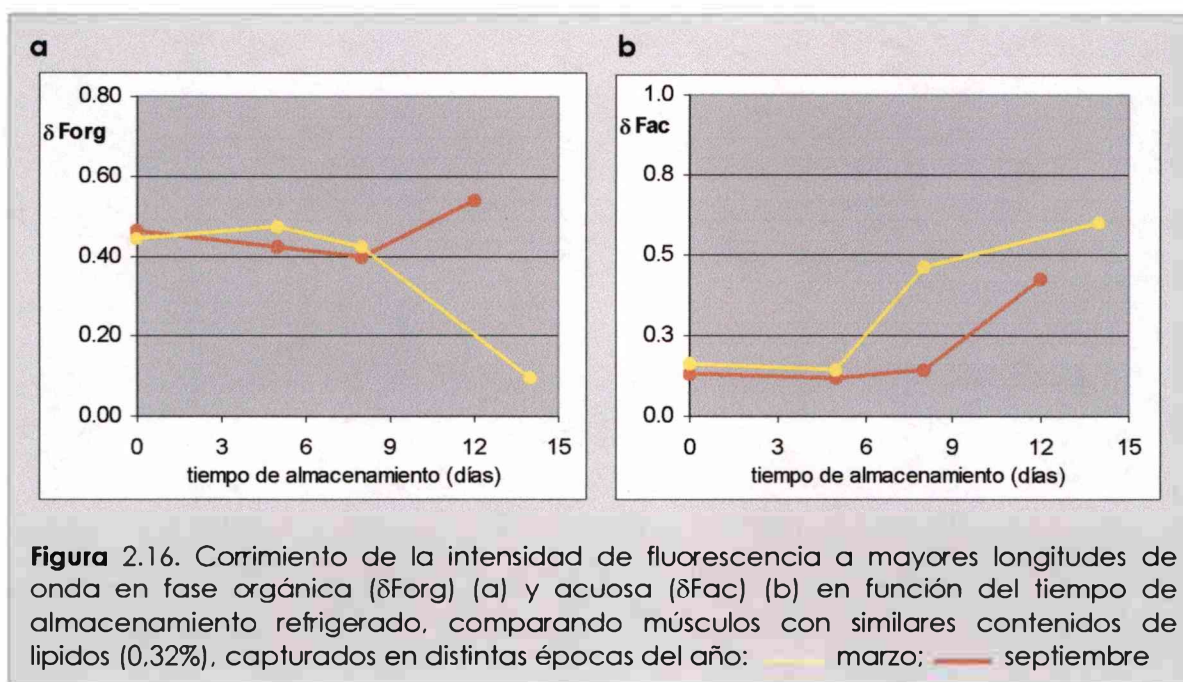
de la fluorescencia a 325/412 se produjo en un tiempo posterior a los 8 días, mientras que el aumento a 388/460 se registró a los 6 días de almacenamiento (datos no mostrados).

En fase acuosa, la intensidad de fluorescencia a 325/412 presentó una tendencia a aumentar en función del tiempo de almacenamiento (12 días) (**Figura 2.15.** - panel inferior), mientras que en un almacenamiento más prolongado se evidenció un incremento muy marcado de este parámetro (casi 10 veces con respecto al valor inicial). En todos los casos, la fluorescencia a 388/460 aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) hacia el final de los almacenamientos (**Figura 2.15.** - panel inferior).

Como ya se mencionó anteriormente, la evolución de los compuestos de interacción entre productos de oxidación lipídica y grupos amino del músculo puede vincularse con un corrimiento a mayores longitudes de onda. Dicho corrimiento ha demostrado ser, en otros sistemas, un mejor parámetro indicador para el seguimiento de estos compuestos que la evolución de la intensidad de fluorescencia en los máximos. En virtud de ello, se evaluó el comportamiento de los corrimientos en fase acuosa y en fase orgánica ( $\delta\text{Fac}$  y  $\delta\text{Forg}$ ) en el músculo de salmón de mar almacenado en refrigeración, de acuerdo a lo descrito en la sección **2.2.7.** de **Materiales y Métodos.** Por otra parte, esta relación entre intensidades de fluorescencia permite una mejor comparación entre diferentes experiencias. En la **Figura 2.18.** se muestran los resultados obtenidos en dos experiencias realizadas en dos épocas diferentes del año con pescados con similares contenidos lipídicos (0,32 %).

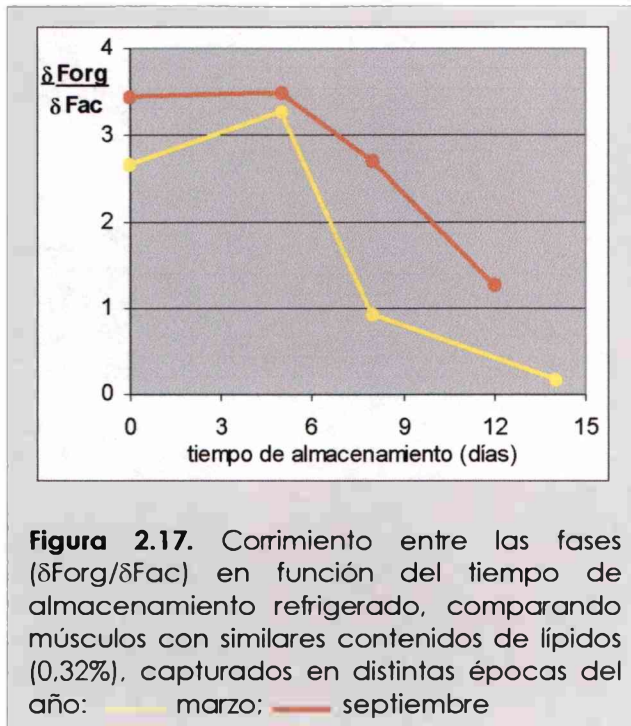
El valor de  $\delta\text{Forg}$  se mantuvo constante a lo largo de 12 días de almacenamiento (**Figura 2.16.a.** - línea roja), sin embargo disminuyó significativamente cuando el almacenamiento fue más prolongado ( $p < 0,05$ ) (**Figura 2.16.a.** - línea amarilla).

Por otra parte, el parámetro  $\delta\text{Fac}$  se mantuvo constante durante los primeros 5 días en un caso (**Figura 2.16.b.** - línea roja) y 8 días en el otro (**Figura 2.16.b.** - línea roja), aumentando significativamente a mayores tiempos de almacenamiento ( $p < 0,05$ ).



Estos resultados demuestran que, efectivamente, ocurrió un desplazamiento de la fluorescencia a mayores longitudes de onda en función del tiempo de almacenamiento refrigerado del músculo de salmón de mar. Este hecho indicaría un cambio en las concentraciones relativas de las distintas especies responsables de la fluorescencia, tanto de las presentes en fase orgánica como en fase acuosa. Teniendo en cuenta además los cambios registrados en la intensidad de fluorescencia en cada máximo, podemos inferir que ocurrió también un aumento en la concentración absoluta de todas las especies fluorescentes.

En función de la evolución encontrada en  $\delta\text{Forg}$  y  $\delta\text{Fac}$  se calculó también el corrimiento entre las fases como la relación  $\delta\text{Forg}/\delta\text{Fac}$  (Figura 2.17.). Los resultados obtenidos muestran un corrimiento de la intensidad de fluorescencia hacia la fase acuosa luego del quinto día de almacenamiento, indicando un aumento del carácter polar de los compuestos fluorescentes presentes en el músculo de salmón de mar a medida que evoluciona el almacenamiento. Dichos compuestos fluorescentes polares podrían ser producto de la reacción entre productos de oxidación y otros compuestos carbonílicos y grupos amino libres de proteínas, péptidos o aminoácidos presentes en fase acuosa.



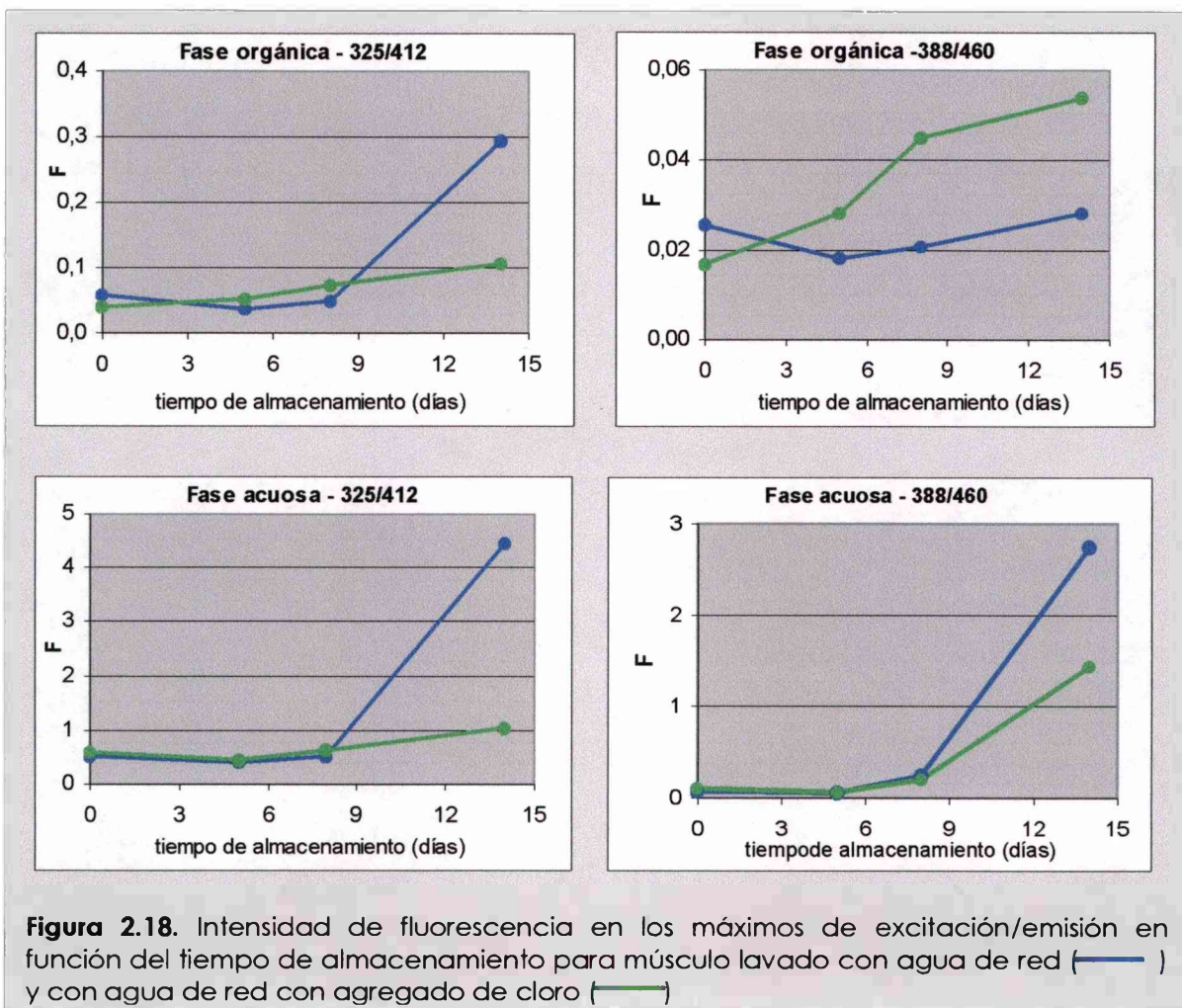
Los resultados obtenidos en la determinación de compuestos fluorescentes muestran que la evolución de dichos compuestos no ocurre paralelamente a la evolución de los productos de oxidación lipídica dada por el número de TBA. Los cambios vinculados con los compuestos fluorescentes ocurrieron de manera retrasada con respecto al aumento en el número de TBA.

Los datos obtenidos pueden correlacionarse con los encontrados

por Aubourg y col. (1998) en polaca (*Micromesistius poutassou*). Al igual que el salmón de mar, ésta es una especie no grasa, cuyo contenido de lípidos se encuentra entre 0,50 y 0,75 %. La determinación del número de TBA en esa especie mostró un incremento a los 6 días de almacenamiento. En cuanto a los compuestos fluorescentes, el  $\delta\text{Forg}$  experimentó un aumento a los 2 días de almacenamiento y una disminución después de los 10 días. La diferencia en este comportamiento con respecto al encontrado en el salmón de mar, podría atribuirse a que la polaca fue procesada y almacenada 10 h después de la captura, mientras que en el presente almacenamiento el salmón de mar fue procesado y almacenado luego de un lapso de 3 a 4 días. Por lo tanto, el aumento del  $\delta\text{Forg}$  observado por Aubourg y col. (1998) podría haber ocurrido previo al procesamiento en el caso del salmón (día 0 del almacenamiento), por lo cual no sería registrado posteriormente. En la fase acuosa proveniente del músculo de polaca se observó un progresivo incremento del  $\delta\text{Fac}$ , haciéndose importante después del día 13, tal como ocurrió en el salmón de mar. Nuevamente, los datos encontrados para  $\delta\text{Forg}/\delta\text{Fac}$  en polaca correlacionan con los obtenidos en este trabajo ya que en aquella especie este parámetro presentó un máximo a los 2 días disminuyendo posteriormente.

**b. Efecto del agregado de cloro al agua de lavado de los filetes en la evolución de los compuestos fluorescentes.**

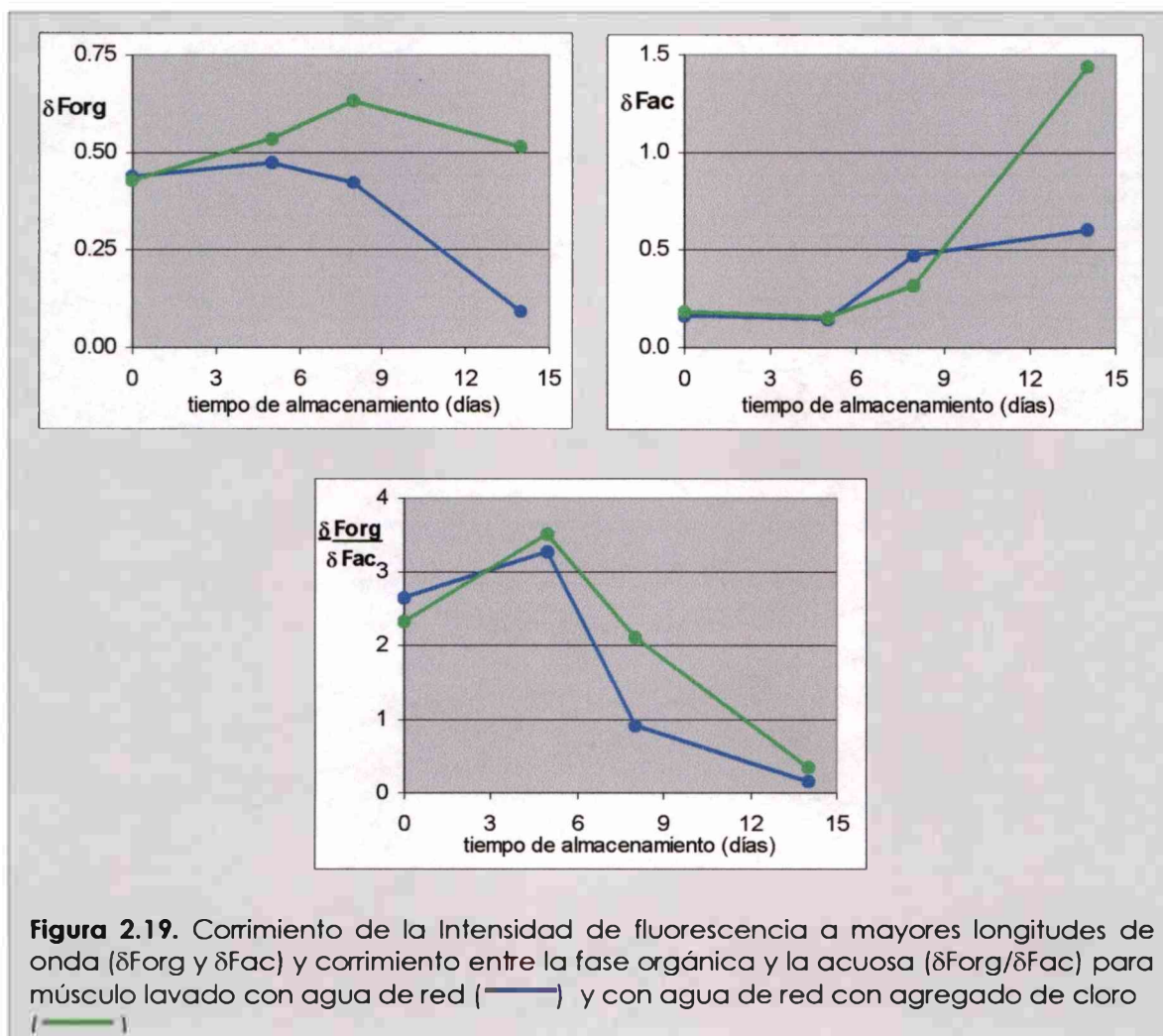
Se analizaron los espectros de emisión de fluorescencia en muestras almacenadas procedentes de filetes lavados sin y con agregado de cloro al agua de red. A partir de los respectivos espectros de emisión se calculó la intensidad de fluorescencia  $F$  en los correspondientes máximos (325/412 y 388/460). La **Figura 2.18.** muestra la evolución de  $F$  en las fases orgánica y acuosa en función del tiempo de almacenamiento, comparando muestras con y sin agregado de cloro al agua de lavado.



La presencia de una mayor concentración de cloro en el agua de lavado de los filetes, produjo cambios en la evolución de los compuestos fluorescentes. En la fase orgánica, las muestras lavadas con mayor concentración de cloro no

presentaron un aumento en la intensidad de fluorescencia a 325/412 al final del almacenamiento, mientras que a 388/460 la fluorescencia mostró un incremento progresivo, significativo a partir de los 8 días ( $p < 0,05$ ), a diferencia del músculo lavado con agua de red donde no se registró ese aumento. En la fase acuosa, se evidenció un menor aumento ( $p < 0,05$ ) de la fluorescencia al final del almacenamiento en las muestras tratadas con mayor concentración de cloro, tanto a 325/412 como a 388/460, aunque en menor medida en este último caso.

En la **Figura 2.19**, se comparan los respectivos corrimientos  $\delta\text{Forg}$ ,  $\delta\text{Fac}$  y  $\delta\text{Forg}/\delta\text{Fac}$ . La fase orgánica correspondiente a muestras tratadas con mayor concentración de cloro presentó mayores valores de  $\delta\text{Forg}$  luego de 8 y 14 días de almacenamiento ( $p < 0,05$ ). El  $\delta\text{Fac}$  mostró un comportamiento similar en ambas muestras durante los primeros 8 días del almacenamiento, haciéndose significativamente mayor para las muestras tratadas con agregado de cloro en el



**Figura 2.19.** Corrimiento de la Intensidad de fluorescencia a mayores longitudes de onda ( $\delta\text{Forg}$  y  $\delta\text{Fac}$ ) y corrimiento entre la fase orgánica y la acuosa ( $\delta\text{Forg}/\delta\text{Fac}$ ) para músculo lavado con agua de red (—) y con agua de red con agregado de cloro (—).

día 14 ( $p < 0,05$ ).

Estos resultados sugieren la presencia de una mayor proporción de compuestos fluorescentes con mayores longitudes de onda de emisión y excitación en ambas fases por efecto del agregado de cloro al agua de lavado. En el caso de la fase acuosa, este efecto solo fue evidente al final del almacenamiento (14 días) mientras que en fase orgánica, las diferencias se observaron a tiempos más cortos de almacenamiento (8 días).

El corrimiento entre las fases mostró una caída más lenta entre el quinto y el octavo día para el músculo lavado con agregado de cloro, con un valor significativamente mayor al de la otra muestra en el día 8 ( $p < 0,05$ ), alcanzando ambas muestras valores similares al final del almacenamiento.

Estas diferencias con respecto al músculo tratado con agua de red, sugieren una correlación con las diferencias en la evolución del número TBA mostradas en la **Figura 2.2**. El mayor corrimiento de la fluorescencia a mayores longitudes de onda en fase orgánica podría estar vinculado con el mayor nivel de oxidación registrado en el músculo lavado con mayor concentración de cloro.

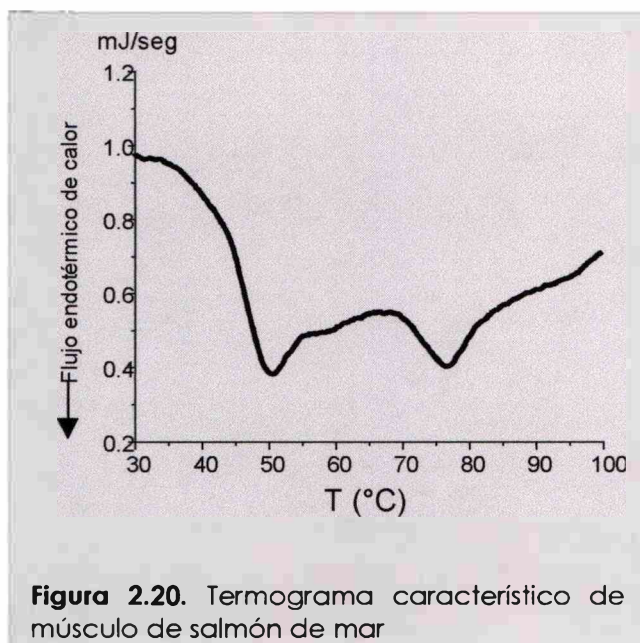
Los resultados obtenidos en fase orgánica no parecen mostrar una correlación tan directa, ya que las diferencias se presentaron muy tardíamente en el almacenamiento.

### **2.3.5. Modificaciones de la fracción proteica**

#### **2.3.5.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

**a. Análisis de las transiciones térmicas en el músculo entero de salmón de mar.** Se analizaron las transiciones que tienen lugar en el músculo de salmón de mar (músculo fresco al inicio de los almacenamientos) debidas a la desnaturalización de las proteínas constituyentes dadas por el tratamiento térmico aplicado. Se estudiaron muestras provenientes de pescados capturados en distintas épocas del año, no encontrándose diferencias significativas en los termogramas obtenidos. La **Figura 2.20** muestra un termograma característico de músculo de salmón de mar.





**Figura 2.20.** Termograma característico de músculo de salmón de mar

El músculo en estudio presentó dos endotermas, con temperaturas de pico  $T_{m\acute{a}x}$  a  $50,6 \pm 0,9$  °C y  $76,6 \pm 1,0$  °C, respectivamente. El primer pico es atribuido principalmente a la desnaturalización de la miosina y a una pequeña contribución de las proteínas sarcoplasmáticas poco estables. El segundo pico es debido principalmente a desnaturalización de la actina, pudiendo existir una contribución de otras proteínas

sarcoplasmáticas (Poulter y col., 1985, Hastings y col., 1985). En el Capítulo 1 (sección **1.3.1. - Resultados y Discusión**) se mencionó que las temperaturas de desnaturalización de las proteínas del músculo se encuentran muy relacionadas con la temperatura del hábitat del animal. La  $T_{m\acute{a}x}$  correspondiente a la desnaturalización de la miosina en el músculo de salmón de mar difiere de las encontradas en especies de aguas frías tales como bacalao (*Gadus morhua*), arenque (*Clupea harengus*) y trucha arco iris (*Salmo gairdneri*) (42,0, 43,0 y 45,7 °C respectivamente) (Hastings y col., 1985; Howell y col., 1991). Por otra parte, los pescados de aguas tropicales presentan mayores  $T_{m\acute{a}x}$  para la miosina, tales como tilapia (*Sarotherodon aureus*) (52,7 °C), "catfish africano" (*Clarias gariepinus*) (55,1 °C), perca del Nilo (*Lates niloticus*) (55,7 °C), pargo emperador (*Lutianus sebae*) (53,6 °C), besugo (*Gymnocranius rivalatus*) (51,7 °C). Cabe aclarar, que las tres primeras especies son peces tropicales de agua dulce y las otras dos pertenecen a un ambiente marino (Poulter y col., 1985, Howell y col., 1991). A diferencia de lo observado en las proteínas miofibrilares aisladas, donde la miosina de salmón de mar presentaba temperaturas de desnaturalización similares a las de especies de agua fría como el bacalao, el músculo mostró una  $T_{m\acute{a}x}$  de miosina superior a los valores informados para dichas especies, aunque algo inferior a los informados para especies tropicales. Las diferencias de comportamiento entre la miosina

presente en el músculo y la proteína aislada podrían estar relacionados con distintos modos de asociación de dichas moléculas en el músculo entre las diferentes especies (Davies y col., 1988).

Por otra parte, termogramas obtenidos para músculo bovino presentaron tres picos, el primero correspondiente a miosina (cabeza,  $T_{m\acute{a}x} = 58,9$  °C), el segundo atribuido a miosina (cola), proteínas sarcoplásmicas y tejido conectivo ( $T_{m\acute{a}x} = 67,2$  °C) y el tercero correspondiente a la desnaturalización de actina ( $T_{m\acute{a}x} = 80,2$  °C) (Wagner y Añón, 1986a). Como puede observarse, estas temperaturas de pico son superiores a los encontrados en las distintas especies de pescados, como fue anteriormente demostrado por Connell (1961). Además, el segundo pico del músculo de bovino no se encuentra presente o es muy poco evidente en el músculo de pescado. En el caso del salmón de mar, solo pudo observarse un pequeño hombro alrededor de los 60 °C. Esta diferencia es debida al bajo contenido de colágeno en el músculo de pescado, lo cual hace que este componente no pueda ser fácilmente detectado en los termogramas (Poulter y col., 1985).

En cuanto a los cambios de entalpía asociados a la desnaturalización proteica, los valores encontrados para salmón de mar fueron:  $\Delta H_{mio} = 8,8 \pm 1,6$  J/g;  $\Delta H_{act} = 1,6 \pm 0,7$  J/g;  $\Delta H_{total} = 10,4 \pm 1,6$  J/g.

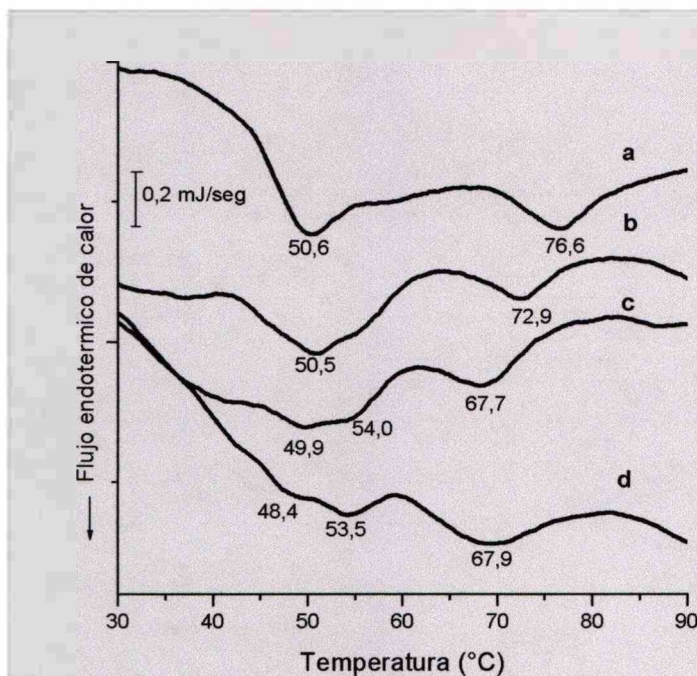
La comparación de los termogramas correspondientes al músculo entero de salmón de mar y los correspondientes a las proteínas miofibrilares aisladas (pH = 7,0) (**sección 1.3.1. - Resultados y Discusión - Capítulo 1**), muestra importantes diferencias. En primer término, la desnaturalización de la miosina presenta dos transiciones en las proteínas aisladas ( $T_{m\acute{a}x} = 42,4$  y  $52,7$  °C), la primera asociada a la cabeza globular y la segunda a la cola fibrosa de esta proteína. Sin embargo, en el músculo entero (pH alrededor de 6,4), la miosina presenta una única transición a  $50,6$  °C. Las temperaturas de inicio ( $T_0$ ) de las endotermas también fueron diferentes;  $42,8$  °C para el músculo entero y  $33,0$  °C para las proteínas aisladas. En el caso de la actina, su temperatura de desnaturalización fue de  $68,4$  y  $76,9$  °C en las proteínas aisladas y en el músculo entero, respectivamente. Estos resultados muestran una menor estabilidad térmica de al menos una región de la molécula de miosina (probablemente la cabeza globular) así como de la actina

en las proteínas aisladas, lo cual podría estar relacionado con la pérdida de asociación entre las moléculas que ocurre al extraer las proteínas del músculo. Este efecto también ha sido observado en proteínas de músculo bovino (Wagner y Añón, 1986) y en diversas especies marinas (Paredi y col., 1994, 1998, 2002).

**b. Análisis de las transiciones térmicas en el músculo de salmón de mar almacenado refrigerado.** Se obtuvieron los termogramas correspondientes a muestras de músculo de salmón de mar almacenadas en refrigeración.

Como puede observarse en la **Figura 2.21.**, ocurrieron cambios en los perfiles térmicos de las proteínas musculares en función del tiempo de almacenamiento.

En primer lugar, detectaron cambios en la estabilidad térmica de las proteínas. Luego de 7 días de almacenamiento, la miosina no presentó cambios



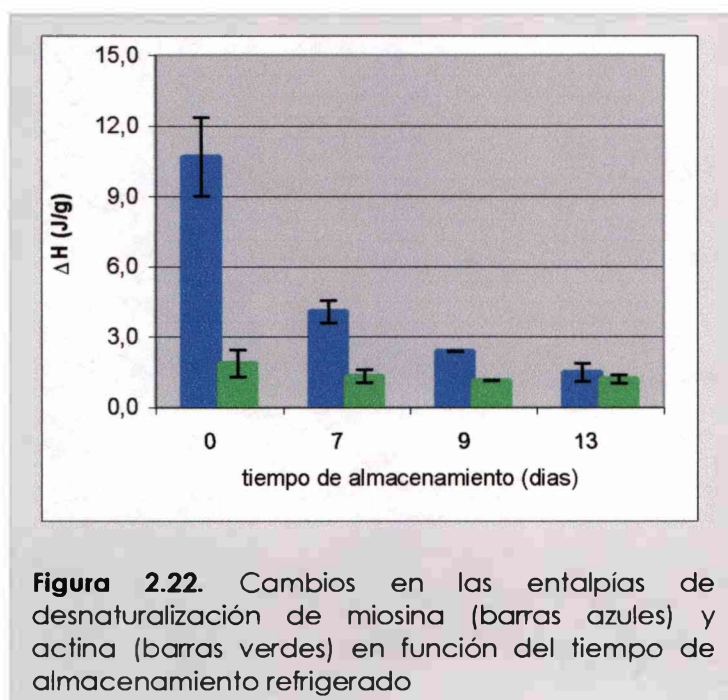
**Figura 2.21.** Termogramas de músculo de salmón de mar correspondientes a distintos tiempos de almacenamiento: **a)** día 1. **b)** día 7 **c)** día 9 **d)** día 13.

en su  $T_{m\acute{a}x}$  aunque puede observarse en los termogramas la aparición de un pequeño hombro entre los 54 y 55 °C. Sin embargo, la actina mostró una temperatura de desnaturalización menor ( $72,9 \pm 0,4$  °C) (**Figura 2.21.b**). A los 9 días de almacenamiento, la transición debida a la desnaturalización de miosina se desdobló en dos picos ( $49,9 \pm 0,3$  y  $54,0 \pm 0,3$  °C), mientras que la

correspondiente a la actina disminuyó aún más su  $T_{m\acute{a}x}$  ( $67,7 \pm 0,4$ ) (**Figura 2.21.c**). Luego de 13 días de almacenamiento, los termogramas registrados fueron

similares a los descritos, aunque la temperatura correspondiente al primer pico de desnaturalización de la miosina fue levemente menor ( $p < 0,05$ ) (Figura 2.21.d).

Los perfiles térmicos registrados en la última etapa del almacenamiento son similares a los descritos en el capítulo anterior para las proteínas miofibrilares aisladas (sección 1.3.1. - Resultados y Discusión). Este hecho sugiere que los cambios en la estabilidad térmica detectados durante el almacenamiento estarían relacionados principalmente con una ruptura de la estructura normal de los miofilamentos.



Por otra parte, también se observaron cambios en las entalpías de desnaturalización de las proteínas musculares en función del tiempo de almacenamiento (Figura 2.22.). La miosina mostró una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de su entalpía de desnaturalización a los 7 días; quedando aproximadamente un 40 % de esta proteína en estado nativo. A mayores tiempos de almacenamiento, se registraron decrementos adicionales de este parámetro, permaneciendo 20 y 15 % de la estructura nativa de la miosina para 9 y 13 días de almacenamiento refrigerado, respectivamente. Por otra parte, la actina no mostró cambios significativos en su entalpía de desnaturalización en función del tiempo de almacenamiento refrigerado, similarmente a lo registrado en otras especies tales como bovino (Wagner y Añón, 1986a)

Los estudios de DSC realizados indican importantes modificaciones en las proteínas musculares durante el almacenamiento refrigerado, siendo la miosina la proteína mas afectada ya que además de presentar una disminución en su estabilidad térmica, evidenció una importante pérdida de la estructura nativa

durante el almacenamiento. La actina muestra una marcada disminución de su estabilidad térmica sin cambios en su conformación.

Estudios de DSC realizados en músculo de bacalao y tilapia no mostraron cambios significativos en los termogramas luego de 9 días (después de la muerte) de almacenamiento a 0 °C (Poulter y col., 1985). Sin embargo, para poder correlacionar los distintos resultados, hay que tener en cuenta que transcurrió un tiempo de aproximadamente 3-4 días entre la captura y el procesamiento (día 0) del salmón de mar, por lo cual el día 7 de almacenamiento –donde comienzan a evidenciarse las modificaciones antes discutidas- correspondería a 10-11 días después de la muerte.

### 2.3.5.2. Solubilidad de proteínas

A fin de analizar posibles cambios en la solubilidad de las proteínas musculares a lo largo del almacenamiento refrigerado se obtuvo la fracción de *proteínas extraíbles totales* (PT) tal como se indicó en la sección 2.2.9. de **Materiales y Métodos**, la cual corresponde a todas las proteínas musculares solubles en una solución de alta fuerza iónica (KCl 0,6 M – pH = 7). Por lo tanto, dicha fracción contendrá tanto a las proteínas sarcoplasmáticas (PS) como a las proteínas miofibrilares (PM), así como también otros compuestos nitrogenados no proteicos, quedando como residuo no extraído el tejido conectivo. A partir del extracto anterior, las proteínas sarcoplasmáticas fueron separadas para obtener la fracción de *proteínas miofibrilares solubles* (PM) (sección 2.2.9).

Los valores de solubilidad de las distintas fracciones proteicas procedentes de músculos de pescados cuyo peso se encontraba entre 2,2 y 4,2 kg, capturados en distintas épocas del año (junio, septiembre y noviembre) fueron:

Fracción	g proteína soluble/ 100 g músculo	g proteína soluble/ 100 g proteínas totales
PT	7,6 ± 0,5	40,8 ± 2,7
PM	1,3 ± 0,2	6,9 ± 1,5
PS	6,3 ± 0,5	33,9 ± 2,4

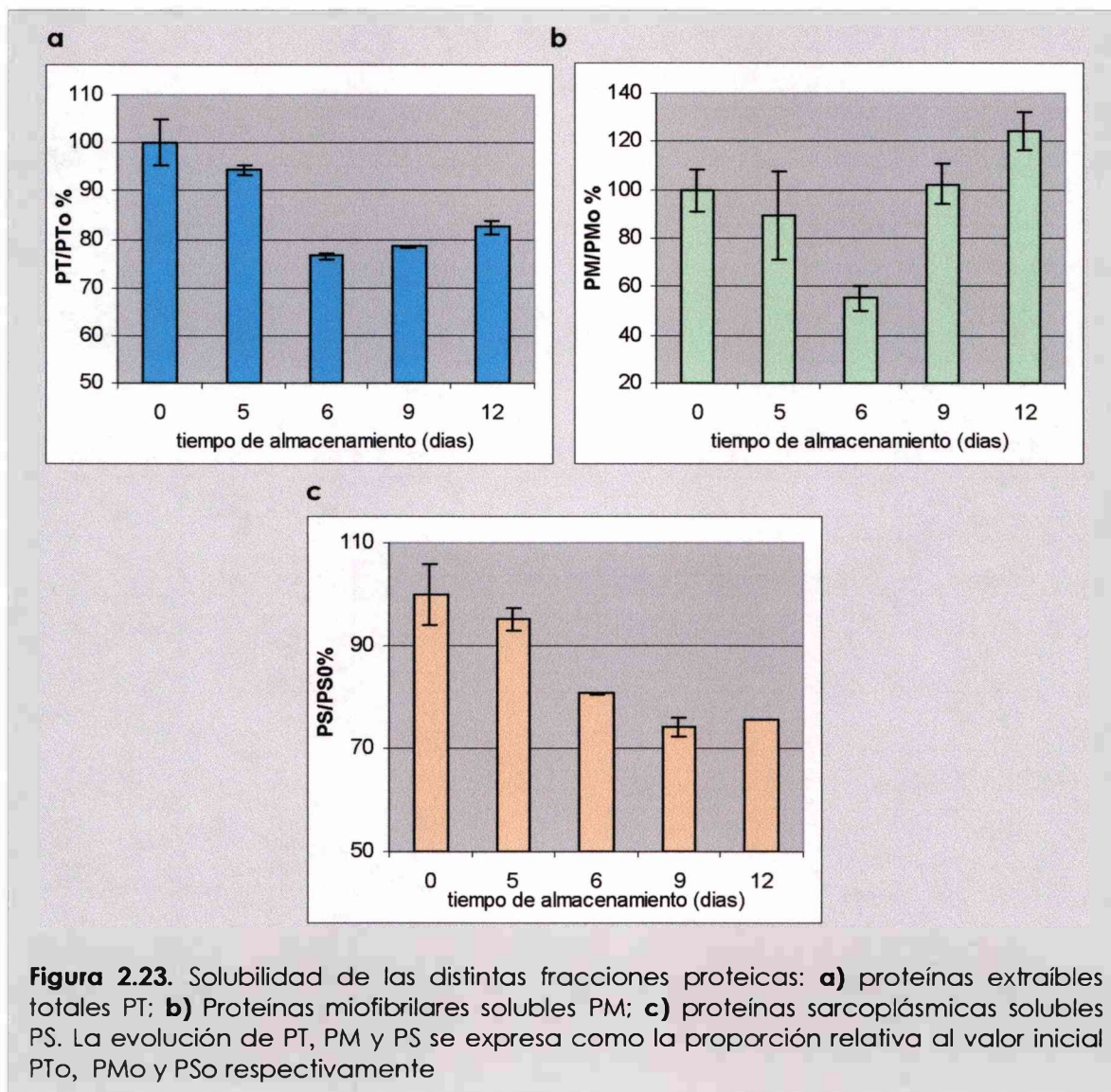
Los valores mostrados en la última columna están referidos al contenido de proteína total del músculo determinado por Kjeldhal. La proporción de proteínas sarcoplásmicas solubles PS fue estimada por diferencia entre las proteínas extraíbles totales PT y las proteínas miofibrilares solubles PM.

Como puede observarse la proporción de proteínas solubles obtenida es baja (alrededor del 40 % de la proteína total). La relación de proteínas miofibrilares solubles a proteínas totales solubles (PM/PT %) fue de  $16,9 \pm 3,3$  %. Este valor es también muy bajo considerando que las proteínas miofibrilares constituyen el 65 – 75 % de las proteínas del músculo. Estos resultados sugieren que una proporción importante de las proteínas miofibrilares no fueron extraídas en las condiciones de ensayo empleadas quedando, por tanto, en el residuo insoluble. Leinot y Cheftel (1990) informaron resultados similares en una especie grasa tal como la sardina (*Sardina pilchardus*). Estos autores observaron que, inmediatamente después de la muerte, la proporción de proteínas sarcoplásmicas representaba el 30 o el 40 % de las proteínas totales, mientras que la proporción de proteínas miofibrilares solubles se encontraba entre el 40 - 50 % según la época del año. Este último porcentaje disminuía luego de 20 h de almacenamiento en hielo, aumentando, paralelamente, la proporción del residuo insoluble.

#### **Modificaciones de la solubilidad proteica durante el almacenamiento refrigerado**

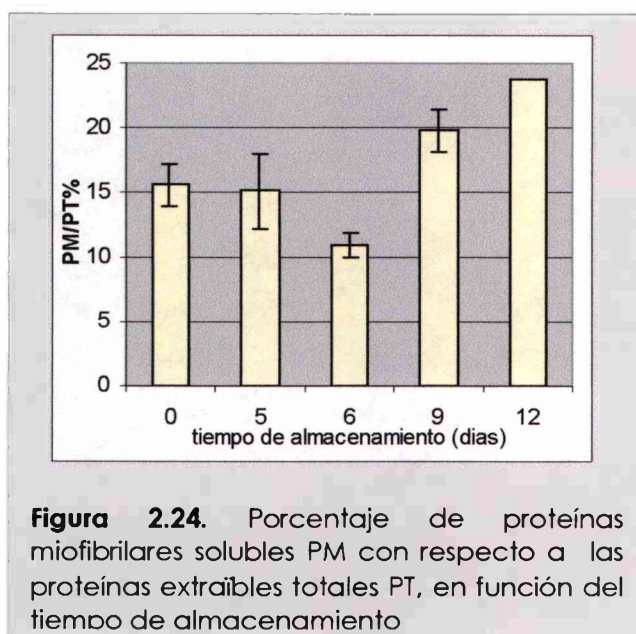
Se determinó la concentración proteica de las fracciones de proteínas extractables totales y proteínas miofibrilares solubles provenientes de músculo almacenado a 1 °C durante distintos períodos de tiempo. En la **Figura 2.23**, se muestran los resultados hallados en distintas experiencias realizadas (pescados capturados en septiembre y noviembre). La concentración de proteínas en la fracción extractable total disminuyó en la primera etapa del almacenamiento refrigerado (primeros 6 días), aumentando levemente luego, pero sin alcanzar los valores iniciales (**Figura 2.23.a**). En cuanto a las proteínas miofibrilares solubles (**Figura 2.23.b**), éstas mostraron una disminución marcada durante los primeros 6 días de almacenamiento y un aumento posterior, alcanzando valores superiores a los iniciales. Las proteínas sarcoplásmicas solubles (**Figura 2.23.c**), calculadas por

diferencia, muestran una disminución en función del tiempo de almacenamiento refrigerado hasta los 9 días, manteniéndose luego constantes.



La proporción entre proteínas miofibrilares y totales solubles mostró un descenso a los 6 días de almacenamiento aumentando posteriormente (**Figura 2.24.**).

Los resultados obtenidos indican que, tanto las proteínas sarcoplásmicas como las miofibrilares, disminuyeron su solubilidad en la primera etapa del almacenamiento, lo cual podría deberse a la agregación de dichas proteínas. Esta modificación fue más relevante para las proteínas miofibrilares ya que mostraron un descenso de la solubilidad de más de un 40 % con respecto al valor



inicial (día 6), mientras que para las proteínas sarcoplásmicas la disminución detectada fue de aproximadamente 20 %. De acuerdo con los estudios de calorimetría diferencial de barrido mostrados previamente, a los 7 días de almacenamiento ya había ocurrido un importante cambio en la conformación de la miosina como lo demuestra su menor entalpía de desnaturalización. La

desnaturalización y agregación proteica podrían estar influenciadas por diversos factores fisicoquímicos, entre los cuales puede mencionarse el pH del músculo.

Otro factor a tener en cuenta es la oxidación lipídica, ya que sus productos podrían causar dichas modificaciones al interactuar con las proteínas. Tratando de vincular la evolución del número de TBA con las modificaciones proteicas podemos decir que, dichas modificaciones se registran en la etapa del almacenamiento donde se ha alcanzado un primer máximo en el nivel de los productos de oxidación (principalmente malonaldehído), lo cual favorecería la interacción entre dichos productos y las proteínas.

Por otra parte, se esperaría que los productos resultantes de dicha interacción provocaran un aumento de la fluorescencia característica, principalmente en la fase acuosa. Sin embargo, dicho comportamiento no fue observado al realizar la determinación de los compuestos fluorescentes.

Por lo tanto, en función de los resultados expuestos hasta el momento podemos decir que, si bien hay una evolución simultánea del número de TBA y el descenso de la solubilidad proteica, sugiriendo una vinculación entre la oxidación lipídica y las modificaciones de las proteínas, la misma no pudo corroborarse a través de la determinación de compuestos de interacción fluorescentes.

Experiencias realizadas en salmón atlántico (*Salmo salar*) almacenado a 0 °C (Hultmann y Rustad, 2004) mostraron una disminución de las proteínas solubles



en agua (sarcooplásmicas) a lo largo de 9 días de almacenamiento. Sin embargo, la solubilidad de las proteínas miofibrilares se mantuvo constante durante ese tiempo, aunque cuando se analizó músculo que había sido previamente irradiado, dicha solubilidad disminuyó, sugiriendo un efecto de los productos de oxidación lipídica. En merluza (*Merluccius hubbsi*) no se observaron cambios en la extractabilidad de las proteínas miofibrilares y de la actomiosina a lo largo de 11 días de almacenamiento a 0 °C (Crupkin y col., 1982). Por otra parte, como ya fue mencionado, sardinas almacenadas a 0°C mostraron una disminución en sus proteínas miofibrilares solubles a las 20 h de almacenamiento, aumentando a sus niveles iniciales a los 9 días.

En salmón de mar fue notorio el aumento de la concentración de la fracción de proteínas miofibrilares solubles a los 9 días de almacenamiento alcanzando los niveles iniciales y superando dicho nivel posteriormente. Estas observaciones sugieren la ocurrencia de un proceso de degradación proteica en la etapa final del almacenamiento.

El músculo de pescado contiene proteasas endógenas capaces de hidrolizar diferentes proteínas. Las colagenasas pueden degradar el tejido conectivo produciendo ruptura de los miotomas y conducir a cambios indeseables de la textura (Bremner y Hallet, 1985).

Por otra parte, las catepsinas lisosomales (ver **Introducción General** - sección 1.1.3.), responsables de la degradación proteica en áreas de daño, son inactivas en el tejido vivo pero son liberadas a los fluidos celulares por abuso físico o congelación y descongelación del músculo (Huss, 1998). La catepsina L ha sido implicada en el ablandamiento del músculo de salmón durante la migración por desove (Yamashita y Konagaya, 1991). Dicha enzima es activa a pH neutro y digiere tanto proteínas miofibrilares (actomiosina) como tejido conectivo. En salmón (*Salmo salar*) almacenado en refrigeración se demostró que la mayor parte de la actividad proteolítica está dada por endopeptidasas que degradan enlaces peptídicos distantes de los extremos de la cadena polipeptídica, por lo cual no se observaron cambios importantes en el contenido de aminoácidos libres (Lund y Nielsen, 2001).

Por otra parte, las calpaínas de pescado degradan la cadena pesada de miosina para formar un fragmento con un peso molecular aproximado de 150 kD (Muramoto y col., 1989). Estas proteínas son mucho más activas a bajas temperaturas que las calpaínas de mamíferos, actuando con mayor intensidad sobre las miosinas menos estables al calor; así, las especies de peces adaptadas a bajas temperaturas ambientales son más susceptibles a la autólisis por calpaínas. Aunque estas proteasas han sido identificadas en diversas especies pesqueras, no se ha demostrado una relación entre su actividad y los cambios texturales.

Los resultados registrados en la solubilidad de las proteínas musculares de salmón de mar, sugieren la posibilidad de actividad proteolítica de las proteínas miofibrilares en la última etapa del almacenamiento. Dicha actividad podría estar favorecida por el procesamiento previo del músculo, ya que éste fue picado finamente antes de ser envasado y almacenado, lo cual induciría la liberación de las enzimas y el contacto con las proteínas miofibrilares.

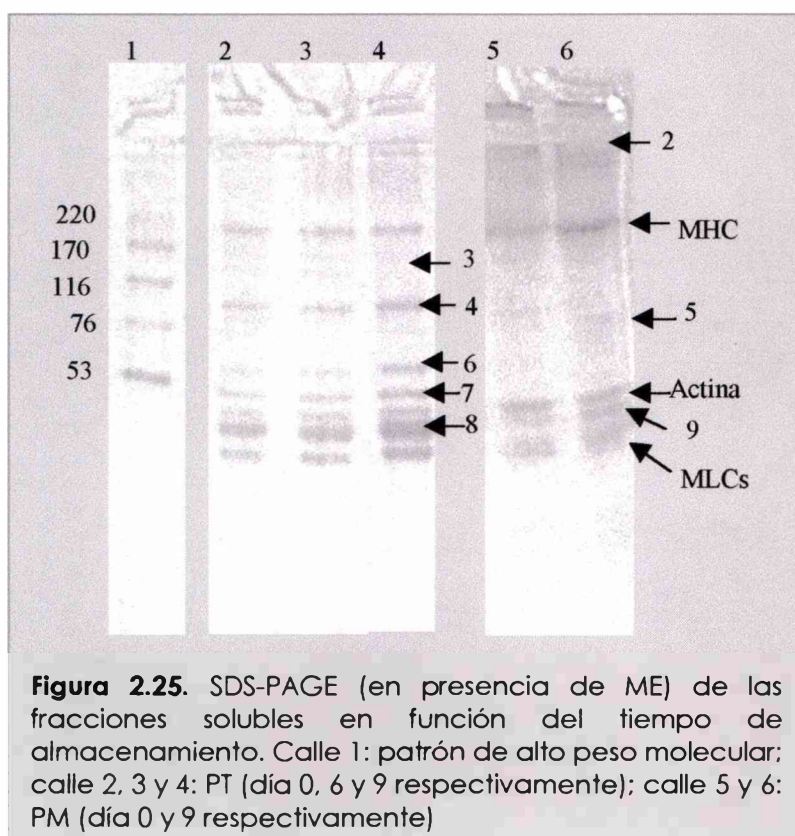
Estos datos de solubilidad correlacionan muy bien con la información obtenida por calorimetría diferencial de barrido. En estos estudios, se demostró un cambio en los perfiles térmicos en función del tiempo de almacenamiento, apareciendo termogramas similares a los correspondientes a las proteínas miofibrilares aisladas y entalpías de desnaturalización menores. Este hecho también podría indicar la ocurrencia de degradación proteica, originando una modificación de la estructura proteica muscular.

### **2.3.5.3. Electroforesis**

En función de las modificaciones observadas en la solubilidad y estructura de las proteínas musculares, se analizaron las fracciones de proteínas totales extractables y miofibrilares solubles mediante SDS-PAGE. En la **Figura 2.25**, se presentan los perfiles electroforéticos de las muestras tratadas con SDS, urea y 2-mercaptoetanol (ME) (30 µg de proteínas / calle).

El perfil correspondiente a la fracción de proteínas totales solubles, PT, del día 6 no presentó diferencias con respecto al del día 0 (calles 2 y 3 respectivamente). La permanencia de las proteínas miofibrilares en la fracción

soluble en idéntica proporción a la detectada a  $t = 0$  sugiere que la insolubilización registrada a los 6 días de almacenamiento involucraría a todas las especies proteicas por igual. La agregación proteica provocaría la formación de estructuras de alto peso molecular insolubles, las cuales no serían extraídas con las soluciones salinas, aunque también podría plantearse la posibilidad de la formación de agregados que permanecerían solubles, las cuales deberían involucrar enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas) y/o puentes disulfuro, según los resultados obtenidos en las electroforesis.



**Figura 2.25.** SDS-PAGE (en presencia de ME) de las fracciones solubles en función del tiempo de almacenamiento. Calle 1: patrón de alto peso molecular; calle 2, 3 y 4: PT (día 0, 6 y 9 respectivamente); calle 5 y 6: PM (día 0 y 9 respectivamente)

A los 9 días de almacenamiento, el perfil electroforético de la fracción PT presentó algunas pequeñas diferencias, tales como una leve disminución de la intensidad de la banda 3 (aprox. 140 kD) y aumento de la correspondiente a la banda 4 (aprox. 90 kD) (calle 4). Comparando este perfil con los correspondientes a la fracción de proteínas

miofibrilares PM (calles 5 y 6), podemos decir que tanto la banda 3 como la 4 corresponden a la fracción de proteínas sarcoplásmicas. El perfil electroforético de la fracción PT correspondiente a los 9 días de almacenamiento presentó también un aumento de la intensidad de las bandas de muy bajo peso molecular (más pequeñas que las cadenas livianas de miosina), también correspondientes a la fracción de proteínas sarcoplásmicas.

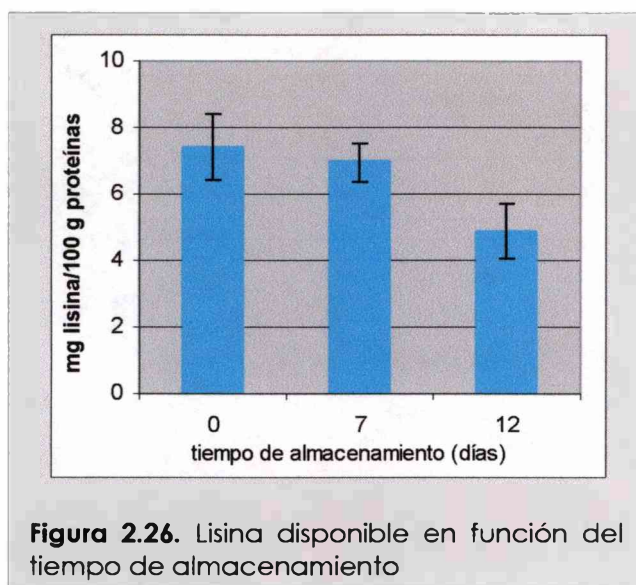
La fracción de proteínas miofibrilares solubles PM presentó a los 9 días de almacenamiento un perfil en el cuál se evidencia una disminución en la intensidad de la banda 2 (entre el gel apilador y el separador), aumentando la intensidad de la MHC, de las bandas menores comprendidas entre los 80 y los 200 kD y de las bandas de menor peso molecular entre las cuales se encuentran la actina, la banda 9 y las MLCs (calle 6). Asimismo, se observó una disminución en la intensidad de la banda 5 (aprox. 81 kD) aumentando la intensidad de una banda que aparece inmediatamente debajo de ésta.

Teniendo en cuenta el aumento de solubilidad de las PM registrado a los 9 días de almacenamiento y los resultados de las electroforesis, puede sugerirse una degradación de los polipéptidos de alta masa molecular en sus proteínas constituyentes a este tiempo de almacenamiento. Los perfiles electroforéticos no mostraron la aparición de nuevos polipéptidos indicativos de un proceso de proteólisis enzimática en función del tiempo de almacenamiento.

#### **2.3.5.4. Lisina disponible**

Dado que la interacción entre productos secundarios de la oxidación lipídica y proteínas ocurre a través de grupos amino libres, la determinación de lisina disponible puede brindar información sobre dicha interacción. Además, este es un parámetro importante desde el punto de vista nutricional, ya que el contenido de lisina del pescado es una de las características que hace beneficioso su consumo. Como puede observarse en la **Figura 2.26.**, el contenido de lisina disponible de las proteínas musculares disminuyó en función del tiempo de almacenamiento refrigerado. Dicho cambio no fue significativo a los 7 días de almacenamiento pero si a los 12 días ( $p < 0,05$ ).

Entre las posibles causas de disminución del contenido de lisina disponible, puede mencionarse la reacción de compuestos carbonílicos derivados de la oxidación lipídica con grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina, como se demostró para el malonaldehído en el capítulo anterior.



La constancia en el contenido de lisina disponible a los 7 días de almacenamiento sugiere la ausencia de reacción -al menos detectable por el presente ensayo- entre los grupos  $\epsilon$ -amino de este aminoácido y otros compuestos tal como podrían ser los productos carbonílicos de la oxidación lipídica. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en la determinación de compuestos

fluorescentes en fase acuosa, los cuales no presentaron modificaciones hasta tiempos de almacenamientos prolongados.

### 2.3.6. Modificaciones en el color del músculo

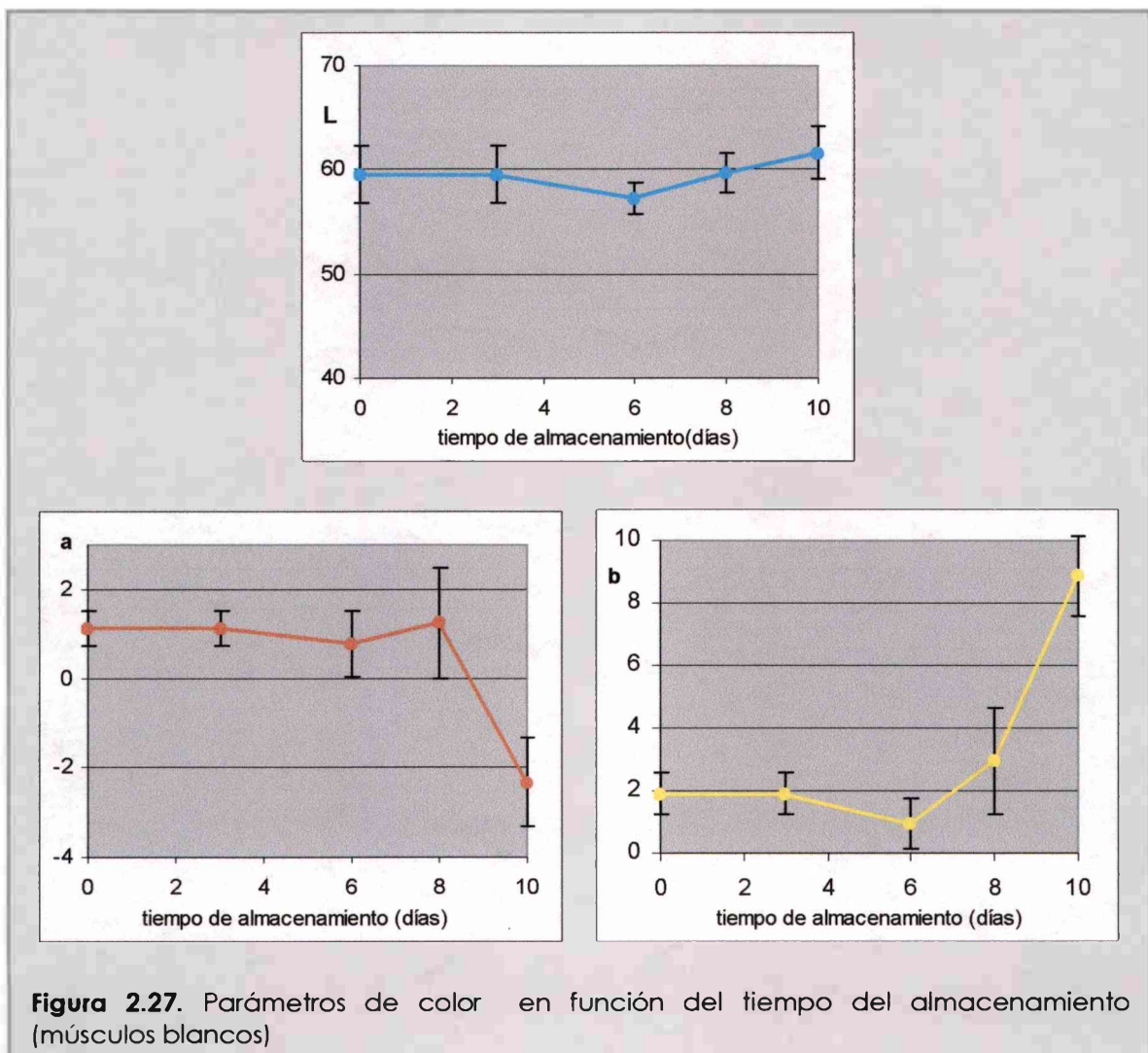
La pérdida de color en los productos cárneos, caracterizada por una transformación del color rosado a un color amarillo-amarronado, se traduce en una disminución de la aceptabilidad por parte del consumidor. Por otra parte, existe una relación entre el color y otros factores de calidad, o entre aquél y la composición química o el grado de alteración, por lo cual es posible utilizarlo como índice de transformaciones naturales de los alimentos frescos o de cambios ocurridos en un proceso industrial (Calvo y Durán, 1997).

Uno de los instrumentos más empleados en la medida de color de los alimentos es el colorímetro triestímulo. El principio de funcionamiento de estos colorímetros se basa en lo siguiente: un haz de luz blanca procedente de una fuente luminosa incide en la muestra con un ángulo de  $45^\circ$  y es reflejado de forma perpendicular a la superficie de la muestra (luz difusa). Este haz pasa a través de tres filtros y es medido por una fotocélula.

Las lecturas de color pueden realizarse en diferentes escalas; en este caso las medidas fueron realizadas en el sistema CIELAB. Dicho sistema utiliza tres

coordenadas:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ .  $L^*$  corresponde a la luminosidad y  $a^*$  y  $b^*$  a la cromaticidad. El parámetro  $a^*$  define el componente rojo-verde, rojo para los valores positivos y verde para los negativos; mientras que  $b^*$  define el componente amarillo-azul, amarillo para los positivos y azul para los negativos.

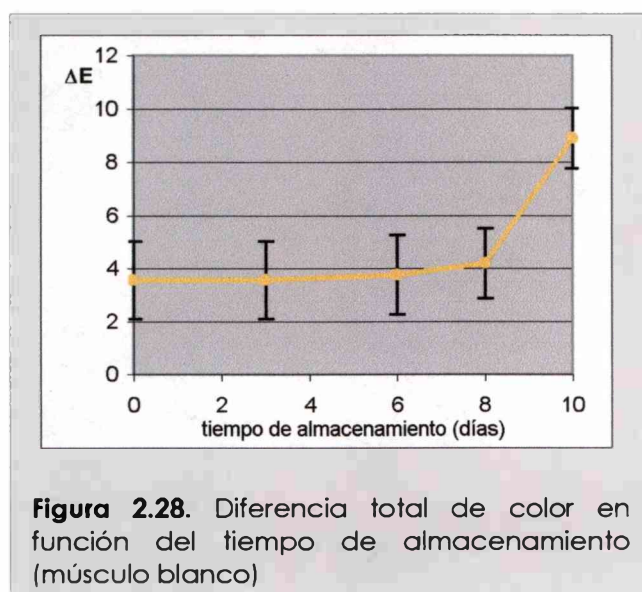
Como puede observarse en la **Figura 2.27.**, el parámetro  $L^*$  no mostró cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en función del tiempo de almacenamiento refrigerado. El parámetro  $a^*$  se mantuvo constante durante los primeros 8 días, disminuyendo significativamente ( $p < 0,05$ ) con posterioridad, evidenciando una pérdida del color rojizo del músculo durante el almacenamiento. En cuanto al parámetro  $b^*$ , tampoco mostró cambios significativos durante los primeros 8 días, aumentando de manera significativa ( $p < 0,05$ ) luego de ese tiempo, lo cual correlaciona con la aparición de un color amarillento en el músculo.



A partir de los valores de  $L$ ,  $a$  y  $b$  se calcularon los valores de la diferencia total de color  $\Delta E$  según la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \left[ (\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 \right]^{1/2} \quad (\text{Ec. 2.4.})$$

donde  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  fueron calculados como la diferencia entre cada valor individual de las muestras y el valor promedio obtenido para el correspondiente parámetro al inicio del almacenamiento. Los valores de  $\Delta E$  mostrados (Figura 2.28.) corresponden al promedio de todos los  $\Delta E$  individuales para cada tiempo, reflejando las variaciones con respecto al valor promedio al inicio del almacenamiento tomado como referencia.



**Figura 2.28.** Diferencia total de color en función del tiempo de almacenamiento (músculo blanco)

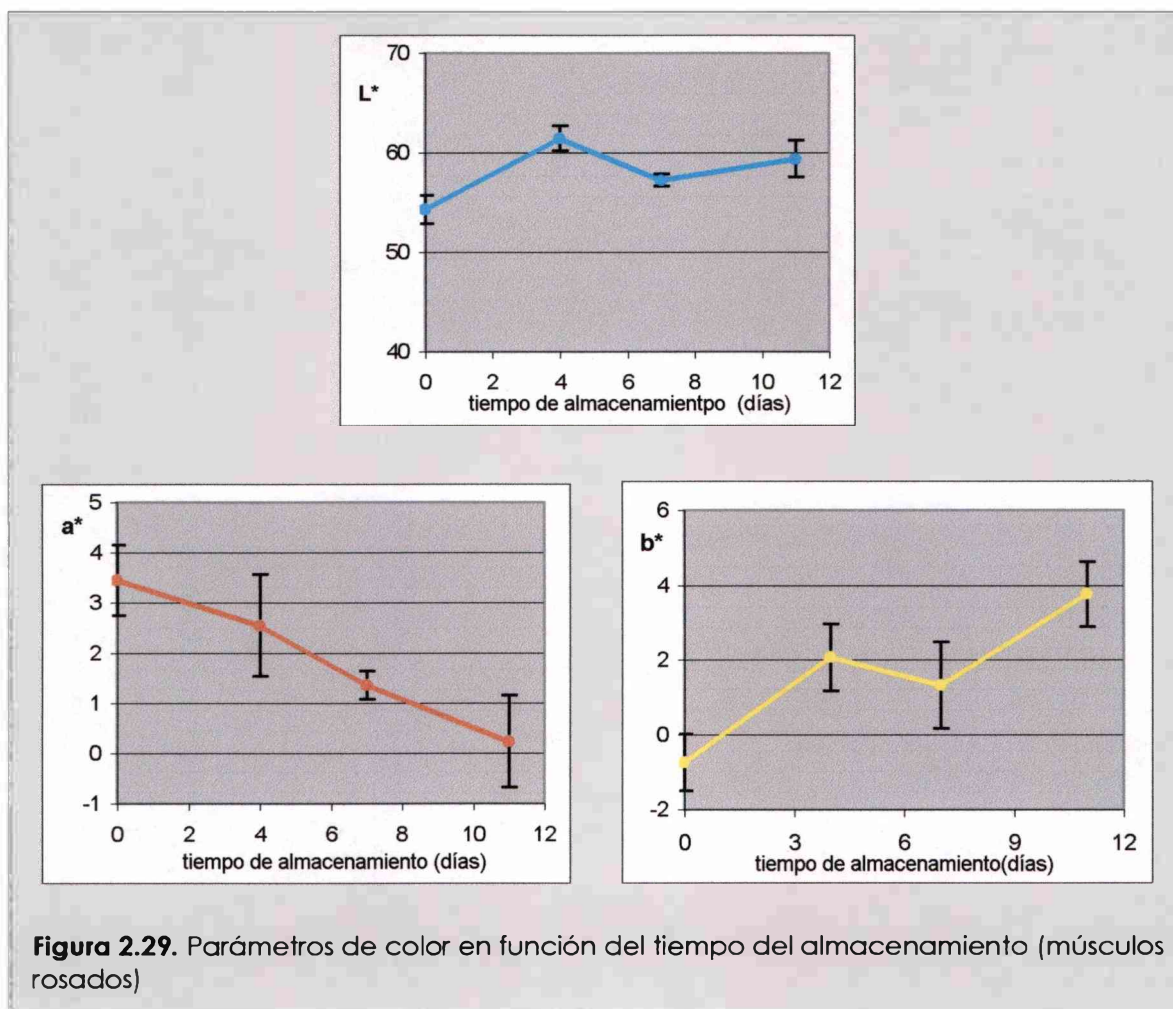
En correlación con los cambios observados en  $a^*$  y  $b^*$ ,  $\Delta E$  permaneció constante durante los primeros 8 días de almacenamiento refrigerado, presentando un aumento significativo luego ( $p < 0,05$ ).

Es importante señalar que los valores de los parámetros de color al inicio del almacenamiento variaron entre las distintas experiencias realizadas. Los resultados presentados fueron registrados en pescados jóvenes (2 – 4 kg) capturados en distintas épocas del año, con carne "blanca" a simple vista.

El color del músculo de pescado puede ser afectado por diversos factores entre los cuales se encuentran la época de captura, la dieta, el deterioro microbiano, el contenido de humedad (Wetterskog y Undeland, 2004). En el caso del salmón de mar, pescados de mayor tamaño presentaron mayores valores del parámetro  $a^*$  y menores de  $b^*$ , concordantemente con una carne mucho más "rosada" a simple vista.

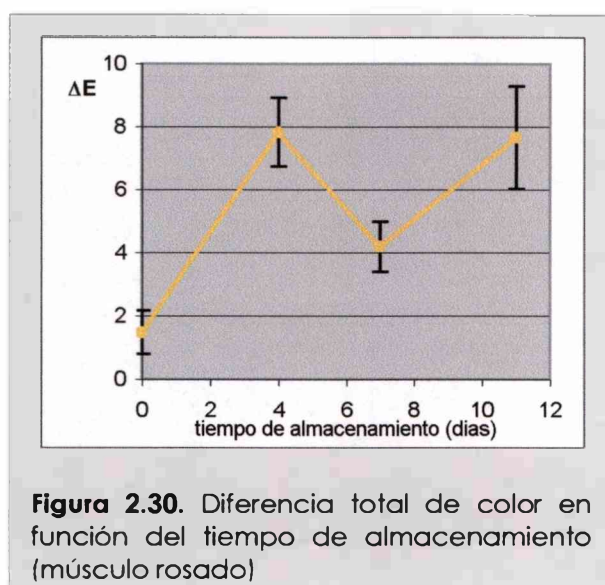
La variación de los parámetros de color en los músculos más "rosados" se muestra en la Figura 2.29. El valor de  $L^*$  inicial fue algo menor al presentado

anteriormente y aumentó a los 4 días de almacenamiento, evidenciando un oscurecimiento del músculo. El parámetro  $a^*$  disminuyó más tempranamente que en el caso de los músculos más blancos, detectándose a los 7 días de almacenamiento diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0,05$ ). El parámetro  $b^*$  mostró un aumento significativo a los 4 días, y otro incremento posterior a los 12 días de almacenamiento refrigerado.



La diferencia total de color  $\Delta E$  aumentó significativamente a los 4 días de almacenamiento (**Figura 2.30.**) en correlación con el aumento de  $b^*$  y principalmente con el aumento de  $L^*$  registrado a ese tiempo. La evolución del  $\Delta E$  fue irregular ya que disminuyó entre el cuarto y séptimo día debido probablemente a una disminución de  $L^*$ . Posteriormente, este parámetro aumentó nuevamente.



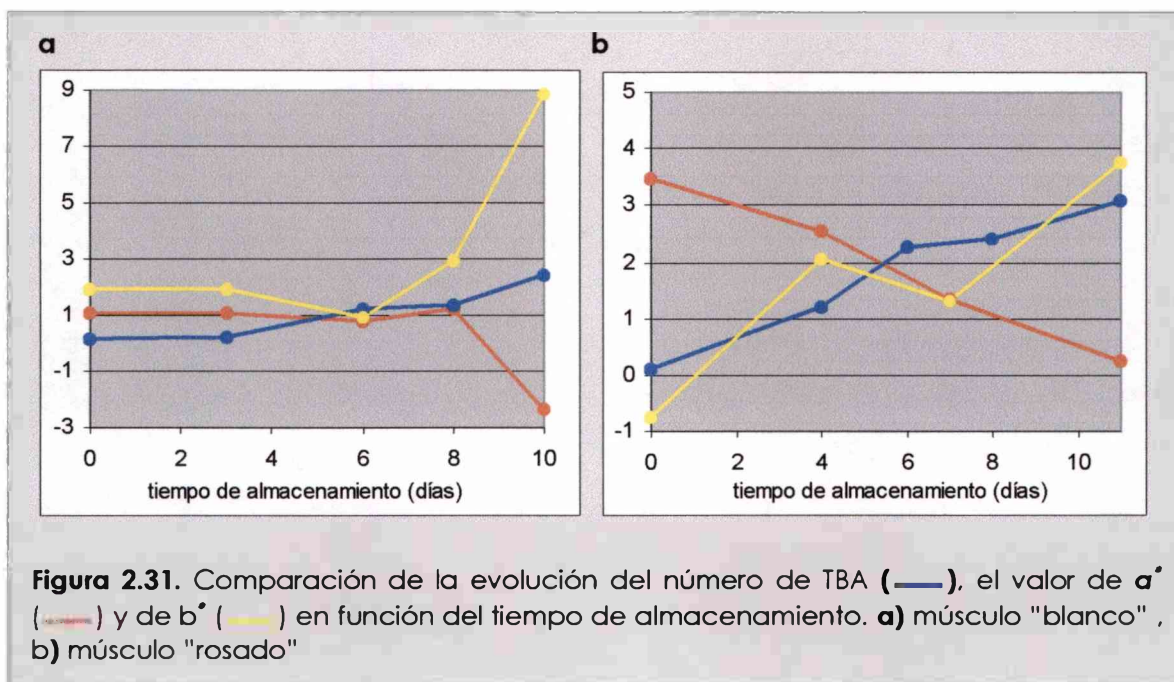


La disminución del valor de  $a^*$  en diversas especies pesqueras ha sido asociada a la conversión de la oxi-mioglobina roja a la forma de meta-mioglobina parda (Wetterskog y Undeland, 2004). Además, las formas meta de las proteínas conteniendo grupos hemo han sido relacionadas con el comienzo de la oxidación lipídica en músculo, particularmente en pescados de aguas frías, encontrándose un paralelismo entre

la pérdida de color rojo y el desarrollo de hidroperóxidos y de sustancias reactivas al TBA (Richards y col, 2002; Richards y Hultin, 2003). Por otra parte, el incremento en el valor de  $b^*$  ha sido relacionado con la polimerización de bases de Schiff para dar pigmentos amarillos, así como también con cambios en la molécula de hemoglobina tales como formación de meta-hemoglobina y otras reacciones (Wetterkog y Undeland, 2004).

En la **Figura 2.31**, se muestra la comparación entre la evolución del número de TBA y de los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  para el músculo "blanco" y el "rosado".

En el músculo "blanco" los cambios iniciales en el número de TBA no se correlacionaron con cambios en el color del músculo, mientras que el aumento de los productos de oxidación en la última etapa de almacenamiento (entre el octavo y décimo día) fueron paralelos a la disminución de  $a^*$  y el aumento de  $b^*$ . En cambio, en el músculo "rosado", el aumento del número de TBA en la primera etapa del almacenamiento fue correlativo con cambios en  $a^*$  y  $b^*$ . Posteriormente, un nuevo aumento de los productos de oxidación fue simultáneo con un marcado incremento de  $b^*$  y disminución de  $a^*$ .



### 2.3.7. Modificaciones de parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad del pescado

#### 2.3.7.1. pH

El pH inicial de músculo de salmón de mar proveniente de pescados de diferente edad y capturados en distintas épocas del año fue similar, con un valor promedio de  $6,44 \pm 0,05$ . La evolución de este parámetro en función del tiempo de almacenamiento refrigerado puede observarse en la

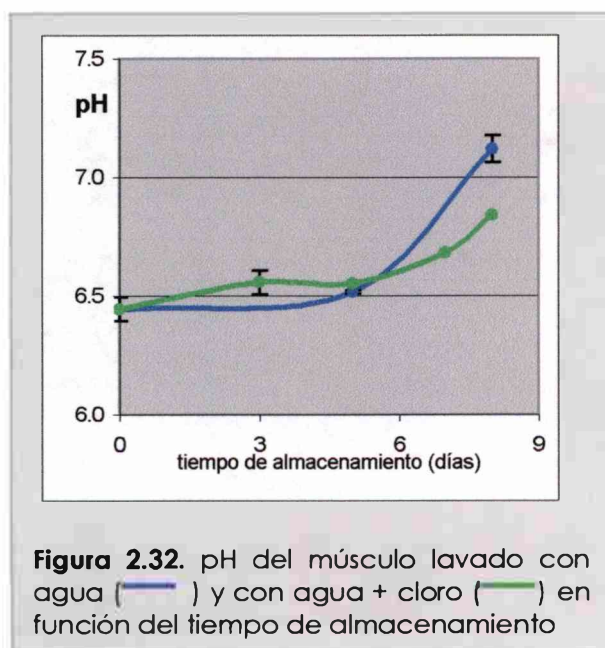


Figura 2.32., donde se muestran los resultados obtenidos para filetes lavados sin y con agregado de cloro al agua de lavado, no registrándose diferencias significativas en el comportamiento de ambos. El pH aumentó muy levemente hasta el séptimo día de almacenamiento

(aproximadamente 0,2 unidades). Al octavo día se registró un aumento más importante, alcanzando el músculo lavado con agua de red valores superiores al lavado con mayor concentración de cloro.

Los cambios registrados en el pH pueden ayudar a explicar las modificaciones registradas en los perfiles térmicos de las proteínas. Howell y col., (1991) han informado que un incremento del pH entre 6 y 8, disminuyó la estabilidad térmica de la miosina en miofibrillas de pescados de aguas cálidas, apareciendo un nuevo pico a menor temperatura. En trucha, una especie que se adapta a un rango amplio de temperaturas, se registró un comportamiento similar, mientras que la miosina de bacalao (agua fría) no fue susceptible a cambios de pH por encima de 7. En todos los casos, ocurrió una desestabilización de la actina con el aumento del pH. Además, las entalpías de desnaturalización disminuyeron con dicho incremento. Modificaciones similares se han encontrado en músculo de vieiras (*Chlamys tehuelchus*) cuando el pH aumentó por encima de 7 (Paredi y col., 1998).

En el salmón de mar se observa un comportamiento similar al recién descrito para pescados de aguas cálidas y trucha, presentando una desestabilización de la miosina la cual se desdobló en dos transiciones diferentes, desestabilización de la actina y disminución de las entalpías de desnaturalización. Estos cambios correlacionan con la evolución del pH, ya que comienzan a registrarse a partir del séptimo día y se hacen muy evidentes al noveno día cuando el pH ya sobrepasó el valor de 7.

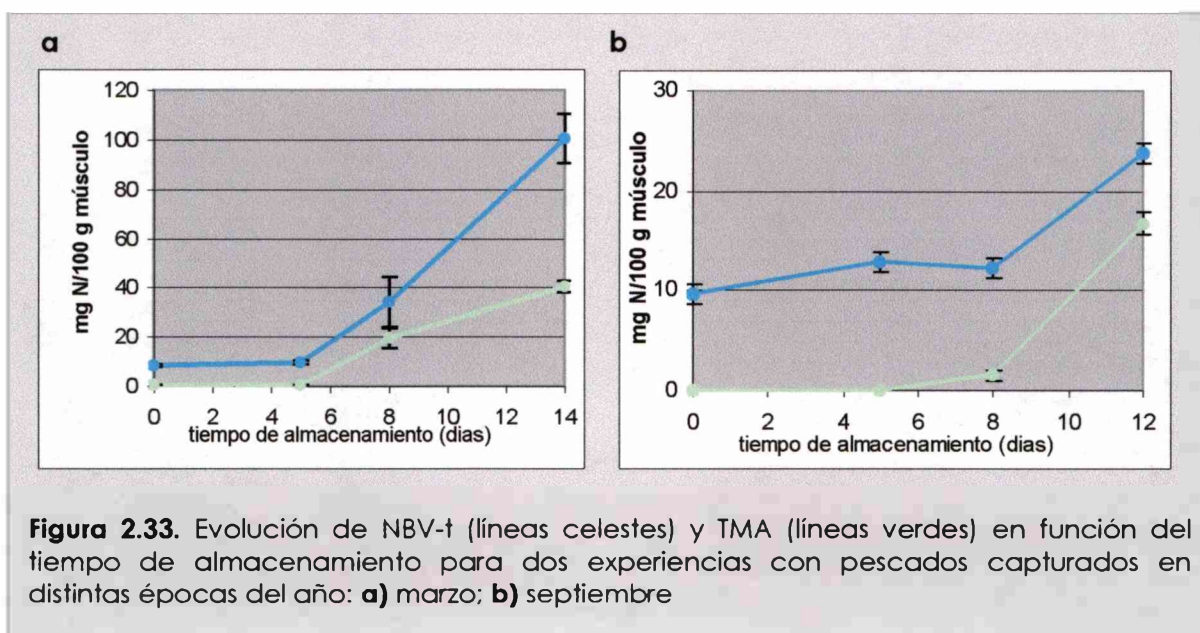
#### **2.3.7.2. Nitrógeno básico volátil total (NBV-t) y Trimetilamina (TMA)**

Los niveles de TMA y de NBV-t fueron determinados en el músculo picado de salmón de mar almacenado en refrigeración. Los niveles iniciales de NBV-t encontrados en diferentes pescados capturados en distintas épocas del año fueron de  $9,2 \pm 1,2$  mg N/100 g de músculo. En un estudio realizado en salmón de mar almacenado entero y sin eviscerar a 0 °C (Hozbor, 1999), se determinaron valores de NBV-t relativamente altos (cerca de 30 mg N %) desde el inicio de la experiencia (correspondiente a 4 días desde la captura). Diversas

determinaciones realizadas en distintas especies de pescados marinos frescos muestran un nivel inicial de NBV-t entre 10 y 15 mg N % (Contreras Guzmán, 2002).

Por otra parte, el nivel de TMA inicial fue menor a 1 mg N/100 g músculo. Este valor concuerda muy bien con el anteriormente hallado en salmón de mar (Hozbor, 1999) y en otras especies marinas (Contreras Guzmán, 2002).

Durante el almacenamiento refrigerado del músculo de salmón de mar, tanto el NBV-t como la TMA se mantuvieron constantes durante los primeros días, aunque se encontraron diferencias entre experiencias realizadas con pescados capturados en el mes de marzo (**Figura 2.33.a**) y en el mes de septiembre (**Figura 2.33.b**) siendo los segundos de mayor tamaño. En el primer caso, se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) del NVB y de la TMA a los 8 días de almacenamiento, alcanzando ambos parámetros los valores límites aceptados en ese tiempo. En el segundo caso, no se registraron modificaciones significativas a los 8 días, mientras que a los 12 días de almacenamiento ambos parámetros aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ), alcanzando solo la TMA los valores límites. El músculo de salmón de mar almacenado entero superó los 10 mg N % para TMA entre los 12 ó 13 días post-captura (Hozbor, 1999).

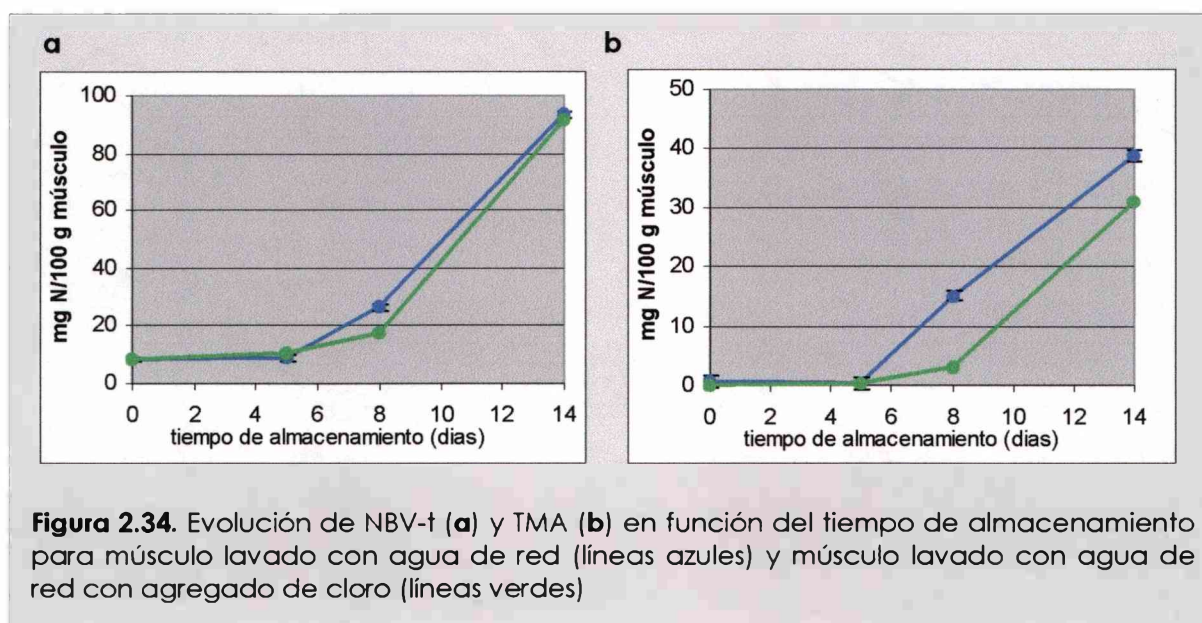


A pesar de las diferencias cuantitativas, ambas experiencias muestran comportamientos similares, con una primera etapa sin modificaciones seguida de

un aumento de TMA que ocasiona un aumento del NBV-t. A tiempos de almacenamiento muy avanzados (día 14 - **Figura 2.33.a**) se observa que el NBV aumenta en mucha mayor proporción que la TMA, sugiriendo que es importante el aporte de otras aminas volátiles.

Estos resultados están de acuerdo con el comportamiento general observado en pescados de carne clara y en calamares, donde la detección de la TMA presenta un período "lag" de entre 4 y 7 días de almacenamiento en hielo, el cual podría relacionarse con el momento en el que se termina el oxígeno en los tejidos y los microorganismos se ven obligados a utilizar el óxido de trimetilamina. A partir de ese momento la producción de TMA se acelera, hasta que el sustrato se agota (Contreras, 2002).

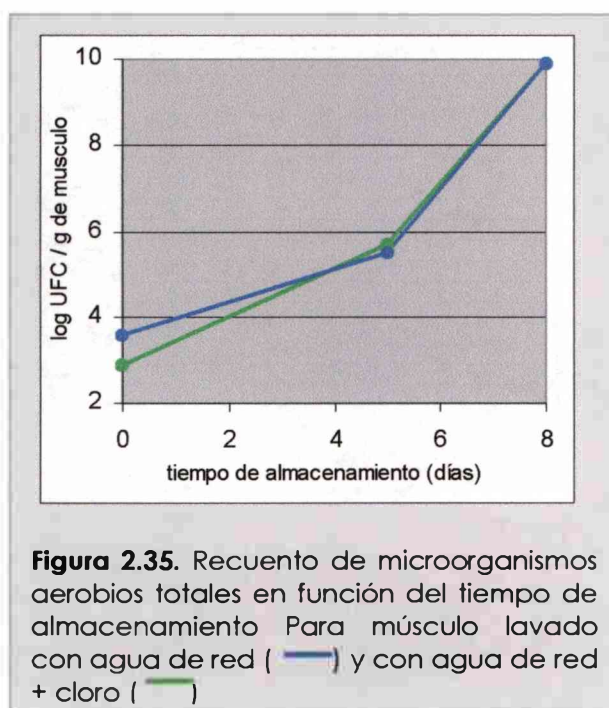
El músculo previamente lavado con agua con agregado de 1 ppm de cloro presentó algunas diferencias con respecto al lavado sin agregado de cloro (**Figura 2.34.**). A los 8 días de almacenamiento se observó un aumento significativamente mayor de la TMA en el músculo lavado con agua de red.



### 2.3.8. Crecimiento microbiano durante el almacenamiento refrigerado

Se llevaron a cabo recuentos de microorganismos aerobios totales a fin de estimar el período de vida útil del músculo de salmón de mar en las presentes condiciones de procesamiento y almacenamiento.

Se analizó la evolución de los recuentos microbianos totales en las dos condiciones de lavado aplicadas. Al lavar con agua de red, los valores iniciales de los recuentos se encontraron entre  $3$  y  $7 \times 10^3$  UFC/g mientras que al lavar los filetes con mayor concentración de cloro se obtuvieron valores de  $8 - 8,5 \times 10^2$



UFC/g, indicando un descenso en la carga microbiana inicial. En trabajos previos (Hozbor, 1999), se informaron recuentos iniciales de  $1,5 - 2 \times 10^3$  UFC/g en filetes de salmón de mar almacenado entero en hielo, mientras que recuentos de la flora superficial mostraron valores de  $6 \times 10^4$  UFC/g (Massa y col., 2002). La **Figura 2.35.** muestra la evolución en el número de microorganismos totales para las muestras lavadas sin y con agregado de cloro, en función del tiempo de almacenamiento. Puede observarse

que luego de 5 y 8 días de almacenamiento, no hubo diferencias entre el número de microorganismos aerobios totales presentes en el músculo lavado con agua de red y el presente en músculo lavado con mayor concentración de cloro. En función de estos resultados, no se puede establecer una correlación entre el mayor contenido de TMA registrado a los 8 días para el músculo lavado con mayor concentración de cloro y el recuento de microorganismos aerobios totales.

De acuerdo con varios autores (Shewan, 1977; Gram, 1992, Huss y col, 1997) el número de bacterias necesario para que ocurra un deterioro evidente para los

sentidos se encuentra entre  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g de músculo para las bacterias psicrótrofas. En las experiencias realizadas el músculo picado de salmón de mar alcanzó estos niveles entre el quinto y el séptimo día de almacenamiento. Según el trabajo de Hozbor (1999) a los 9 días de almacenamiento a 0 °C (de los cuales los 4 primeros fueron en el barco y los otros 5 en el laboratorio), los ejemplares de salmón de mar almacenados enteros en hielo alcanzaron dichos recuentos.

La microflora presente en el músculo de salmón de mar ha sido caracterizada (Hozbor, 1999), determinándose un predominio de formas bacilares Gram negativas respecto a las cocoideas y ausencia de bacterias Gram positivas. Los microorganismos predominantes fueron *Pseudomona* spp y *Shewanella putrefaciens*, los cuales se detectaron desde el inicio del almacenamiento, por lo que formarían parte de la microflora original. Otros géneros encontrados fueron: *Vibrios* spp, *Aeromonas* spp, *Moraxella* spp, *Acinetobacter* spp y *Enterobacteriaceae* lactosa positiva. Estos resultados hallados en salmón de mar concuerdan con numerosos estudios realizados en peces de aguas tropicales y de aguas templadas, donde después de 1 a 2 semanas de almacenamiento aeróbico en hielo, la flora está constituida casi exclusivamente por *Pseudomonas* spp y *Shewanella putrefaciens* (Huss, 1998).

En función de esta información, se puede establecer un tiempo de vida útil para la carne de salmón de mar, en las presentes condiciones de procesamiento y almacenamiento, de alrededor de 6 días. En este período no se registraron modificaciones significativas del nivel de TMA. En general, la correlación entre el contenido de TMA y el número de bacterias no es buena debido a que probablemente este compuesto sea producido por las bacterias específicas del deterioro, las cuales no siempre representan la mayor proporción de la flora microbiana total (Huss, 1998). De la misma manera, el NBV-t y el pH tampoco mostraron cambios importantes en dicho período.

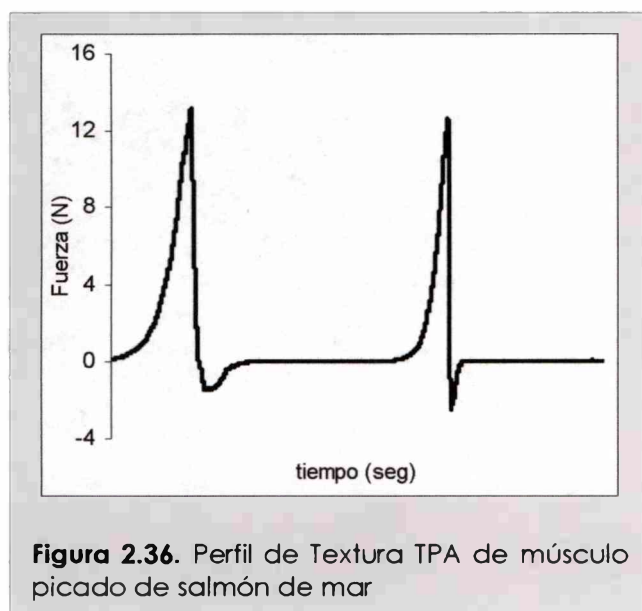
### **2.3.9. Otras determinaciones relacionadas con la funcionalidad del músculo**

El salmón de mar es una especie muy apreciada por la "calidad de su carne". Ya se han analizado diferentes procesos deteriorativos que ocurren a lo

largo del almacenamiento refrigerado, los cuales pueden tener consecuencias sobre propiedades del músculo relacionadas con su potencial funcionalidad en diversos productos alimenticios. Dos de esas propiedades importantes fueron analizadas: textura del músculo y características de gelación térmica. Se evaluaron dichas propiedades dentro del período de vida útil estimado mediante los recuentos microbiológicos.

### 2.3.9.1. Textura del músculo

Se analizaron los cambios en la textura del músculo picado formando un disco tipo "hamburguesa". En la **Figura 2.36**, se muestra a modo de ejemplo un perfil de textura TPA obtenido al inicio del almacenamiento.



A partir de los perfiles de textura se obtuvieron los parámetros de firmeza (F), elasticidad (E, correspondiente a la elasticidad retardada previamente definida en el **Capítulo 1**), cohesividad (C) y adhesividad (A), como fue explicado en la sección **2.3.8.1**. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 2.2**.

**Tabla 2.2.** Parámetros de textura de músculo de salmón de mar durante el almacenamiento refrigerado

Tiempo (días)	F (N)	E	C	A (N x seg)
0	14,07 ± 1,33	0,66 ± 0,01	0,56 ± 0,01	- 1,90 ± 0,13
6	14,18 ± 1,26	0,71 ± 0,06	0,57 ± 0,01	- 1,46 ± 0,46

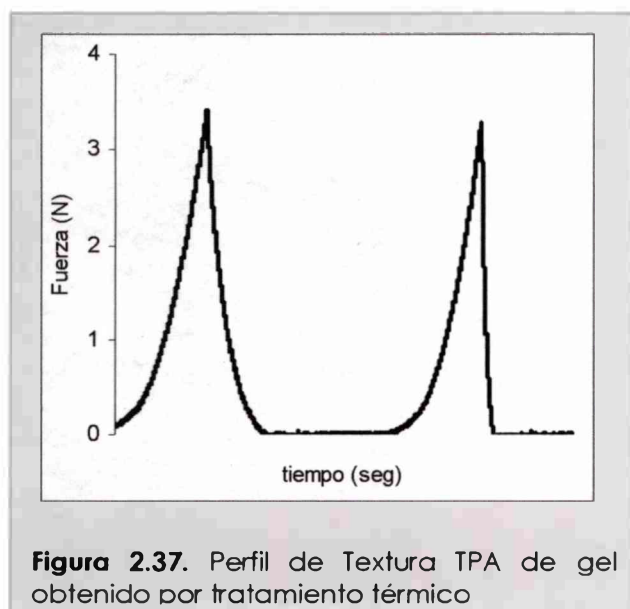


Como puede observarse, no se registraron diferencias significativas entre los parámetros de textura del músculo al inicio del almacenamiento y los correspondientes al día 6 del almacenamiento.

Los cambios texturales (ablandamiento del tejido) en el músculo de pescado almacenado en refrigeración están relacionados principalmente con la actividad de las enzimas endógenas, más que con la actividad microbiana (Hansen y col., 1996; Hultmann y Rustad, 2004). Los resultados obtenidos con respecto a la textura del músculo correlacionan con la información derivada del análisis de la solubilidad proteica y los perfiles electroforéticos, ya que a partir de ambos estudios podemos inferir que no hubo actividad proteolítica durante el período de tiempo de almacenamiento analizado.

### 2.3.9.2. Gelación térmica

Las propiedades de los geles obtenidos por tratamiento térmico del músculo lavado (ver sección 2.2.12.) fueron analizadas mediante su perfil de textura TPA. Un perfil característico de estos geles se muestra en la **Figura 2.37**,



mientras que los parámetros de textura calculados pueden observarse en la **Tabla 2.3**. Al igual que en el caso de los geles obtenidos a partir de las proteínas miofibrilares aisladas, estos perfiles de textura no presentaron el área negativa luego del primer pico, indicativa del parámetro adhesividad.

Los geles obtenidos a partir de músculo que había sido almacenado durante 7 días a  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  presentaron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en su firmeza  $F$ , mientras que la elasticidad y cohesividad no presentaron diferencias.

Las diferencias encontradas en la firmeza de los geles en función del tiempo de almacenamiento podrían deberse a cambios estructurales sufridos por

**Tabla 2.3.** *Parámetros de textura de geles de músculo de salmón de mar*

Tiempo (días)	F (N)	E	C
0	3,80 ± 0,61	0,92 ± 0,01	0,62 ± 0,01
7	7,40 ± 1,77	0,92 ± 0,06	0,63 ± 0,01

las proteínas miofibrilares, principalmente por la miosina. Como se indicó previamente, dichas proteínas presentaron un descenso en su solubilidad en soluciones salinas a los 6 días de almacenamiento refrigerado y una disminución de la entalpía de desnaturalización de la miosina obtenida por DSC a los 7 días de almacenamiento, indicando una desnaturalización parcial de esta proteína. Estos cambios en la conformación de la miosina –desnaturalización parcial y agregación- podrían estar relacionados con la mayor firmeza de los geles. Una posible hipótesis podría ser que la miosina alterada tuviera una menor capacidad para retener agua durante la gelificación y, por lo tanto, la matriz del gel quedara con una menor proporción de agua con respecto a los geles obtenidos al inicio del almacenamiento. Además, podría ocurrir un cambio en las interacciones que estabilizan la matriz del gel, tanto en el número como en el tipo, dado que se está partiendo de proteínas previamente agregadas lo cual podría inducir un mecanismo de formación de la matriz diferente que en el caso de proteínas no modificadas.

## **B. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE UN ANTIOXIDANTE NATURAL (EXTRACTO DE ROMERO) AL MUSCULO REFRIGERADO**

Como ya fue expuesto en la **Introducción General**, ha crecido enormemente la demanda de antioxidantes naturales para ser adicionados a los alimentos debido a los problemas toxicológicos asociados a los antioxidantes sintéticos antes utilizados. En virtud de ello, se hace necesario el estudio de la acción de los diversos antioxidantes naturales descubiertos en diferentes sustratos a fin de evaluar su potencial aplicabilidad. En el presente trabajo se ensayó la aplicación de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) al músculo picado de salmón de mar. El aditivo utilizado fue un extracto comercial de romero (Guardian Rosemary extract 09, Danisco), dispersable en agua. La actividad antioxidante de dicho extracto ha sido analizada en otros sustratos alimenticios, siendo recomendado para la protección de productos cárneos, salsas y vegetales. Este producto ha mostrado reducir la oxidación lipídica en pavo (300 - 600 ppm) y en pollo (500 ppm) (información dada por la firma elaboradora del producto), sin embargo no ha sido muy utilizado aún en pescados.

En función de estos datos se analizó el efecto del agregado de dos concentraciones de extracto al músculo de salmón de mar: 200 y 500 ppm, correspondientes a 10 y 25 ppm de diterpenos fenólicos respectivamente, de acuerdo a la información brindada por el fabricante (contenido de diterpenos fenólicos en el extracto: 5 %).

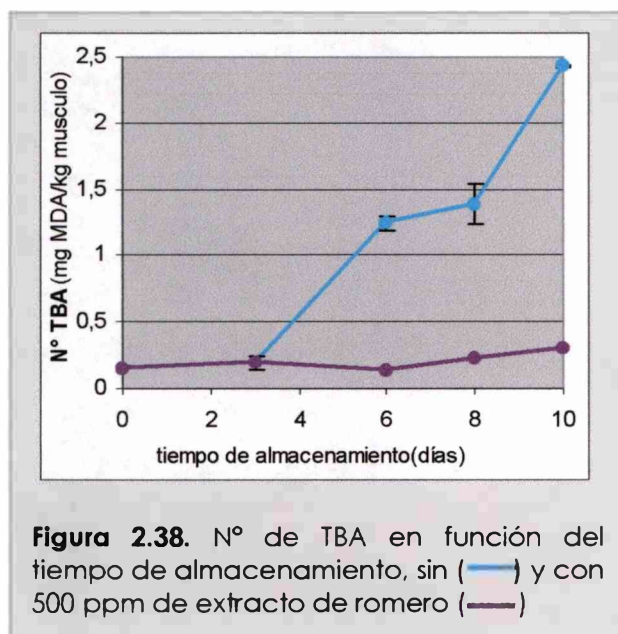
Como se indicó en **Materiales y Métodos**, una parte de la masa de músculo picado fue tratada con el antioxidante, envasada, almacenada y analizada paralelamente con el músculo sin antioxidante.

La aplicación del extracto de romero en las concentraciones ensayadas no tuvo influencia en parámetros tales como el pH, la TMA, el NBV-t y los recuentos bacterianos, tanto en sus niveles iniciales como en su evolución durante el almacenamiento refrigerado (resultados no mostrados).

## 2.3.10. Efecto del extracto de romero sobre la oxidación lipídica

### 2.3.10.1. Número de TBA

La aplicación de 200 y 500 ppm de extracto de romero produjo una significativa disminución en el desarrollo de productos secundarios de la oxidación



**Figura 2.38.** Nº de TBA en función del tiempo de almacenamiento, sin (—) y con 500 ppm de extracto de romero (—)

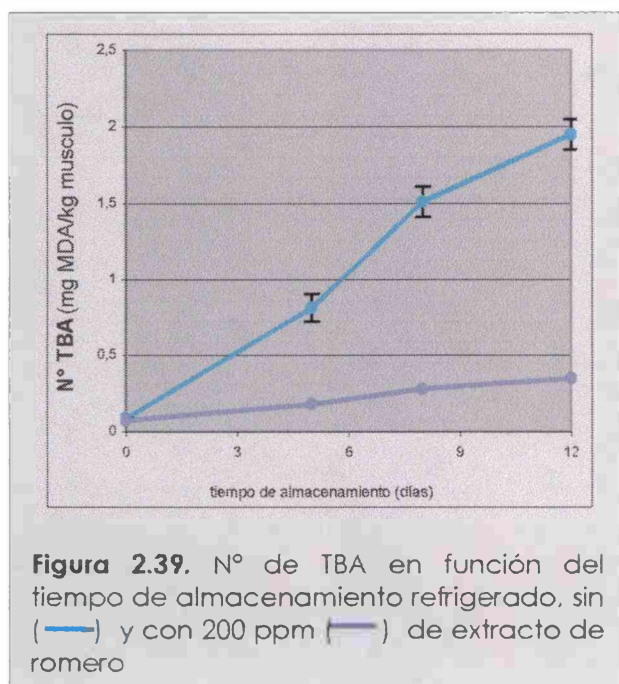
lipídica. La **Figura 2.38.** muestra la evolución de las sustancias reactivas al TBA en músculo de salmón de mar (0,49 % de lípidos) sin antioxidante y con agregado de 500 ppm de extracto de romero. En presencia del extracto el número de TBA permaneció inalterado durante los primeros 8 días. En el día 10 del almacenamiento se registró un leve aumento del número de TBA, permaneciendo en un nivel muy bajo

(el valor alcanzado en ese tiempo fue de 0,3 mg MDA/kg de músculo).

Es importante resaltar que se realizaron experiencias con músculos con diferentes contenidos lipídicos, obteniéndose en todos los casos similares resultados en presencia del antioxidante.

En la **Figura 2.39.** se muestran los resultados obtenidos con la aplicación de 200 ppm del extracto de romero a músculo de salmón de mar. En este caso, se observó un aumento progresivo pero muy pequeño del número de TBA en función del tiempo de almacenamiento, alcanzando un valor de 0,35 mg MDA/kg de músculo al cabo de 12 días de almacenamiento refrigerado.

Por otra parte, el extracto de romero inhibió la oxidación lipídica en el músculo lavado con mayor concentración de cloro. Como se mostró en la sección **2.3.2.b.**, el agregado de cloro al agua de lavado indujo un más rápido e importante aumento en el número de TBA de las muestras refrigeradas; sin embargo, en presencia del antioxidante no se observaron diferencias entre las



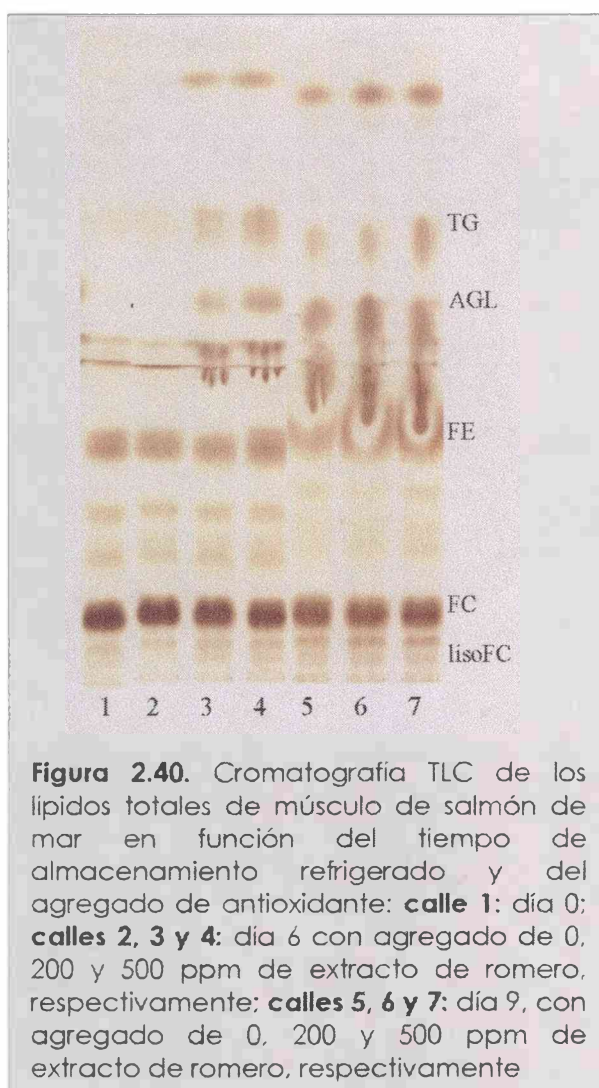
muestras con distinta concentración de cloro en el agua de lavado de los filetes (resultados no mostrados).

El extracto de romero ensayado fue capaz de inhibir el desarrollo de productos de oxidación lipídica, independientemente del nivel de oxidación alcanzado por el músculo sin antioxidante. Ambas concentraciones ensayadas fueron efectivas, aunque se observaron algunas leves diferencias entre ellas.

### 2.3.10.2. Composición de la fracción lipídica

Se analizó el efecto del agregado de extracto de romero sobre las modificaciones de la fracción lipídica durante el almacenamiento refrigerado del músculo de salmón de mar.

Los resultados obtenidos mediante cromatografía en capa fina (TLC) muestran importantes diferencias en función de la concentración de antioxidante presente en el músculo. Cabe aclarar que en las placas mostradas, la cantidad de cada una de las fracciones de lípidos totales sembradas correspondió a una masa que contenía 10  $\mu\text{g}$  de fósforo. El contenido de fósforo de cada extracto había sido previamente determinado, observándose una disminución del mismo en función del tiempo de almacenamiento refrigerado, lo cual se correlaciona con una hidrólisis de los fosfolípidos, tal como se demostró en la sección 2.3.3. Dado que en todas las muestras se sembró similar cantidad de fosfolípidos, las manchas correspondientes a dicha fracción presentan igual intensidad para todas las condiciones de almacenamiento. A los 6 días de almacenamiento, los lípidos provenientes de músculo con agregado de antioxidante (200 y 500 ppm) presentaron un aumento en la intensidad relativa de las manchas



**Figura 2.40.** Cromatografía TLC de los lípidos totales de músculo de salmón de mar en función del tiempo de almacenamiento refrigerado y del agregado de antioxidante: **calle 1:** día 0; **calles 2, 3 y 4:** día 6 con agregado de 0, 200 y 500 ppm de extracto de romero, respectivamente; **calles 5, 6 y 7:** día 9, con agregado de 0, 200 y 500 ppm de extracto de romero, respectivamente

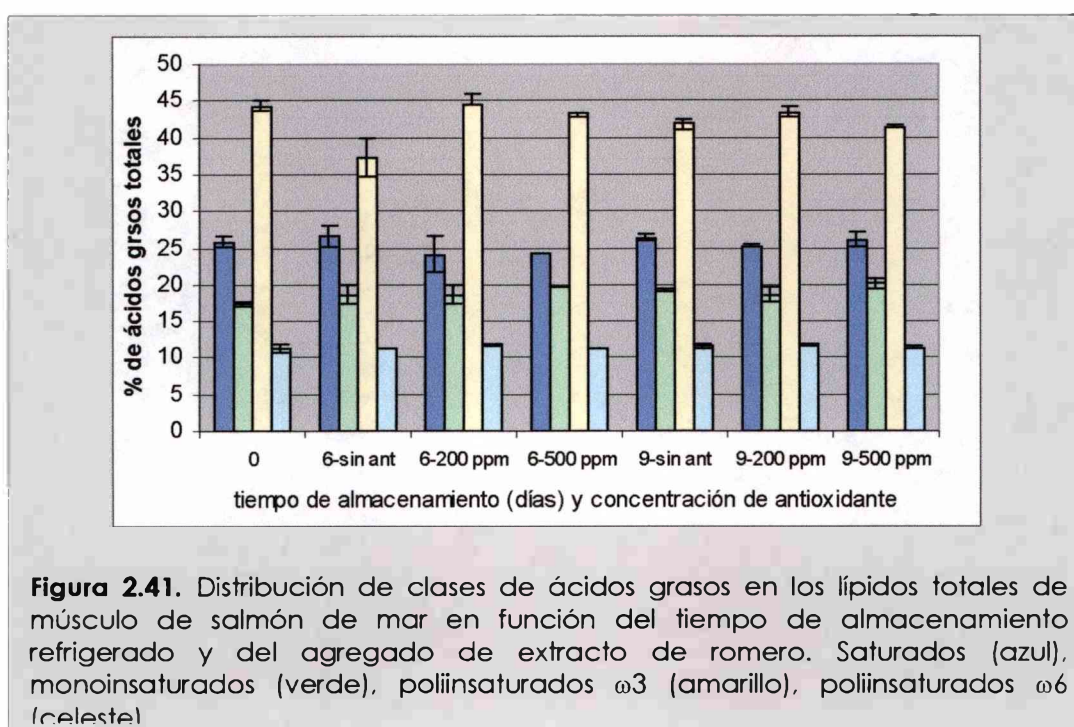
correspondientes a los ácidos grasos libres (AGL) y a los triglicéridos (TG) con respecto al músculo sin antioxidante (**Figura 2.40. - calles 2, 3 y 4**). Dicho aumento podría ser atribuido a que, dado el menor contenido de fosfolípidos a los 6 días de almacenamiento, la cantidad de muestra sembrada para tener 10  $\mu\text{g}$  de fósforo debe ser mayor, lo cual hace que la cantidad de TG y AGL también sea mayor. Sin embargo, dicho aumento no se observa en el músculo sin antioxidante, lo cual sugiere que en dicha muestra habría una muy baja cantidad de TG y AGL. Este hecho podría explicarse por el proceso de oxidación de los lípidos, el cual ha alcanzado un máximo en el número de TBA a este tiempo en el músculo sin antioxidante. Por lo tanto, puede

proponerse que estaría ocurriendo un proceso de oxidación lipídica básicamente en la fracción de TG y de AGL, generando compuestos que no son extraídos en el extracto orgánico y, consecuentemente, disminuyendo la intensidad de las correspondientes manchas.

Un comportamiento similar se repitió a los 9 días de almacenamiento, aunque a este tiempo las diferencias entre las muestras con diferentes concentraciones de antioxidante fueron menores (**Figura 2.40. - calles 5, 6 y 7**). En este caso, la hidrólisis de los fosfolípidos aparenta ser mucho mayor. Las muestras sin antioxidante presentaron una considerable intensidad de la mancha correspondiente a los AGL, aunque algo menor que las correspondientes a las muestras con antioxidante. La intensidad de la mancha correspondiente a los TG

del músculo sin antioxidante fue menor que las correspondientes al músculo con 200 y 500 ppm de extracto de romero, concordantemente con la hipótesis de la oxidación de la fracción de TG en las muestras sin antioxidante.

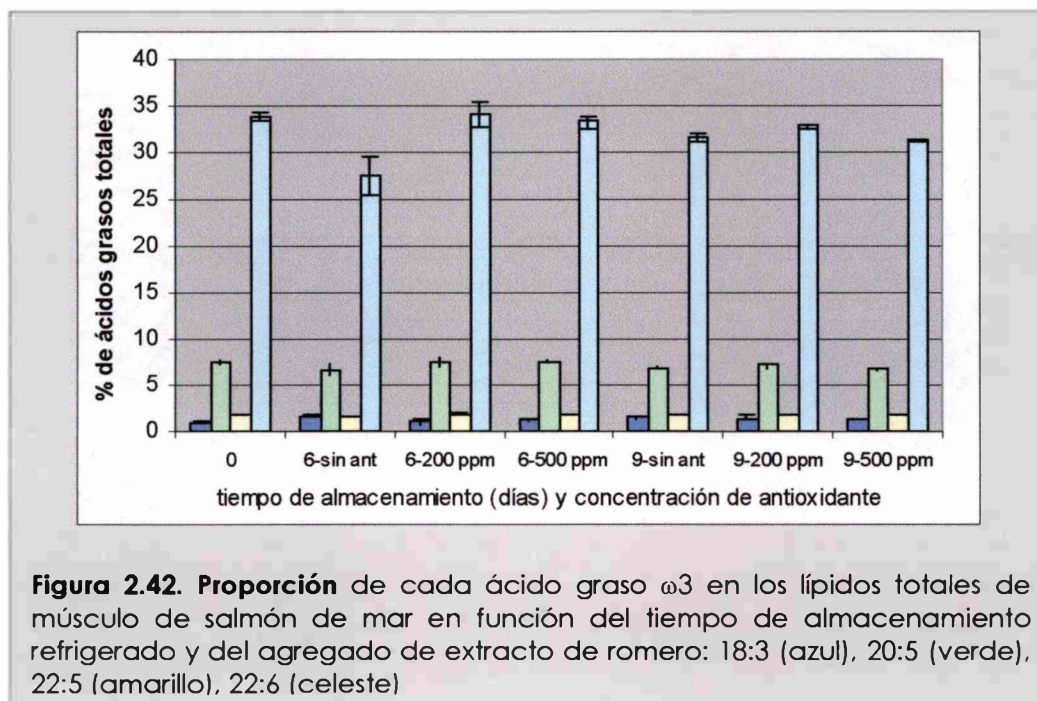
Los perfiles de ácidos grasos de los lípidos totales obtenidos por cromatografía gaseosa también presentaron diferencias en función del agregado del extracto de romero (**Figura 2.41.**). Luego de 6 días de almacenamiento, los lípidos provenientes de músculo tratado con antioxidante (tanto con 200 como con 500 ppm) no presentaron diferencias en la proporción de las distintas clases de ácidos grasos con respecto al día 0 del almacenamiento, a diferencia del



músculo sin antioxidante, el cual registró una disminución en la proporción de los ácidos poliinsaturados  $\omega_3$ . Este resultado junto con el hecho que la reducción de ácidos  $\omega_3$  fue relativamente baja (7 %) y con un valor cercano a la proporción de dichos ácidos en la fracción de TG, apoyan la idea que la oxidación lipídica estaría afectando fundamentalmente a dicha fracción.

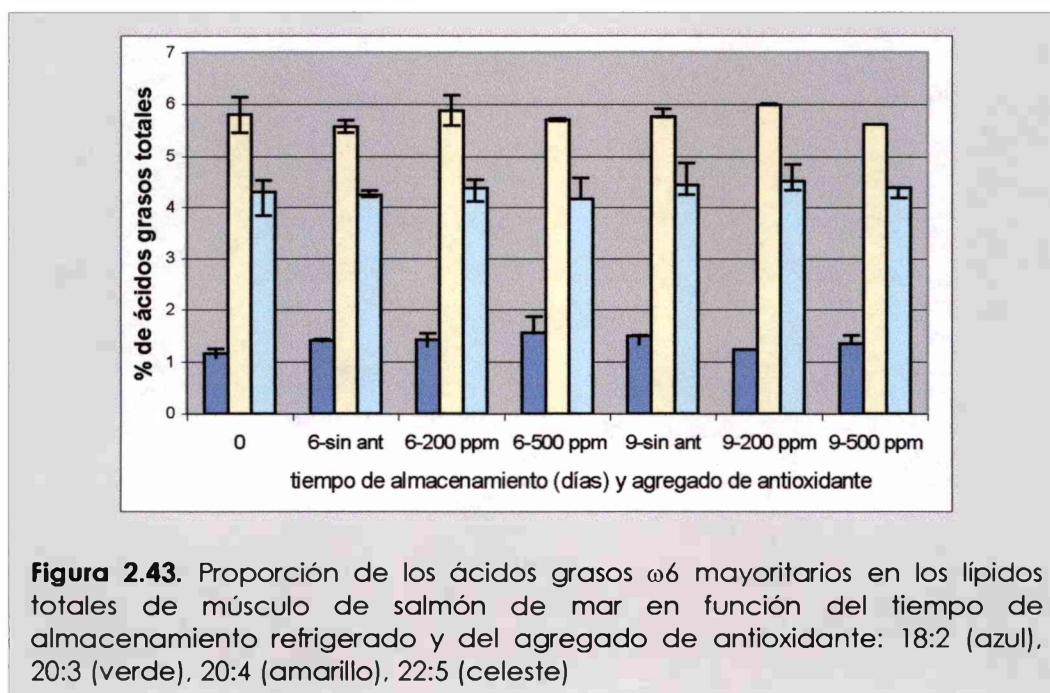
Sin embargo, luego de 9 días de almacenamiento, la proporción de los ácidos  $\omega_3$  fue similar en todas las muestras, independientemente del nivel de antioxidante agregado.

El análisis de la composición de la fracción  $\omega 3$  mostró que la proporción del ácido DHA (22:6) no presentó variaciones a los 6 días de almacenamiento en presencia del antioxidante (200 y 500 ppm), mientras que disminuyó en el músculo sin antioxidante. A los 9 días de almacenamiento, no se registraron diferencias entre las muestras (Figura 2.42.)



**Figura 2.42.** Proporción de cada ácido graso  $\omega 3$  en los lípidos totales de músculo de salmón de mar en función del tiempo de almacenamiento refrigerado y del agregado de extracto de romero: 18:3 (azul), 20:5 (verde), 22:5 (amarillo), 22:6 (celeste)

La fracción  $\omega 6$  no mostró modificaciones significativas en función del



**Figura 2.43.** Proporción de los ácidos grasos  $\omega 6$  mayoritarios en los lípidos totales de músculo de salmón de mar en función del tiempo de almacenamiento refrigerado y del agregado de antioxidante: 18:2 (azul), 20:3 (verde), 20:4 (amarillo), 22:5 (celeste)

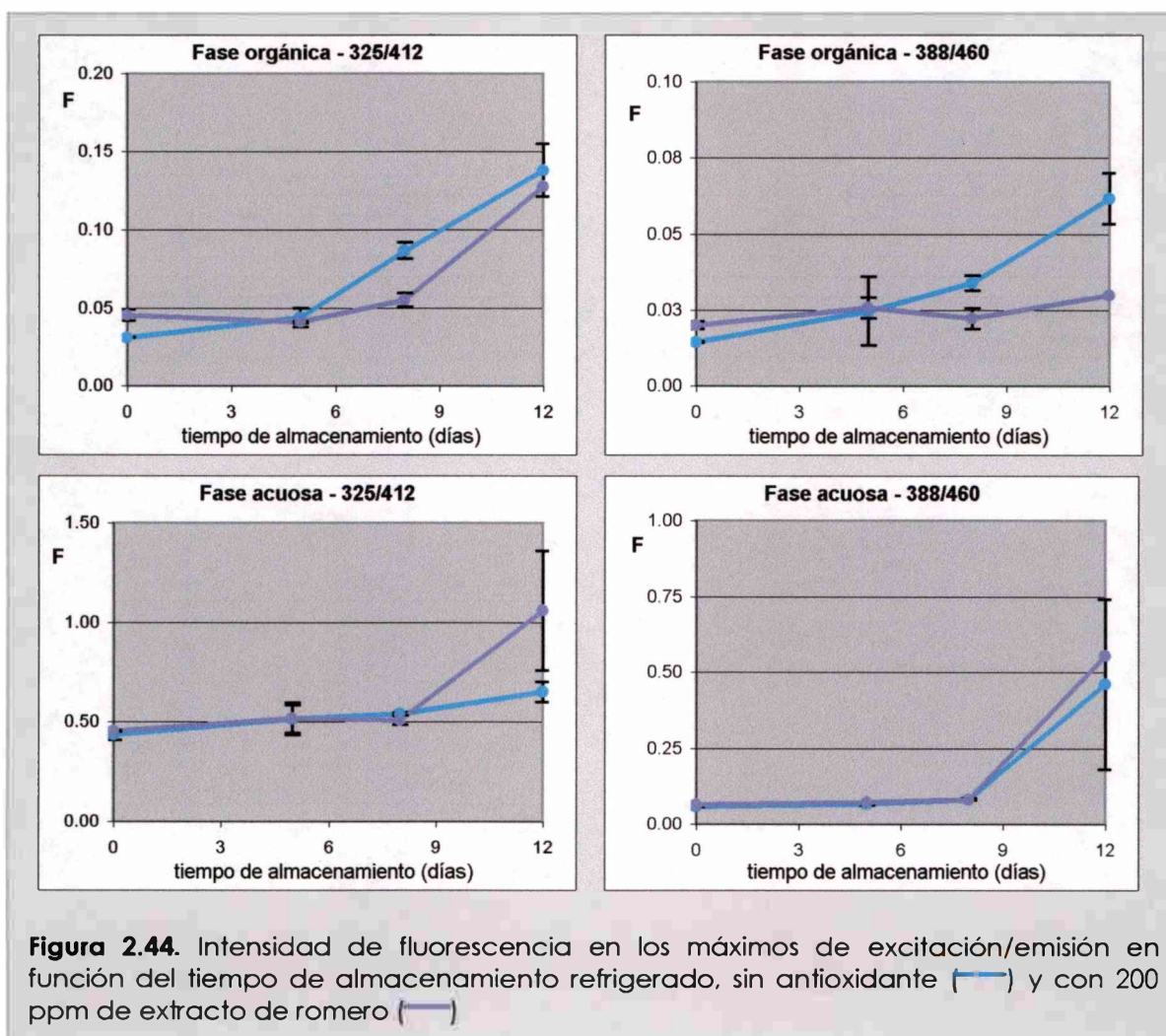


agregado de antioxidante a ninguno de los tiempos de almacenamiento refrigerado (Figura 2.43.).

### 2.3.11. Compuestos fluorescentes

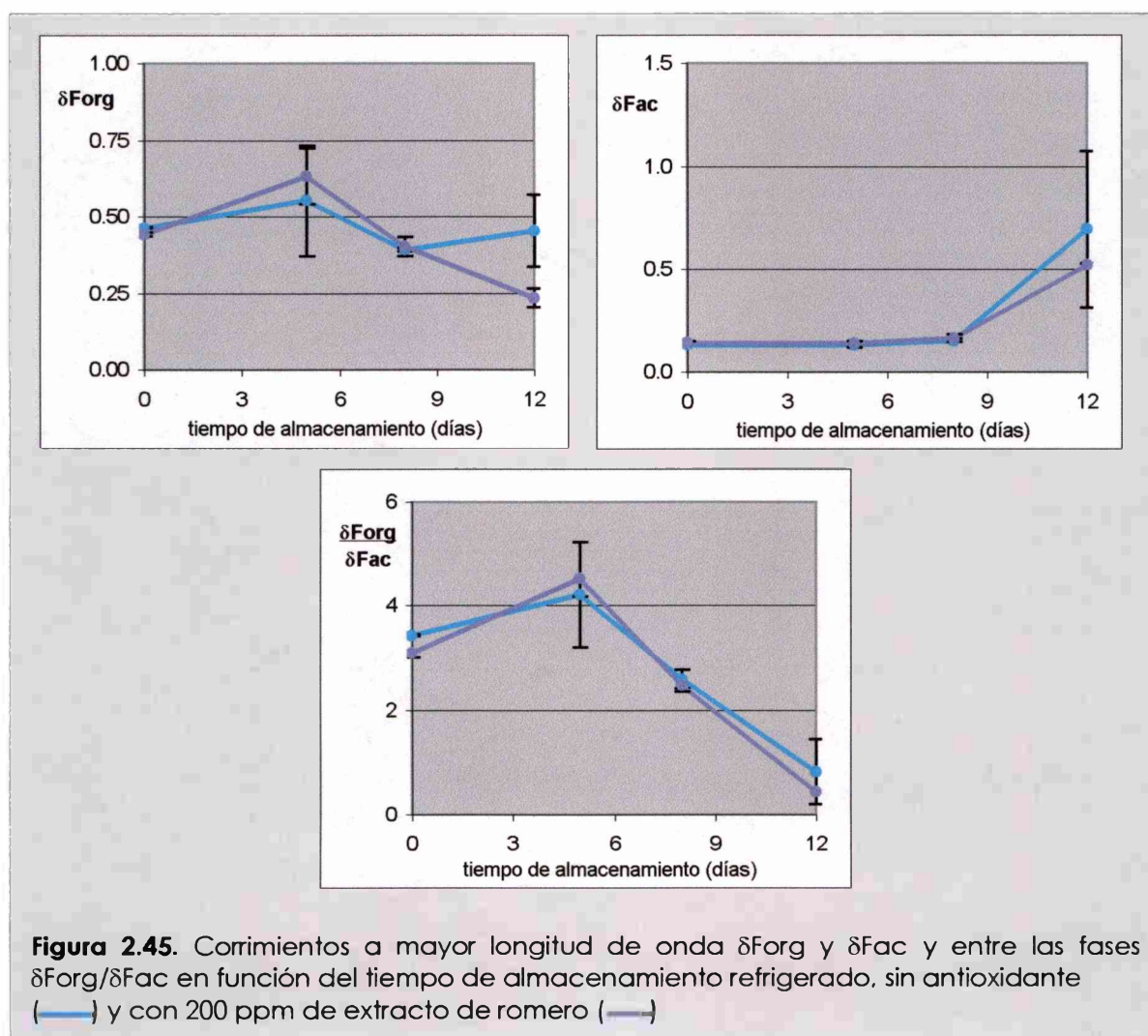
Análogamente a lo realizado con las muestras de músculo sin antioxidante, se obtuvieron las fases acuosa y orgánica del músculo con 200 y 500 ppm de extracto de romero, a fin de realizar la determinación de los compuestos de interacción de carácter fluorescente.

En la Figura 2.44. se compara la evolución de los máximos de excitación/emisión (325/412 y 388/460) en músculo sin antioxidante y con 200 ppm de extracto de romero. En la fase orgánica, la intensidad de fluorescencia a



325/412 se mantuvo constante durante los primeros 8 días de almacenamiento en la muestra con extracto de romero, mientras que el músculo sin antioxidante presentó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) a los 8 días. Los valores alcanzados por ambas muestras a los 12 días fueron similares. A 388/460, la intensidad de fluorescencia en fase orgánica del músculo con antioxidante, no se modificó en todo el período de almacenamiento ensayado mientras que, en el músculo sin antioxidante, aumentó a partir del octavo día. La fase acuosa no presentó diferencias significativas entre ambas muestras, aunque el músculo con 200 ppm de romero mostró un comportamiento irregular al final del almacenamiento.

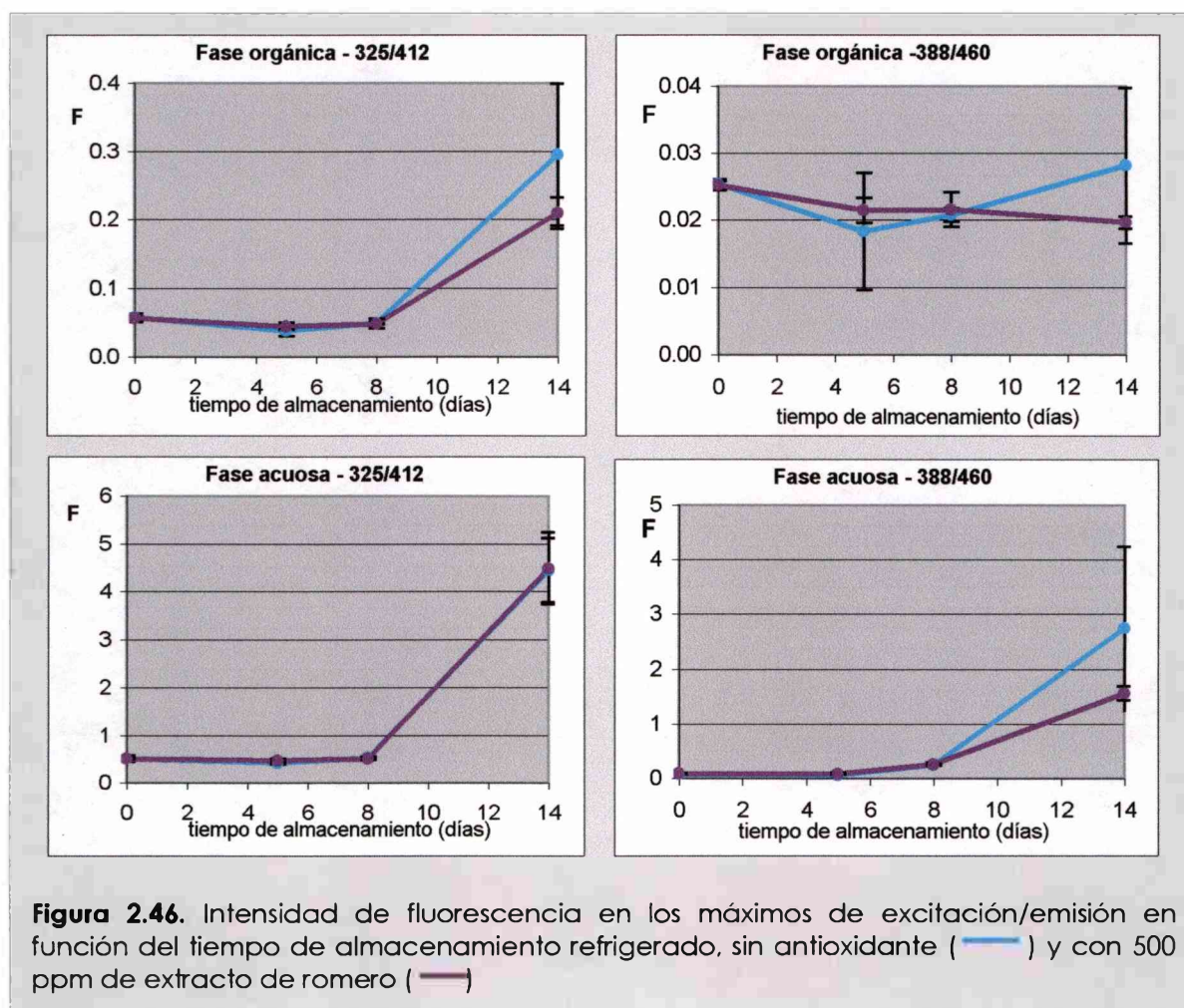
Los corrimientos a mayor longitud de onda  $\delta\text{Forg}$  y  $\delta\text{Fac}$  no presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el músculo sin antioxidante y con 200 ppm de extracto de romero. Similar comportamiento presentó el corrimiento entre las



fases  $\delta F_{org}/\delta F_{ac}$  (Figura 2.45.)

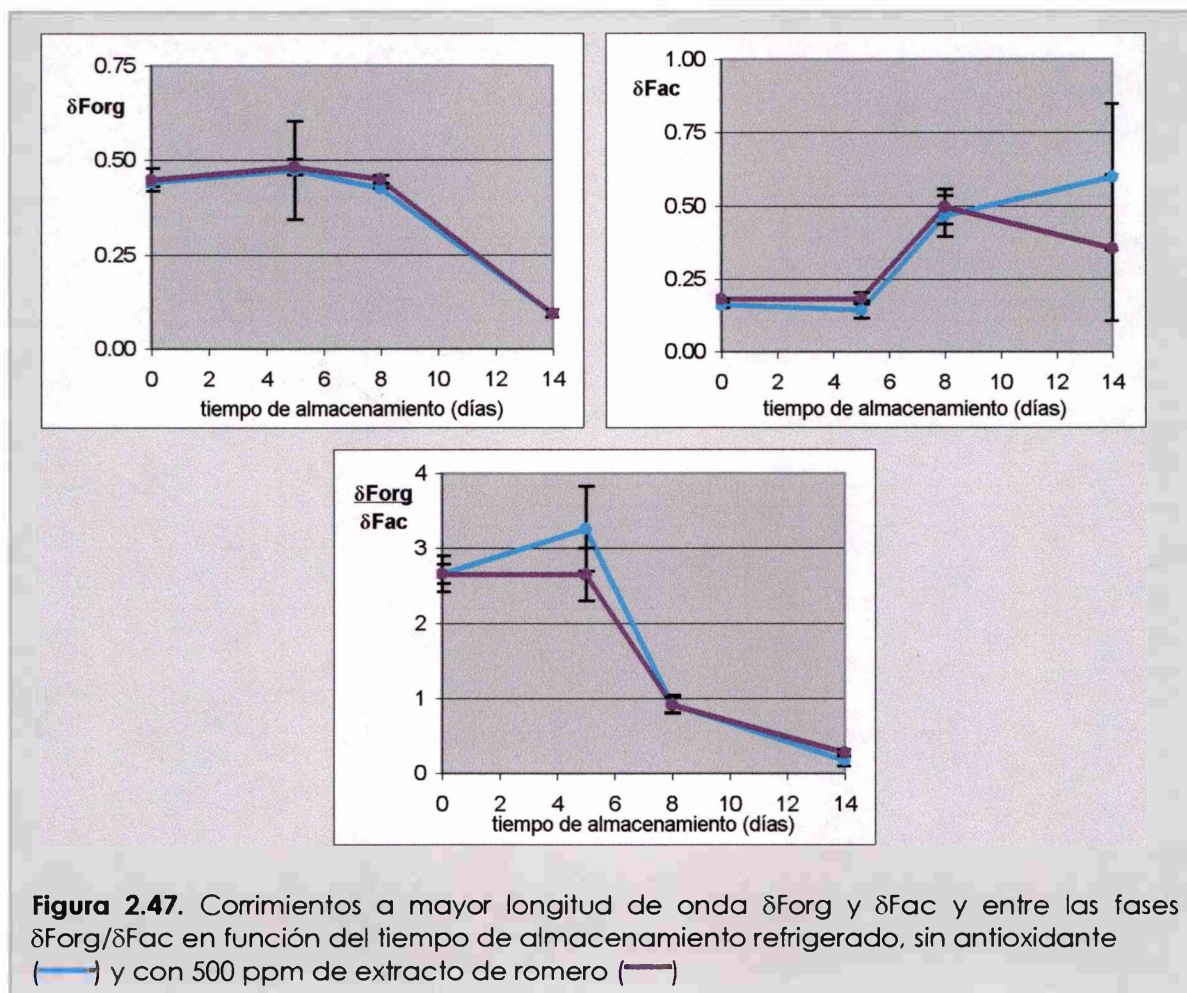
La evolución de los compuestos fluorescentes también fue analizada en músculo con agregado de 500 ppm de antioxidante (Figura 2.46.). En la fase orgánica, la intensidad de fluorescencia a 325/412 se mantuvo constante en ambas muestras durante los primeros 8 días de almacenamiento, mostrando el músculo sin antioxidante una diferencia con respecto al comportamiento presentado anteriormente; estas diferencias ya fueron tratadas en la sección 2.3.3. Posteriormente, en el día 14 se registró un aumento significativo en ambas muestras, aunque los valores alcanzados en el músculo con 500 ppm de antioxidante fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ). La fluorescencia a 388/460 no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) durante todo el período de almacenamiento refrigerado.

En el caso de la fase acuosa, tanto la intensidad de fluorescencia a



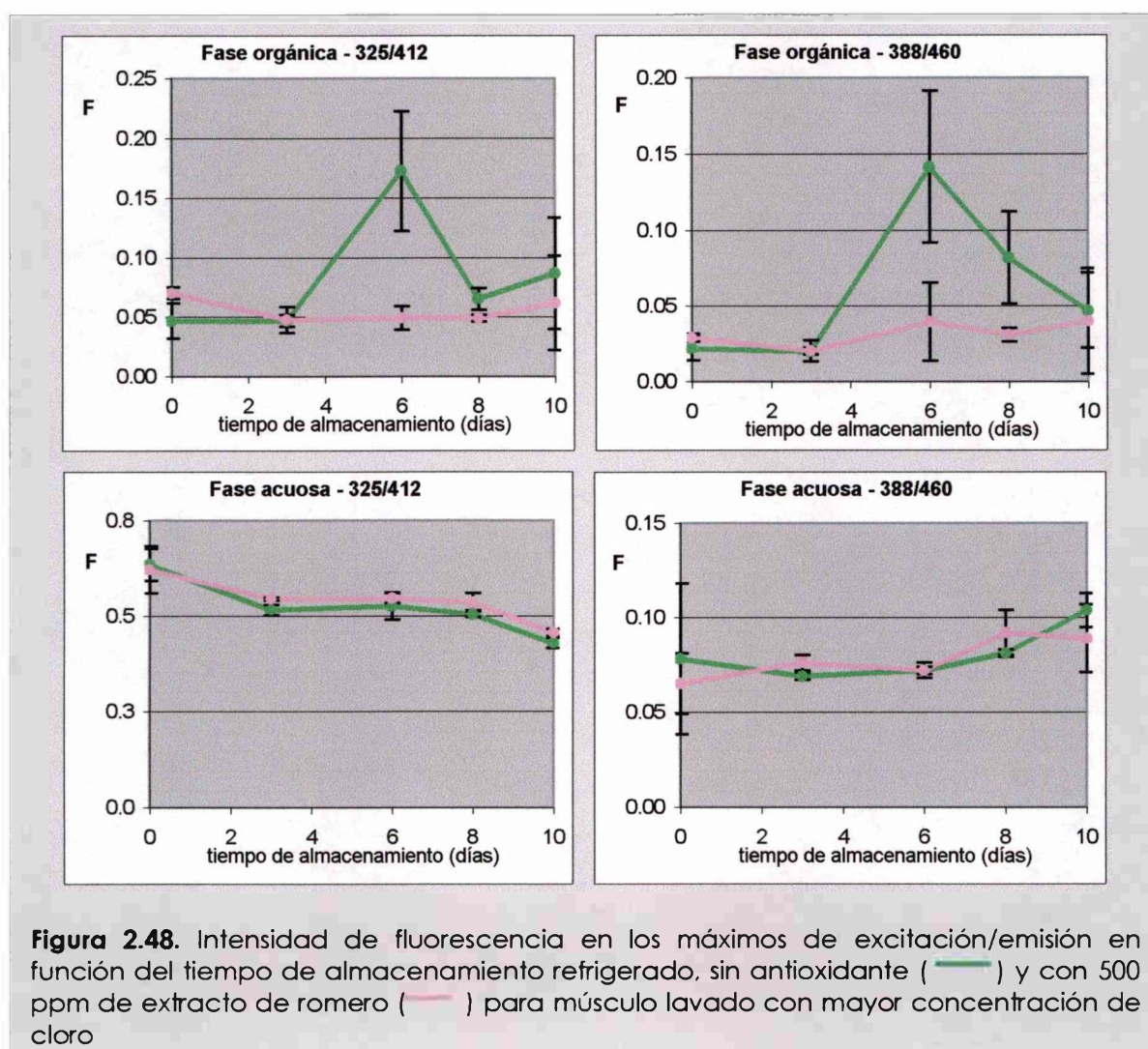
325/412 como a 388/460 fueron independientes de la presencia de antioxidante, aumentando significativamente ( $p < 0,05$ ) para ambas muestras luego de 14 días de almacenamiento.

Al analizar los corrimientos a mayor longitud de onda y el corrimiento entre las fases se obtuvieron los resultados mostrados en la **Figura 2.47**. Al igual que en el caso del agregado de 200 ppm de extracto de romero, los corrimientos  $\delta\text{Forg}$ ,  $\delta\text{Fac}$  y  $\delta\text{Forg}/\delta\text{Fac}$  en el músculo con 500 ppm de antioxidante no presentaron diferencias significativas con respecto al músculo sin antioxidante.



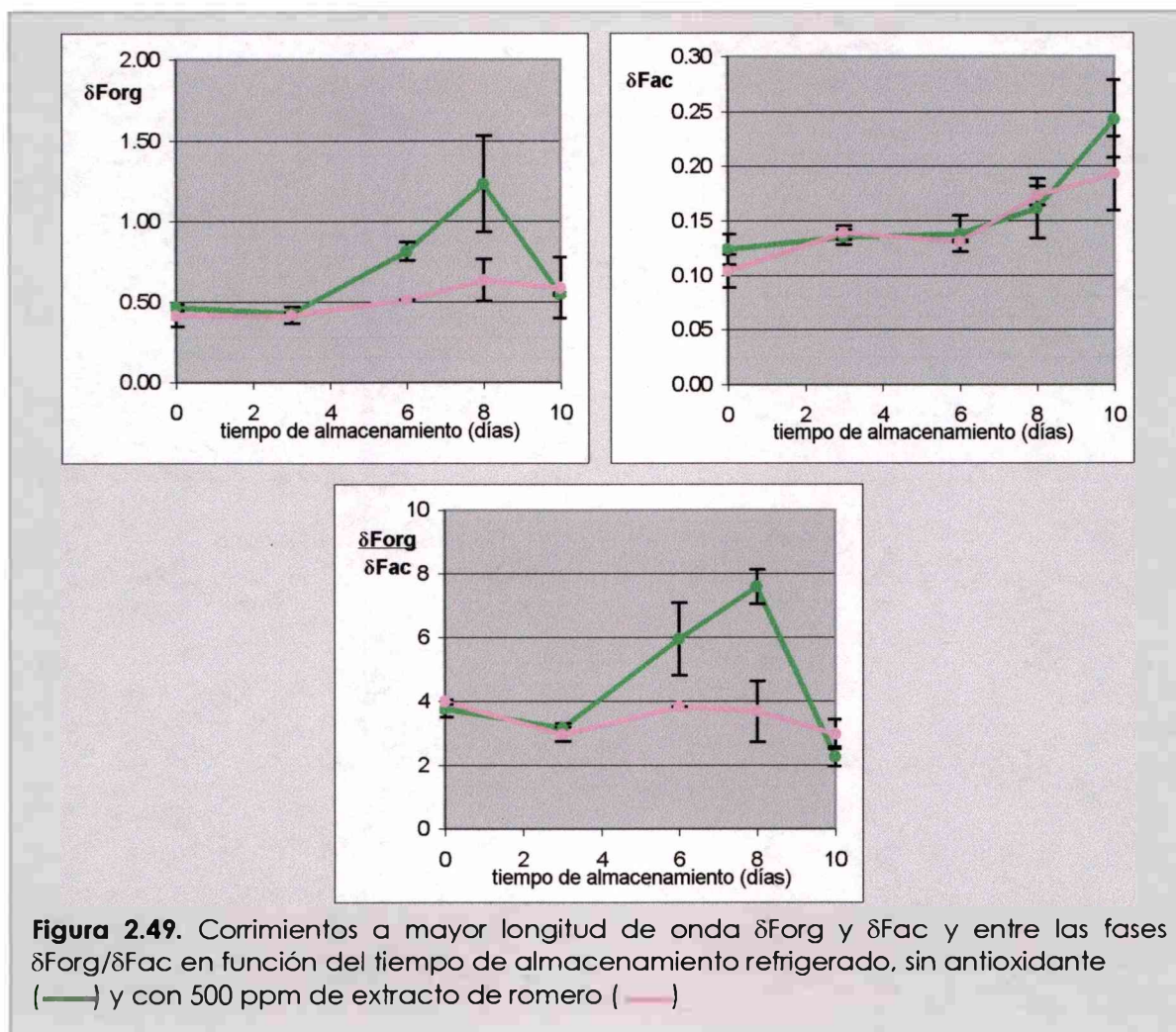
El análisis de compuestos fluorescentes también se realizó en muestras de músculo lavadas con agua de red con agregado de cloro, en ausencia y en presencia de antioxidante (500 ppm). La evolución de los máximos de fluorescencia en función del tiempo de almacenamiento puede observarse en la **Figura 2.48**. En la fase orgánica, la fluorescencia a 325/412 del músculo sin

antioxidante mostró un incremento significativo a los 6 días de almacenamiento ( $p < 0,05$ ), disminuyendo posteriormente. El músculo con 500 ppm de extracto de romero no mostró cambios durante todo el período de almacenamiento ensayado. La fluorescencia medida a 388/460 presentó un comportamiento similar al descrito para 325/412. En la fase acuosa no se registraron diferencias significativas entre ambas muestras ( $p > 0,05$ ) para ninguno de los dos máximos de fluorescencia.



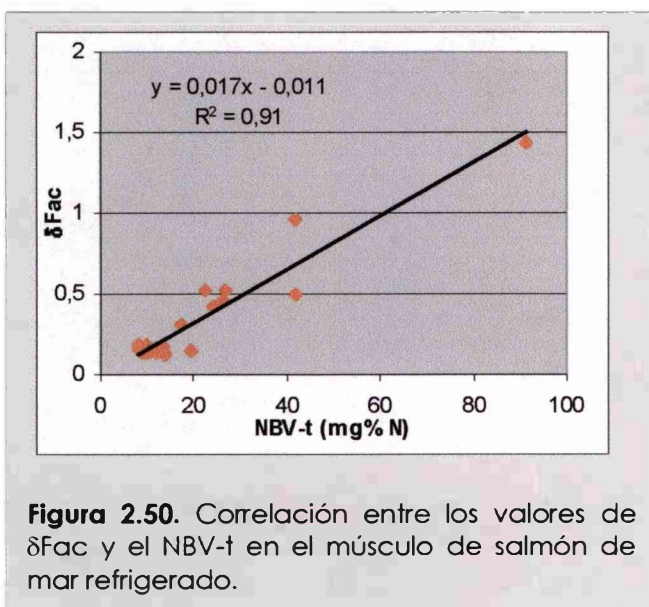
El análisis de los corrimientos  $\delta F_{org}$ ,  $\delta F_{ac}$  y  $\delta F_{org}/\delta F_{ac}$  arrojó los resultados mostrados en la **Figura 2.49**. Mientras que en el músculo sin antioxidante  $\delta F_{org}$  presentó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) a los 6 y 8 días de almacenamiento, las muestras con antioxidante no presentaron cambios. En la fase acuosa, no se

observaron diferencias significativas entre ambas muestras. Por último,  $\delta\text{Forg}/\delta\text{Fac}$  aumentó significativamente al sexto y octavo día, disminuyendo posteriormente en el músculo sin antioxidante, consecuentemente con el comportamiento de  $\delta\text{Forg}$ . En presencia de extracto de romero este parámetro no se modificó significativamente durante todo el almacenamiento.



La interpretación de los resultados obtenidos a partir de la determinación de los compuestos fluorescentes permite analizar el origen de dichos compuestos presentes en el músculo de salmón de mar. En primer término, en fase acuosa no se encontraron diferencias dadas por la presencia de antioxidante en ningún caso, aunque si se registraron cambios en función del tiempo de almacenamiento. En la última etapa de los almacenamientos se registraron aumentos de la fluorescencia a 325/412 ya 388/460 así como en el  $\delta\text{Fac}$  en todos

los casos (sin y con antioxidante). Estas observaciones sugieren que este aumento en la fluorescencia no está relacionado con la formación de compuestos de interacción entre productos de oxidación lipídica y grupos amino, sino con algún otro proceso que ocurre en el músculo en un estado avanzado del almacenamiento refrigerado. Aubourg y col. (1998) informaron una alta correlación entre el  $\delta\text{Fac}$  y el NBV-t en músculo de polaca (*Micromesistius poutassou*) refrigerado, una especie magra. A fin de comprobar dicha correlación en el músculo de salmón de mar refrigerado, se graficaron los valores de  $\delta\text{Fac}$  provenientes de diferentes experiencias (distintos músculos, distintas concentraciones de antioxidante y distinta concentración de cloro en el agua de lavado) en función de sus correspondientes valores de NBV-t. Como puede observarse en la **Figura 2.50**, existe un correlación lineal muy alta entre estos dos parámetros ( $r^2 = 0,91$ ).



En virtud de estos resultados podemos inferir que los cambios en los compuestos de interacción presentes en la fase acuosa estarían relacionados con otros procesos de deterioro del músculo tal como podría ser la degradación proteica. Es posible que el aumento en la fluorescencia esté asociado a un aumento de las especies proteicas solubles en agua.

Por otra parte,  $\delta\text{Forg}$  podría correlacionarse con el desarrollo de la oxidación lipídica dadas las diferencias encontradas entre muestras sin y con antioxidante, particularmente en el músculo lavado con mayor concentración de cloro. Como se mostró anteriormente (sección 2.3.2.b.) el cloro indujo un mayor aumento en el número de TBA en la primera etapa del almacenamiento. Los cambios registrados en los compuestos fluorescentes en fase orgánica ocurrieron entre el sexto y el octavo día de almacenamiento, momento en el cual el número

de TBA se mantiene aproximadamente constante luego de haber alcanzado un primer incremento importante.

### **2.3.12. Efecto del extracto de romero sobre las modificaciones proteicas**

Las proteínas musculares sufrieron importantes modificaciones a lo largo del almacenamiento refrigerado. Dichas modificaciones pueden tener diversas causas entre las que se cuentan la degradación mediante la acción de factores endógenos y de factores microbianos. La oxidación también puede contribuir al las modificaciones proteicas a través de la interacción con los productos de oxidación. El análisis de la fracción proteica de músculos almacenados en presencia de antioxidante permitieron analizar dicha contribución.

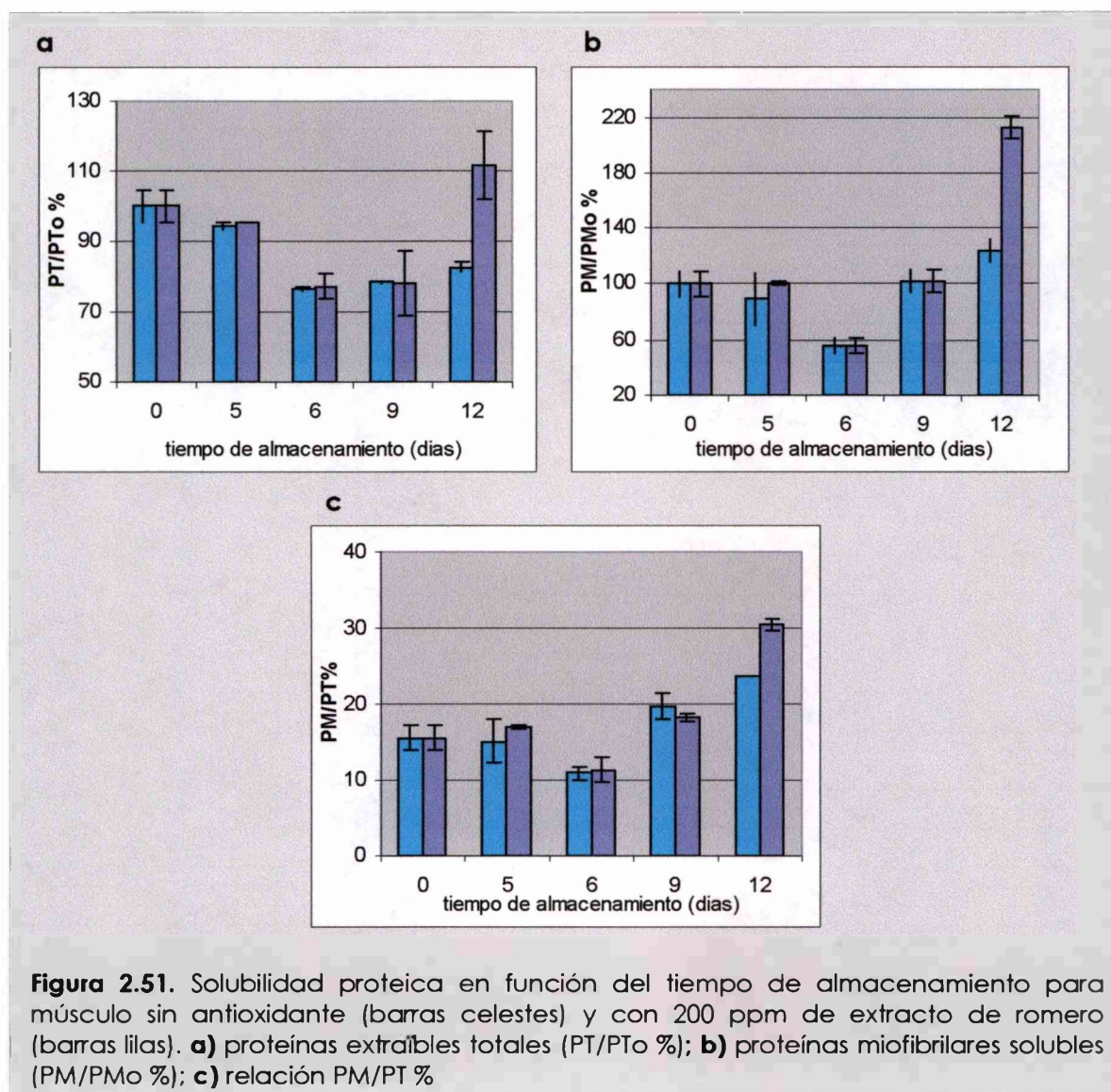
Al igual que en el músculo sin antioxidante se obtuvieron los perfiles térmicos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) del músculo con antioxidante en función del tiempo de almacenamiento refrigerado. Los músculos con 200 y 500 ppm de extracto de romero presentaron termogramas similares a los mostrados para el músculo sin antioxidante (sección **2.3.5.1**), tanto en las temperaturas de desnaturalización como en las entalpías correspondientes.

Este hecho indica que, la oxidación lipídica no tendría influencia sobre las modificaciones en la estructura proteica detectadas a través de la calorimetría diferencial de barrido, tales como el aumento de la sensibilidad térmica de la miosina y la actina como la desnaturalización de la miosina. En función de ello, el antioxidante no estaría ejerciendo ningún efecto protector sobre las mismas. Ya fue mencionado antes en este capítulo que las modificaciones observadas podrían ser producto del cambio de pH experimentado por el músculo.

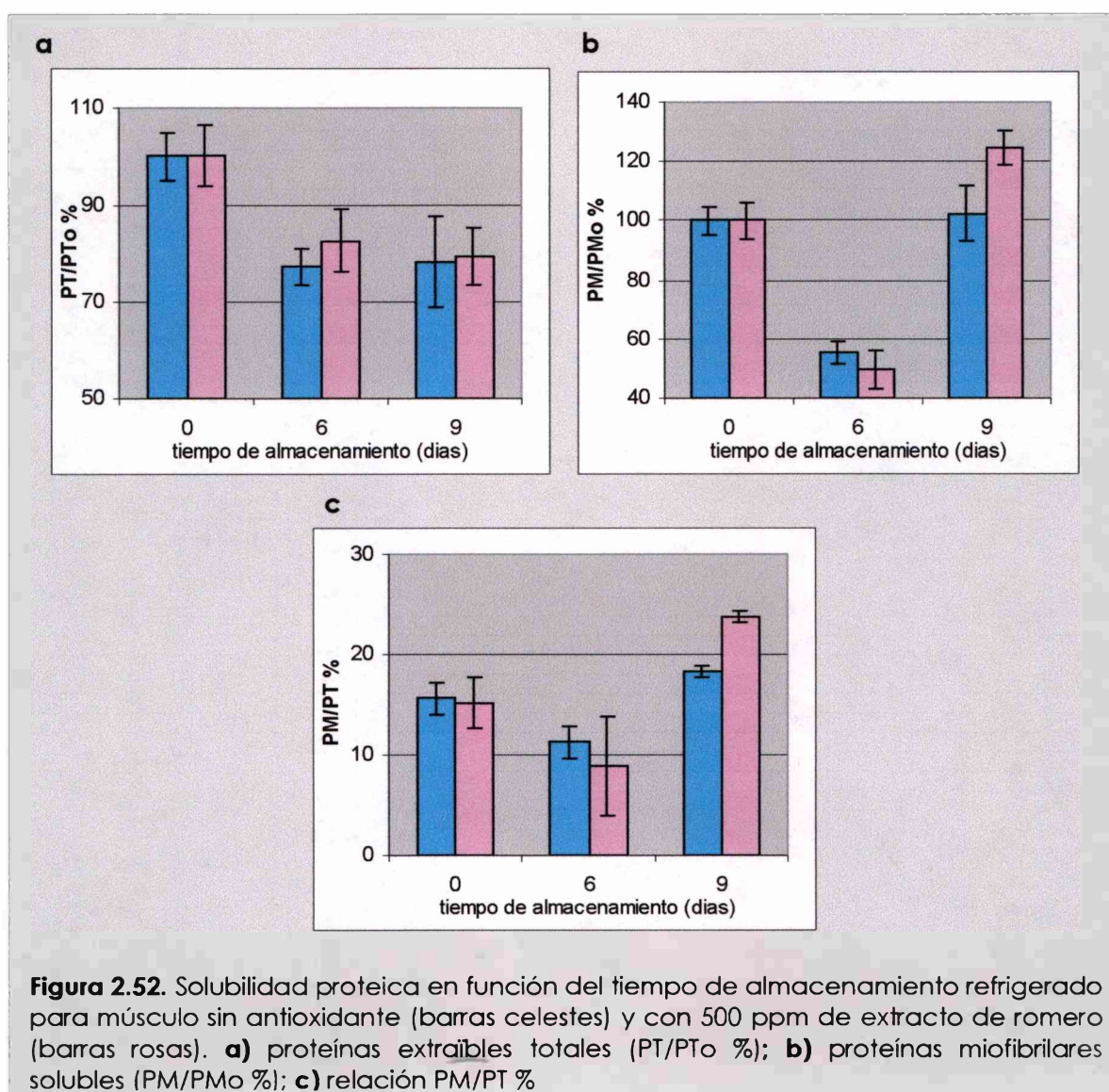
El análisis de solubilidad proteica mostró algunas diferencias entre las muestras sin antioxidante y con antioxidante. En músculo con 200 ppm de extracto de romero se observó una mayor concentración de proteínas extraíbles totales a largos tiempos de almacenamiento (12 días), sin diferencias significativas hasta el día 9 (**Figura 2.51.a**). Dicho aumento fue principalmente debido a un incremento de la solubilidad de las proteínas miofibrilares (**Figura 2.51.b**), como lo



demuestra la mayor proporción de proteínas miofibrilares con respecto a las proteínas extraíbles totales (**Figura 2.51.c**).



En músculo con 500 ppm de extracto de romero se observó un aumento en la solubilidad de las proteínas miofibrilares y en la relación PM/PT a los 9 días de almacenamiento refrigerado (**Figura 2.52.b y c**). Dicho aumento no fue suficientemente grande para evidenciarse como un aumento en las proteínas extraíbles totales, las cuales no mostraron diferencias entre el músculo sin antioxidante y con 500 ppm de romero (**Figura 2.52.a**).

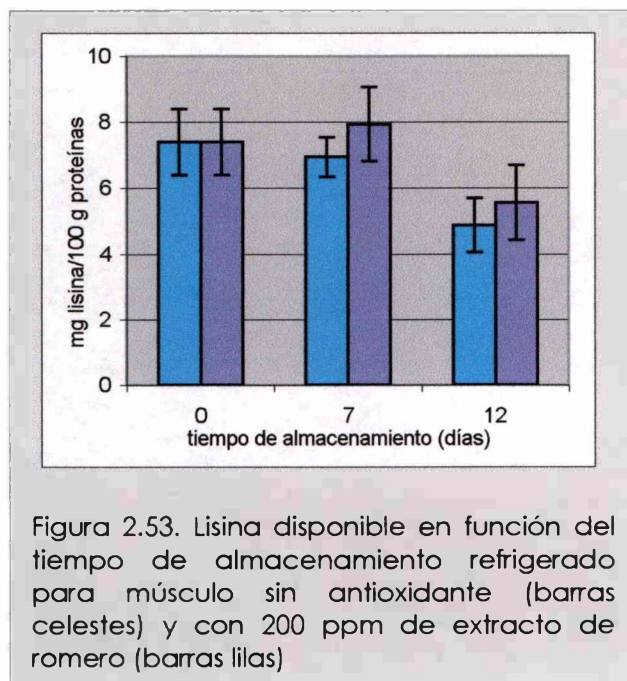


Los resultados obtenidos indican que la insolubilización proteica que ocurre durante la primera etapa del almacenamiento refrigerado del músculo de salmón de mar, no estuvo asociada al desarrollo de la oxidación lipídica, ya que la presencia del antioxidante no modificó la disminución de la solubilidad de las proteínas musculares (miofibrilares y sarcoplásmicas). Sin embargo, las diferencias encontradas a mayores tiempos de almacenamiento sugieren algún efecto de los productos de oxidación sobre la solubilidad proteica. Dichos efectos se hicieron evidentes cuando las proteínas musculares habían sufrido una

degradación y desorganización de su estructura, lo cual sugiere una mayor posibilidad de interacción de los productos de oxidación en esas circunstancias.

Los perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones solubles fueron similares a los obtenidos para el músculo sin antioxidante (sección 2.3.5.3.) (resultados no mostrados).

En cuanto al contenido de lisina disponible, no se registraron diferencias



significativas ( $p < 0,05$ ) en función del agregado de antioxidante al músculo (Figura 2.53.). Por lo tanto, la disminución de lisina disponible observada a largos tiempos de almacenamiento no fue producida por interacción de productos de oxidación carbonílicos con los grupos amino libres de la lisina como podría esperarse, dado que se trata de una reacción ampliamente probada en otros sistemas como ya fue comentado (*Introducción General*).

Es importante remarcar que las determinaciones de lisina disponible fueron realizadas sobre un precipitado de proteínas (obtenido con ácido tricloroacético) como se indicó en la sección 2.2.10 (*Materiales y Métodos*). Los resultados mostrados están referidos a 100 g de proteínas presentes en dicho precipitado. Dado que las proteínas musculares podrían sufrir degradación en función del tiempo de almacenamiento refrigerado, la cual podría afectar en distinta medida a las diferentes proteínas, la composición cualitativa de las proteínas del precipitado podría modificarse, principalmente al final del almacenamiento. Este cambio podría estar alterando el contenido de lisina disponible.

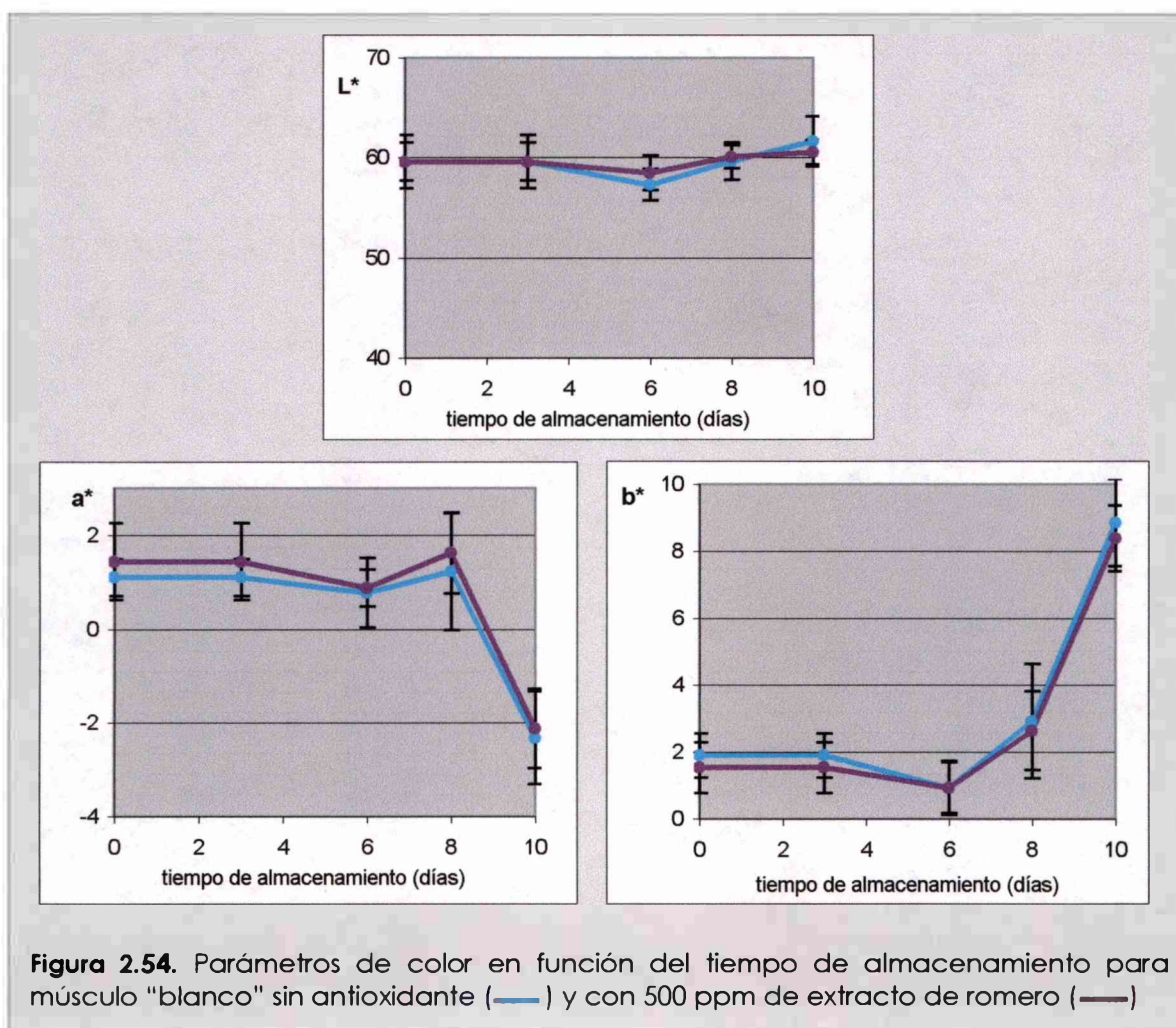
Los geles obtenidos por tratamiento térmico a partir de músculo almacenado en presencia de antioxidante no presentaron diferencias

significativas en sus parámetros texturales con respecto a los obtenidos a partir de músculo sin antioxidante.

En cuanto a la textura del músculo, tampoco se registraron diferencias entre el músculo sin y con antioxidante luego de 6 días de almacenamiento.

### 2.3.13. Efecto del extracto de romero sobre los cambios de color

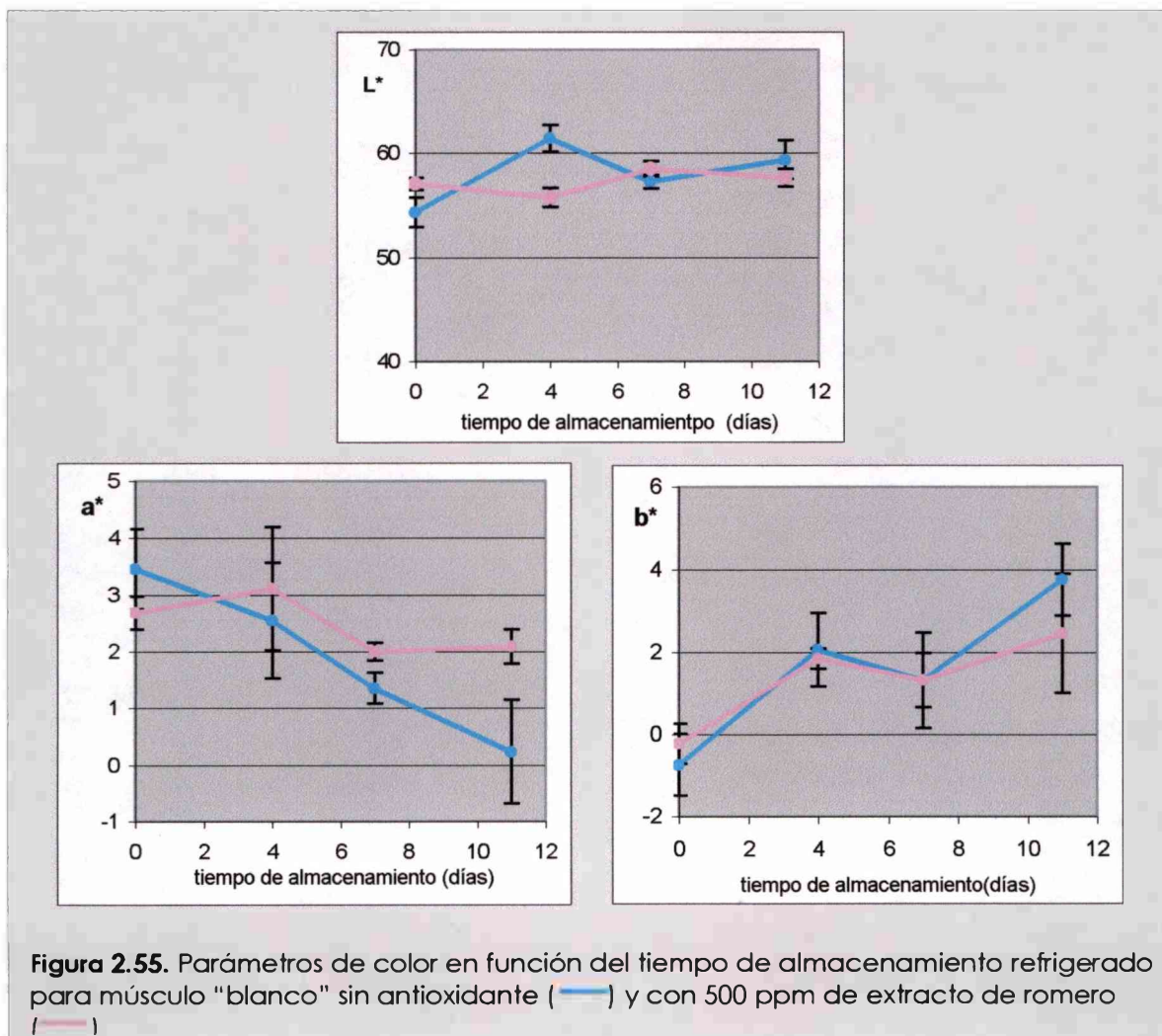
Ya se ha comentado anteriormente que los cambios de color en el músculo están asociados a la oxidación, por lo cual la aplicación de un antioxidante podría tener efectos beneficiosos en este aspecto.



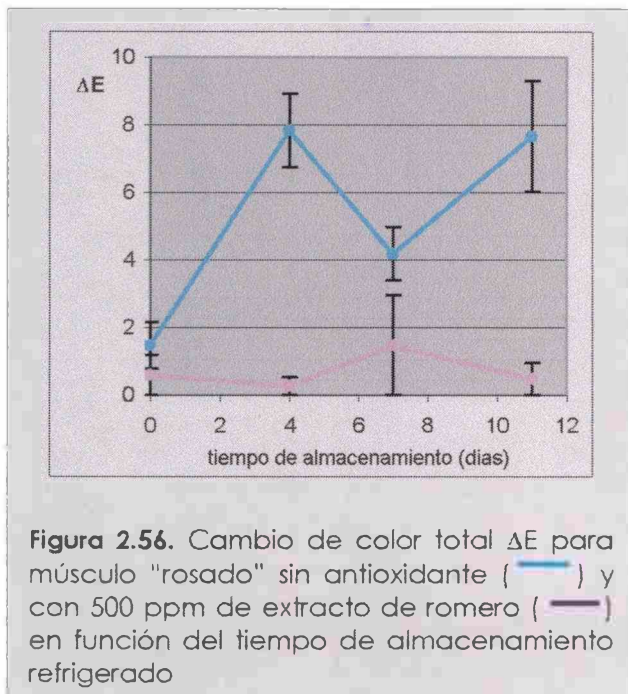
Se analizaron los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en muestras de músculo con 200 y 500 ppm de extracto de romero en comparación con el músculo sin antioxidante.

Como se comentó anteriormente, se encontraron músculos con diferentes colores iniciales. En la **Figura 2.54**, se muestran los resultados registrados en músculo "blanco" con agregado de 500 ppm de antioxidante. Ninguno de los tres parámetros de color mostró diferencias significativas en presencia de extracto de romero con respecto al músculo sin antioxidante. Este hecho indica que los cambios de color observados en este músculo (disminución de  $a^*$  y aumento de  $b^*$  luego del octavo día) no se correlacionaron con el desarrollo de la oxidación lipídica.

En el músculo "rosado" se obtuvieron resultados diferentes como se muestra en la **Figura 2.55**.



El parámetro  $L^*$  presentó una diferencia entre las muestras sin y con antioxidante a los 4 días de almacenamiento, con valores similares para ambas muestras en los otros tiempos ensayados. El color rosado del músculo disminuyó en ambas muestras, pero en presencia de extracto de romero se observó una menor



disminución del parámetro  $a^*$  indicando una mayor preservación de dicho color, hecho que fue comprobado visualmente. El parámetro  $b^*$  aumentó en ambas muestras, no mostrando diferencias significativas entre ellas. El cambio de color total  $\Delta E$  fue notablemente afectado por el agregado del extracto de romero, no presentando diferencias significativas en función del tiempo de almacenamiento refrigerado en el músculo con 500

ppm del antioxidante (Figura 2.56.).

En función de estos resultados, podemos decir que el extracto de romero (500 ppm) ejerció un efecto positivo en la preservación del color del músculo "rosado" de salmón de mar almacenado en refrigeración, actuando principalmente sobre la pérdida de color rojo.

Al agregar 200 ppm de extracto de romero al músculo de salmón de mar se obtuvieron resultados similares a los mostrados para 500 ppm (resultados no mostrados).

Es importante notar que el antioxidante fue capaz de preservar el color solo parcialmente a pesar de haber inhibido la oxidación lipídica en un nivel muy elevado como lo indica la determinación del número de TBA. Este hecho sugiere que la pérdida de color en el músculo tendría varias causas, una de ellas estaría vinculada al proceso de oxidación lipídica.

Similares resultados fueron encontrados en músculo picado y lavado de bacalao al cual se le agregó líquido exudado de músculo de bacalao como

antioxidante. Mientras el desarrollo del proceso de oxidación lipídica fue totalmente prevenido, hubo igualmente pérdida de color rojo en esas muestras (Wetterskog y Undeland, 2004). Dado que en dichos sistemas el crecimiento bacteriano había sido inhibido, los autores postulan como posibles causas de la disminución del parámetro  $a^*$ : la conversión espontánea de oxi y deoxi-hemoglobina a meta-hemoglobina; la desnaturalización de las proteínas miofibrilares los que produce un cambio en la interacción con la hemoglobina y deshidratación superficial.

## 2.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se analizaron diferentes aspectos relacionados con la pérdida de calidad del músculo de salmón de mar durante el almacenamiento refrigerado, a fin de evaluar la incidencia del proceso de oxidación lipídica y de sus consecuencias sobre el deterioro.

En primer término es importante resaltar que, a pesar de tratarse de una especie magra, se registró un considerable desarrollo de la oxidación lipídica - medido mediante el ensayo de TBA- durante el almacenamiento refrigerado, aún en los músculos de menor contenido graso, excepto en aquellos casos donde este es muy bajo en época de pre-desove. Los estudios de la composición de la fase lipídica sugieren dos procesos de deterioro de dicha fracción: por una parte, ocurriría una hidrólisis fundamentalmente de la fracción de los fosfolípidos, muy evidente a tiempos de almacenamiento relativamente largos (9 días), aumentando notablemente la cantidad de ácidos grasos libres presentes. Por otra parte, la oxidación de los lípidos comienza en los primeros días del almacenamiento, observándose a los 6 días el máximo deterioro. Este proceso afectaría principalmente a la fracción de triglicéridos -la cual es poco abundante en el salmón de mar-, y específicamente el ácido docosahexaenoico (DHA - 22:6  $\omega$ 3) sería el ácido graso más afectado. Dicho ácido presentó una abundancia relativa alta en el salmón de mar.

Todos los almacenamientos realizados se extendieron por períodos más prolongados que el período de vida útil, con el objetivo de disponer de mayor cantidad de información que permita entender mejor los procesos que ocurrieron en el músculo. Sin embargo, a nivel práctico interesa conocer las alteraciones que ocurren durante el período en el cual el músculo permanece apto para el consumo. Dicho período está determinado, en pescado refrigerado, por el crecimiento bacteriano. En este trabajo, se estimó la vida útil del músculo picado mediante recuentos de microorganismos aerobios totales. Este no es el mejor parámetro indicador de la vida útil ya que el deterioro del pescado está determinado por ciertas bacterias específicas del deterioro. Sin embargo, el período de vida útil estimado (alrededor de 6 días) mostró una buena correlación



con otras alteraciones que ocurrieron en el músculo. Así, el pH varió poco durante este período manteniéndose por debajo de 7,0 y aumentando posteriormente, mientras que la TMA y el NBV-t se mantuvieron por debajo de los niveles máximos aceptados. La textura del músculo no presentó diferencias con respecto a la del inicio del almacenamiento.

En cuanto a las alteraciones proteicas, en el período de vida útil se registró un cierto nivel de insolubilización, más importante para las proteínas miofibrilares, y una desnaturalización parcial de la miosina. En días posteriores (día 9) ya se evidenciaron signos de una desorganización de la estructura proteica muscular posiblemente relacionada con el aumento del pH. La lisina disponible no presentó modificaciones en el tiempo de vida útil, lo cual es importante desde el punto de vista de la calidad nutricional del músculo. En cuanto a la funcionalidad proteica, estudiada a través de las propiedades de los geles obtenidos por tratamiento térmico, luego de un período de almacenamiento equivalente a la vida útil se obtuvieron geles similares a los del inicio del almacenamiento, los cuales presentaron diferencias solo en la firmeza. Sería importante evaluar como afectaría esta diferencia a la calidad de un producto basado en un proceso de gelación térmica.

El proceso de oxidación lipídica ocurrió de manera importante en el período de vida útil. Por lo tanto, debe ser un factor a tener en cuenta al almacenar el músculo de salmón de mar en refrigeración, dadas sus negativas consecuencias tanto desde el punto de vista toxicológico por la toxicidad de algunos productos de la oxidación, como desde el punto de vista nutricional y de los beneficios para la salud por la pérdida de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ 3.

Los compuestos de interacción fluorescentes o productos terciarios de la oxidación no presentaron modificaciones durante el período de vida útil, tal como lo demostró la constancia en los valores de los corrimientos a mayor longitud de onda en fase orgánica y en fase acuosa y del corrimiento entre las fases. En función de ello, se puede concluir que no ocurrió una interacción importante entre los productos secundarios de la oxidación y grupos amino libres (tanto de origen proteico como de fosfolípidos) en el período de vida útil.

Otro aspecto a tener en cuenta en relación con la oxidación lipídica es la utilización de una mayor concentración de cloro en el agua de lavado. Este tipo de procesamiento llevó a un mayor desarrollo de productos secundarios de la oxidación, sin lograr un aumento de la vida útil del músculo. Además, el efecto del cloro también se evidenció en la determinación de compuestos fluorescentes ya que, en este caso, se registró un aumento en el corrimiento a mayor longitud de onda en fase orgánica en los primeros ocho días de almacenamiento.

Con el fin de prevenir la oxidación lipídica se evaluó la aplicación de extracto de romero. Las dos concentraciones utilizadas (200 y 500 ppm) fueron efectivas, impidiendo casi completamente el desarrollo de productos de oxidación -medidos a través del ensayo de TBA- y la disminución de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega 3$  en el tiempo de vida útil. El extracto de romero también presentó efectos beneficiosos en la preservación del color del músculo, previniendo, aunque no totalmente, la pérdida de color rojo. Además, impidió la oxidación lipídica en un nivel similar en músculo que había sido lavado con una mayor concentración de cloro.

Estos resultados son importantes desde el punto de vista de su aplicación práctica dada la creciente tendencia de la industria alimenticia de buscar aditivos de origen natural. Por lo tanto, la aplicación del extracto de romero muestra ser una buena opción para prevenir la oxidación en productos a base de carne de salmón de mar que van a ser conservados en refrigeración. Si bien las concentraciones recomendadas por la firma fabricante del extracto se encuentran entre 400 y 1200 ppm para diferentes productos, dependiendo del contenido de lípidos, una concentración de 200 ppm resultó ser muy efectiva en el músculo de salmón de mar, a pesar de su alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados.

Desde el punto de vista de la investigación del proceso de oxidación, la aplicación del antioxidante permitió discriminar cuales son las alteraciones del músculo que están vinculadas con dicho proceso de las que no lo están. Así, pudo determinarse que los cambios en los compuestos fluorescentes que ocurren a largos tiempos de oxidación, fundamentalmente un aumento del corrimiento a mayor longitud de onda en fase acuosa y disminución en fase orgánica en

algunos casos, no presentaron relación con la oxidación lipídica. Según los resultados aquí obtenidos, dichas variaciones no serían indicadoras de la interacción entre productos de oxidación y otros componentes del músculo como ha sido informado por otros autores, ya que ocurren tanto en ausencia como en presencia de antioxidante. En cambio, las variaciones registradas en fase orgánica más tempranamente en el almacenamiento del músculo lavado con mayor concentración de cloro, pueden ser atribuidas a la presencia de los productos de oxidación lipídica dado que no ocurrieron en presencia del antioxidante.

Estos resultados sugieren que para que ocurra una interacción de los productos de oxidación con los grupos amino detectable a través de la determinación de fluorescencia se requiere un mayor nivel de oxidación.

Por otra parte, las modificaciones estructurales y funcionales de las proteínas musculares durante el período de vida útil no se vieron afectadas por la presencia de antioxidante, indicando que no están dadas como consecuencia de la oxidación lipídica. En presencia de antioxidante, se observaron diferencias en la solubilidad proteica (aumento) a largos tiempos de almacenamiento, aunque la explicación de este hecho no es sencilla ya que las proteínas sufren otros deterioros en esa etapa.

# Capítulo 3. Almacenamiento congelado



### 3.1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

La congelación seguida por el almacenamiento congelado es un importante método de conservación de pescado, el cual se aplica a una considerable proporción de las capturas mundiales; aproximadamente un 24 % del total del pescado capturado en el año 1992 fue destinado a productos congelados para consumo humano (Huss, 1998).

El crecimiento microbiano no es un problema en los productos pesqueros congelados, ya que a temperaturas menores a -9 °C la actividad de las bacterias marinas se encuentra inhibida, permaneciendo los microorganismos esencialmente en un estado de latencia (Slavin, 1968). Sin embargo, el músculo de pescado congelado se deteriora más rápidamente que otros músculos tal como el de bovino, exhibiendo deterioro en diversos aspectos de su calidad (Matsumoto, 1979). Así, dichos productos pueden exhibir cambios en el flavor, el olor, la textura y el color. Las alteraciones serán dependientes de la manipulación y el procesamiento aplicado antes, durante y después de la congelación, así como también de la composición química del músculo.

Uno de los principales aspectos del deterioro del pescado congelado está relacionado con la desnaturalización de las proteínas, fundamentalmente las proteínas miofibrilares. Entre los factores causantes de dicha desnaturalización pueden mencionarse: 1) daño de células y membranas causado por los cristales de hielo; 2) deshidratación de las moléculas proteicas; 3) incremento de la concentración de solutos -especialmente sales inorgánicas- en la fase no congelada; 4) actividad enzimática; 5) reacción de las proteínas con ácidos grasos libres y lípidos; 6) reacción de las proteínas con productos de la oxidación lipídica y 7) presencia de formaldehído en especies capaces de producirlo (Matsumoto, 1980; Shenouda, 1980; Badii y Howell, 2002). Sin embargo, no ha sido completamente elucidado como y en qué extensión contribuye cada uno de esos factores (Smith, 1987).

La desnaturalización de las proteínas ha sido asociada con los cambios en la textura observados en el músculo de pescado almacenado congelado, tal como el "endurecimiento". También se encuentra relacionada con otras

alteraciones funcionales tales como un aumento en la pérdida de fluidos, cambios en las propiedades de unión y de gelación (Matsumoto, 1979; Awad y col, 1969).

Tanto la hidrólisis como la oxidación de los lípidos ocurre durante el almacenamiento congelado de los productos pesqueros, aún en aquellos con bajo contenido de grasa, siendo un factor importante en la aceptabilidad de dichos productos (Aubourg y col., 1999). Estos procesos pueden estar vinculados con la desnaturalización proteica como se mencionó anteriormente, con los cambios texturales y la pérdida de funcionalidad. Además, la oxidación de los lípidos puede relacionarse con los cambios en el color dados por la oxidación de pigmentos y el flavor y olor debido a la generación de compuestos volátiles.

En función de lo expuesto, se proponen en el presente capítulo los siguientes objetivos:

- *Analizar los cambios en la calidad del músculo de salmón de mar durante el almacenamiento en estado congelado, particularmente aquéllos relacionados con la oxidación lipídica y sus consecuencias sobre otros constituyentes tales como las proteínas.*
- *Evaluar el efecto del agregado de extracto de romero como antioxidante de origen natural al músculo almacenado en estado congelado y refrigerado.*

## 3.2. MATERIALES Y METODOS

### 3.2.1. Material utilizado

La materia prima utilizada en el almacenamiento congelado (salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*)) fue de características similares a las detalladas para el almacenamiento refrigerado (**Capítulo 2 - Materiales y Métodos**).

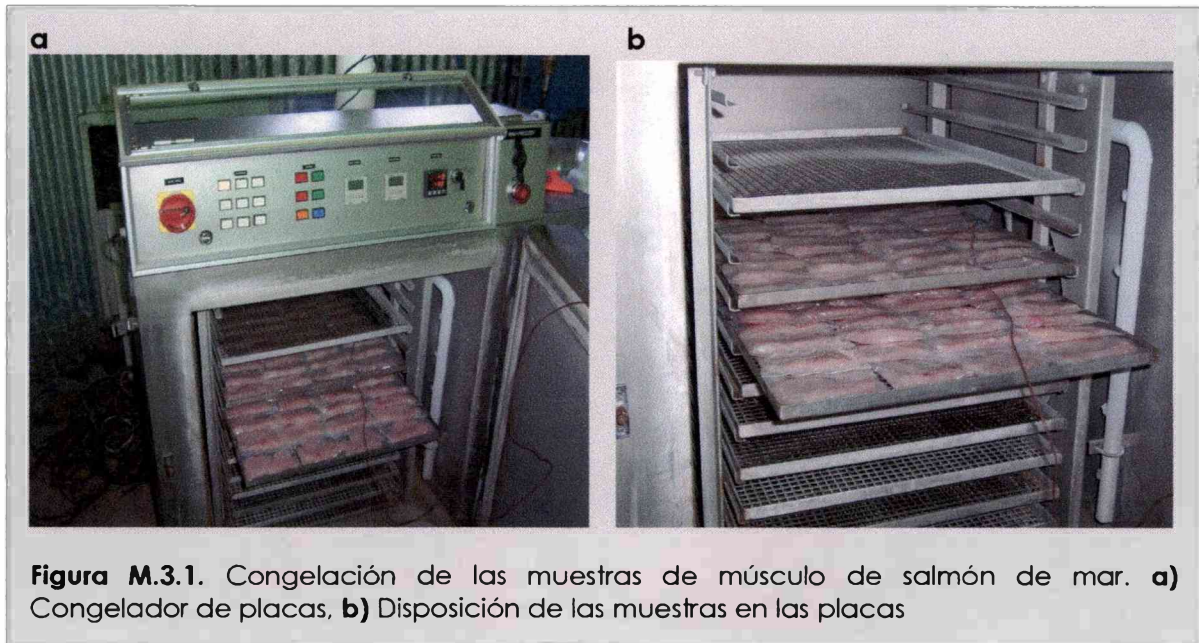
### 3.2.2. Procesamiento y almacenamiento del pescado

Los ejemplares de salmón de mar fueron procesados tal como se señaló en el caso del almacenamiento refrigerado. Cabe aclarar que los filetes fueron lavados con agua de red con agregado de 1 ppm de cloro.

**Envasado de las muestras:** las muestras de músculo picado fueron envasadas en bolsas de polietileno (100  $\mu\text{m}$  de espesor), de igual manera que para el almacenamiento refrigerado.

#### 3.2.2.1. Congelación de las muestras

Una vez envasadas, las muestras fueron congeladas en un congelador de placas Mini Freezer (White Martin, Brasil) utilizando nitrógeno líquido como fluido criogénico (**Figura M.3.1.a**). La temperatura establecida en el equipo fue  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La historia térmica durante la congelación fue registrada mediante una termocupla de cobre - constantan colocada en el interior de una muestra. Cabe aclarar, que las muestras fueron colocadas de manera extendida dentro de las bolsas a fin de tener un menor espesor y disminuir así el tiempo necesario para la congelación (**Figura M.3.1.b**). Al alcanzar una temperatura de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el interior, las muestras fueron retiradas del congelador.



**Figura M.3.1.** Congelación de las muestras de músculo de salmón de mar. **a)** Congelador de placas, **b)** Disposición de las muestras en las placas

Se calculó el tiempo característico de congelación ( $t_c$ ), como el período de tiempo en minutos que tarda un punto de la muestra en pasar de  $-1$  a  $-7$  °C (temperatura a la cual se considera que está congelado el 80 % del agua del músculo (Riedel, 1957; Mascheroni, 1977, Wagner, 1986). Según los valores de  $t_c$  obtenidos, la congelación se realizó a velocidades intermedias.

### **3.2.2.2. Almacenamiento congelado de las muestras**

Las muestras congeladas fueron almacenadas en un freezer cuya temperatura fue monitoreada a cada hora mediante un adquisidor de datos acoplado a un sensor de temperatura (button data logger temperature). La temperatura media registrada durante el período de almacenamiento fue  $-11 \pm 2$  °C.

### **3.2.2.3. Descongelación de las muestras**

La descongelación de las muestras a distintos tiempos de almacenamiento fue realizado en cámara a  $4$  °C durante 12 - 14 h.



### **3.2.3. Aplicación del antioxidante**

Se analizó el efecto de la aplicación de un antioxidante natural tal como el extracto de romero, durante el almacenamiento congelado. A tal efecto, se utilizó el extracto comercial *Guardian Rosemary extract 09* (DANISCO), el cual fue preparado y aplicado como ya fue mencionado en el almacenamiento refrigerado. La concentración final en el músculo fue de 200 y 500 ppm.

Las siguientes determinaciones fueron realizadas de manera similar a lo detallado para el músculo refrigerado (*Capítulo 2 – Materiales y Métodos*):

**3.2.4. Composición proximal del músculo** (proteínas, lípidos totales, agua y cenizas)

**3.2.5. Composición de la fracción lipídica**

**3.2.6. Ensayo de TBA**

**3.2.7. Determinación de compuestos fluorescentes**

**3.2.8. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

**3.2.9. Proteína total extraíble y proteínas miofibrilares solubles**

**3.2.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

**3.2.11. Lisina disponible**

**3.2.12. Determinación de parámetros de color**

### **3.2.13. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

Se analizaron cortes de músculo de salmón de mar de aproximadamente 2 mm de lado, fijándolos con glutaraldehído 2,5 % en buffer fosfato con 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  (pH = 7,2). Las muestras fueron posteriormente procesadas tal como se indicó en la sección **1.2.10.3. (Materiales y Métodos - Capítulo 1)** y observadas en un microscopio JEOL 35 CF.

### **3.2.14. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

Se utilizó esta técnica para analizar la fracción de proteínas miofibrilares solubles. Las proteínas disueltas en buffer Tris-HCl, KCl 0,6 M, (pH = 7,0) con una concentración de 0,2 mg/ml fueron tratadas según el procedimiento de Lozano y Morales (1983) y observadas en un microscopio JEOL 100 CX II (ver sección **1.2.7. - Materiales y Métodos - Capítulo 1**).

### **3.2.15. Análisis estadístico**

Se analizó el efecto del tiempo de almacenamiento así como del agregado de antioxidante mediante un análisis de varianza (ANAVA). La comparación de las medias se realizó mediante el test de menor diferencia significativa (LSD) de Fisher, considerándose que dos medias eran significativamente diferentes cuando la probabilidad determinada era menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Estos análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa SYSTAT (Wilkinson, 1990).

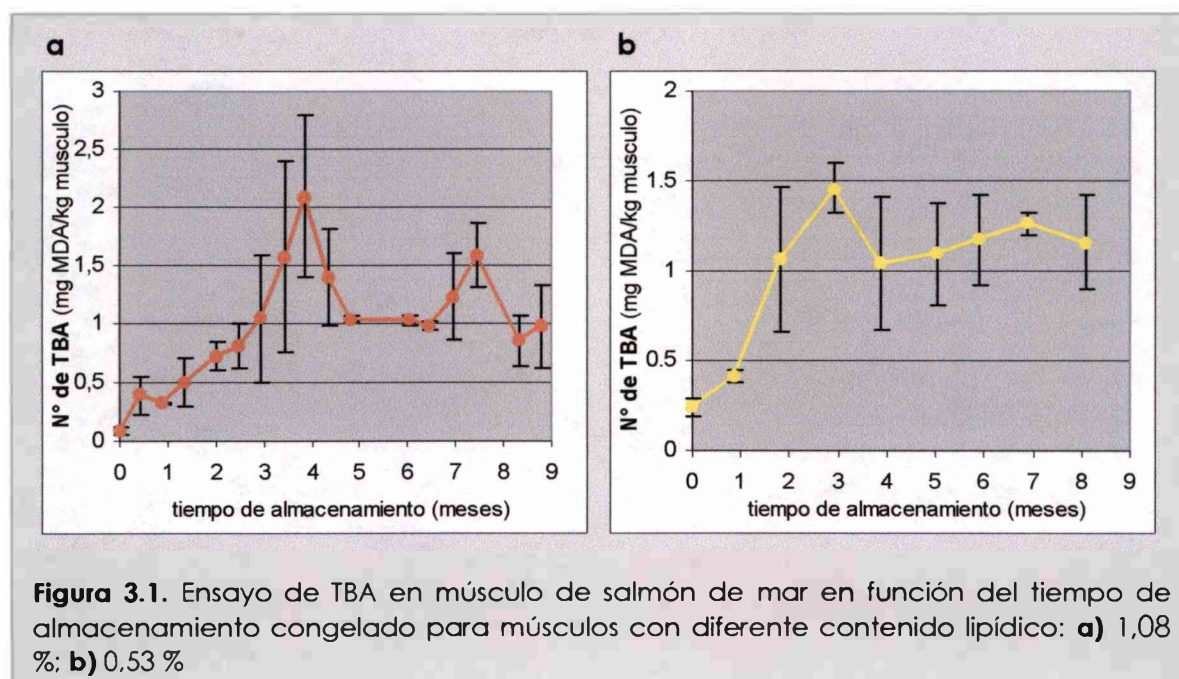
### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### A. MODIFICACIONES DURANTE EL ALMACENAMIENTO CONGELADO DEL MUSCULO DE SALMON DE MAR

##### 3.3.1. Seguimiento de la oxidación lipídica. Número de TBA

La evolución de los productos secundarios de la oxidación lipídica durante el almacenamiento congelado del músculo de salmón de mar, fue evaluada a través de la determinación del número de TBA. Al igual que en el caso del almacenamiento refrigerado, se tomaron dos muestras al azar a distintos tiempos de almacenamiento, realizándose la determinación por duplicado en cada una de ellas.

En la **Figura 3.1.** se presenta la evolución del número de TBA registrada durante el almacenamiento congelado de músculos con diferente contenido de lípidos:  $1,08 \pm 0,15$  % (**Figura 3.1.a**) y  $0,53 \pm 0,08$  % (**Figura 3.1.b**). El músculo con 1,08 % de lípidos provenía de un pescado de 11 kg capturado en el mes de agosto, mientras que el de 0,53 % correspondió a pescados capturados en el mes de junio con pesos entre 2,2 y 3,5 kg.



Los valores de TBA iniciales fueron comparables a los registrados anteriormente en los músculos almacenados en refrigeración (sección 2.3.2.). En las primeras etapas del almacenamiento, se registró un aumento progresivo del número de TBA en ambos casos. Este incremento mantuvo una pendiente aproximadamente constante hasta alcanzar un valor de TBA máximo. Dicho máximo fue alcanzado alrededor de los 4 meses de almacenamiento por el músculo con mayor contenido lipídico presentando un valor medio de 2,09. El músculo con menor contenido de lípidos alcanzó el máximo número de TBA a los 3 meses, con un valor de 1,46. Como en el caso del almacenamiento refrigerado, hubo una correlación entre el contenido lipídico y el máximo número de TBA alcanzado.

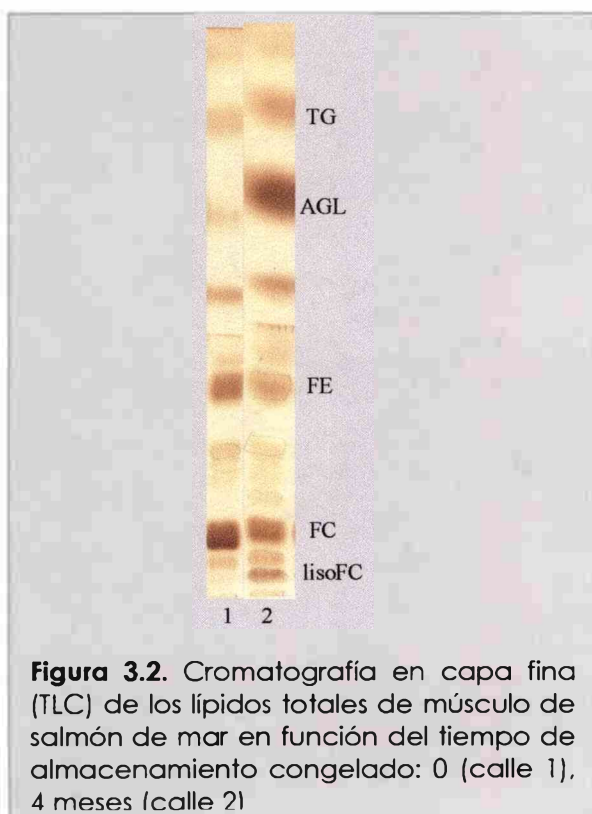
Cabe señalar que, como puede evidenciarse en las figuras, se registraron dispersiones entre los valores de TBA de muestras tomadas a un mismo tiempo de almacenamiento, especialmente cuando este parámetro presenta el mayor cambio, lo cual no había sido observado en el caso del almacenamiento refrigerado. Este comportamiento se repitió en ambos casos, sugiriendo una heterogeneidad en la ocurrencia de la oxidación lipídica en el músculo en estado congelado.

Resultados comparables han sido informados para otras especies pesqueras magras. Determinaciones realizadas en distintas zonas del músculo (dorsal, cola, anterodorsal y oscuro o rojo) de merluza (*Merluccius merluccius*) (0,5 - 1 % de lípidos) mostraron un máximo en el número de TBA al sexto mes de almacenamiento a -11 °C, con mayores valores en el músculo oscuro que en las distintas zonas del músculo claro. Sin embargo, aunque las determinaciones fueron realizadas separando las zonas del músculo, los valores presentaron grandes dispersiones como en el caso del salmón de mar (Aubourg y col., 1999). En polaca (*Micromesistius poutassou*) (contenido de lípidos 0,43 - 0,60 %) almacenada a -10 °C, el número de TBA presentó un máximo a los 5 meses de almacenamiento, disminuyendo luego (Aubourg, 1999b). Comportamientos similares fueron observados en bacalao (*Gadus morhua*) y eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) (contenidos lipídicos 0,45 - 0,65 %) almacenados a la

misma temperatura, mostrando un máximo a los 5 meses (Aubourg y Medina, 1999).

Si se compara la evolución del número de TBA en el músculo de salmón de mar almacenado a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$  con la del músculo almacenado en refrigeración, puede observarse que los niveles de los productos secundarios de oxidación máximos alcanzados son comparables. Este hecho muestra que la oxidación lipídica ocurre en su máxima extensión durante el almacenamiento congelado en las presentes condiciones. Diversos estudios han demostrado que la temperatura de almacenamiento congelado ejerce un importante efecto sobre el desarrollo de la oxidación lipídica. Así, menores temperaturas de almacenamiento resultaron en menor formación de productos de oxidación, tanto primarios como secundarios (Pérez-Villarreal y Howgate, 1991; Aubourg, 1999b; Aubourg y Medina, 1999). La temperatura de almacenamiento utilizada en este trabajo permitió un importante desarrollo del proceso de oxidación lipídica.

### 3.3.2. Modificaciones en la fracción lipídica



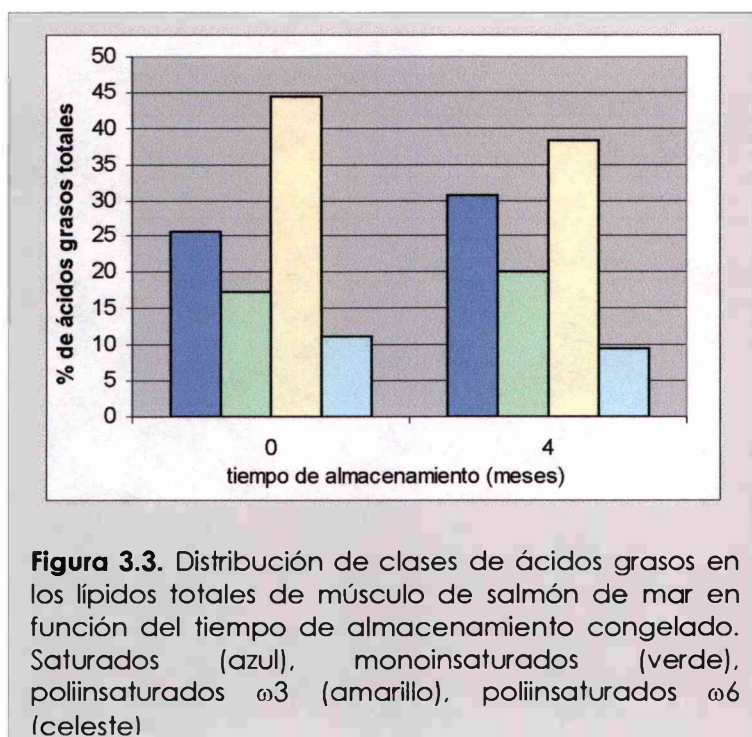
**Figura 3.2.** Cromatografía en capa fina (TLC) de los lípidos totales de músculo de salmón de mar en función del tiempo de almacenamiento congelado: 0 (calle 1), 4 meses (calle 2)

De igual manera que en el caso del almacenamiento refrigerado, se analizaron las modificaciones que ocurrieron en la fracción lipídica durante el almacenamiento en estado congelado del músculo de salmón de mar, realizándose las determinaciones luego de 4 meses de almacenamiento, dado que a ese tiempo se había alcanzado el máximo número de TBA. En primer término, se investigaron cambios en las distintas fracciones lipídicas mediante cromatografía en capa fina (TLC), separando los

componentes presentes en la fracción de lípidos polares (fosfolípidos) y de lípidos neutros. Luego de 4 meses de almacenamiento a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$  se registró un gran aumento de la banda correspondiente a los ácidos grasos libres, AGL, junto con una disminución marcada de los fosfolípidos fosfatidilcolina, FC, y fosfatidiletanolamina, FE, y la aparición de una cantidad significativa de lisofosfatidilcolina (lisoFC) (**Figura 3.2. - calle 2**). Estos resultados indican una importante hidrólisis de los fosfolípidos, la cual parece ocurrir en una mayor extensión que en el caso del almacenamiento refrigerado

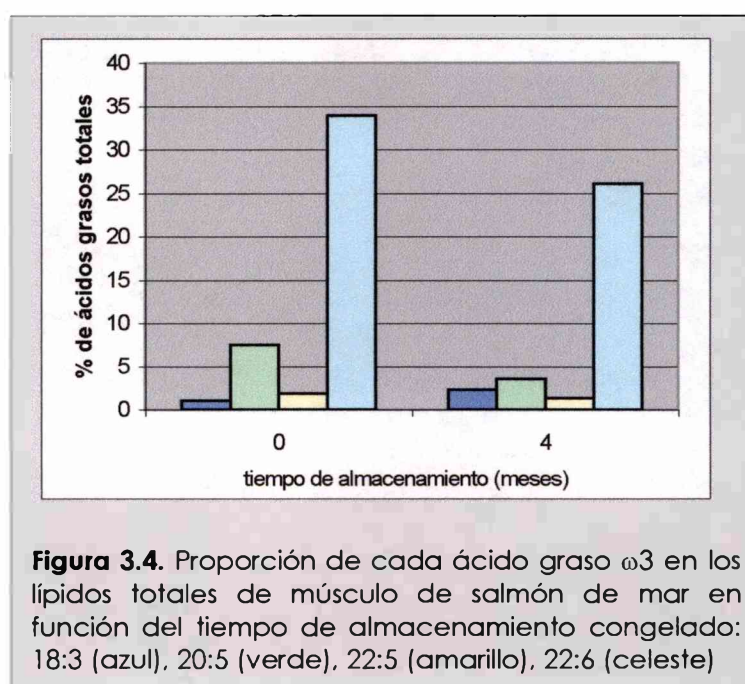
La lipólisis es una reacción que ha sido detectada en músculo almacenado congelado de diversas especies. Algunos autores han atribuido el aumento en la concentración de ácidos grasos libres en músculos magros a la hidrólisis de fosfolípidos solamente, mientras que otros lo atribuyen tanto a hidrólisis de fosfolípidos como de lípidos neutros (Aubourg, 1999b). En un estudio realizado en merluza, Aubourg y col (1999) demostraron que las zonas de músculo oscuro -las cuales contienen mayor proporción de triglicéridos y menor de fosfolípidos- presentaban una menor velocidad de hidrólisis que el músculo claro. La acumulación de ácidos grasos libres en el músculo congelado ha sido relacionada con la pérdida de aceptabilidad, dada por el deterioro que estos ácidos pueden causar en la textura al interactuar con proteínas (Shenouda, 1980; Mackie, 1993) y por su relación con el desarrollo de la oxidación lipídica (Han y Liston, 1988)

Mediante cromatografía gaseosa, se evaluaron las posibles modificaciones en el perfil de ácidos grasos de los lípidos totales. Luego de 4 meses de almacenamiento congelado se registró una disminución en la proporción de ácidos poliinsaturados  $\omega 3$  (**Figura 3.3.**), probablemente debida a la oxidación de estos ácidos grasos. Dicha disminución fue de aproximadamente un 6 % con respecto a los ácidos grasos totales. Cabe señalar que dicha disminución fue comparable a la registrada durante el almacenamiento refrigerado cuando se había alcanzado el máximo número de TBA ( $t = 6$  días). Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados presentaron un aumento relativo en sus proporciones como consecuencia del descenso en la proporción de los ácidos



correspondiente a los triglicéridos.

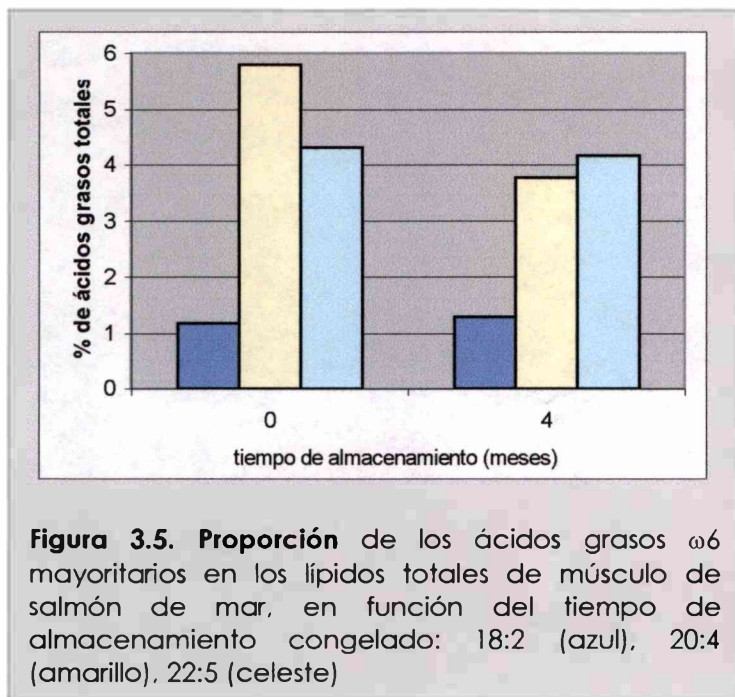
Además, se analizó la variación en la composición cuantitativa de las fracciones ω3 y ω6. Los resultados obtenidos en la fracción ω3 pueden observarse en la **Figura 3.4**. El ácido graso 22:6 ω3 (DHA) presentó una disminución importante en su contenido (aproximadamente 8 %). Los ácidos 20:5 ω3 y 22:5 ω3 mostraron también una reducción en sus proporciones (4 y 0,5 % de los ácidos grasos totales, respectivamente), lo cual sugiere que podrían haber sufrido degradación oxidativa. En este caso se observan algunas diferencias con respecto al músculo refrigerado, ya que durante dicho almacenamiento sólo se



ω3. Dicho comportamiento no se observó en los ácidos ω6, lo que sugeriría que estos compuestos también podrían haber sido afectados por la oxidación.

Al igual que en el caso del almacenamiento refrigerado, la reducida disminución de los ácidos grasos poliinsaturados sugieren que la fracción involucrada en el proceso de oxidación sería la

registraron alteraciones en el ácido 22:6  $\omega$ 3.



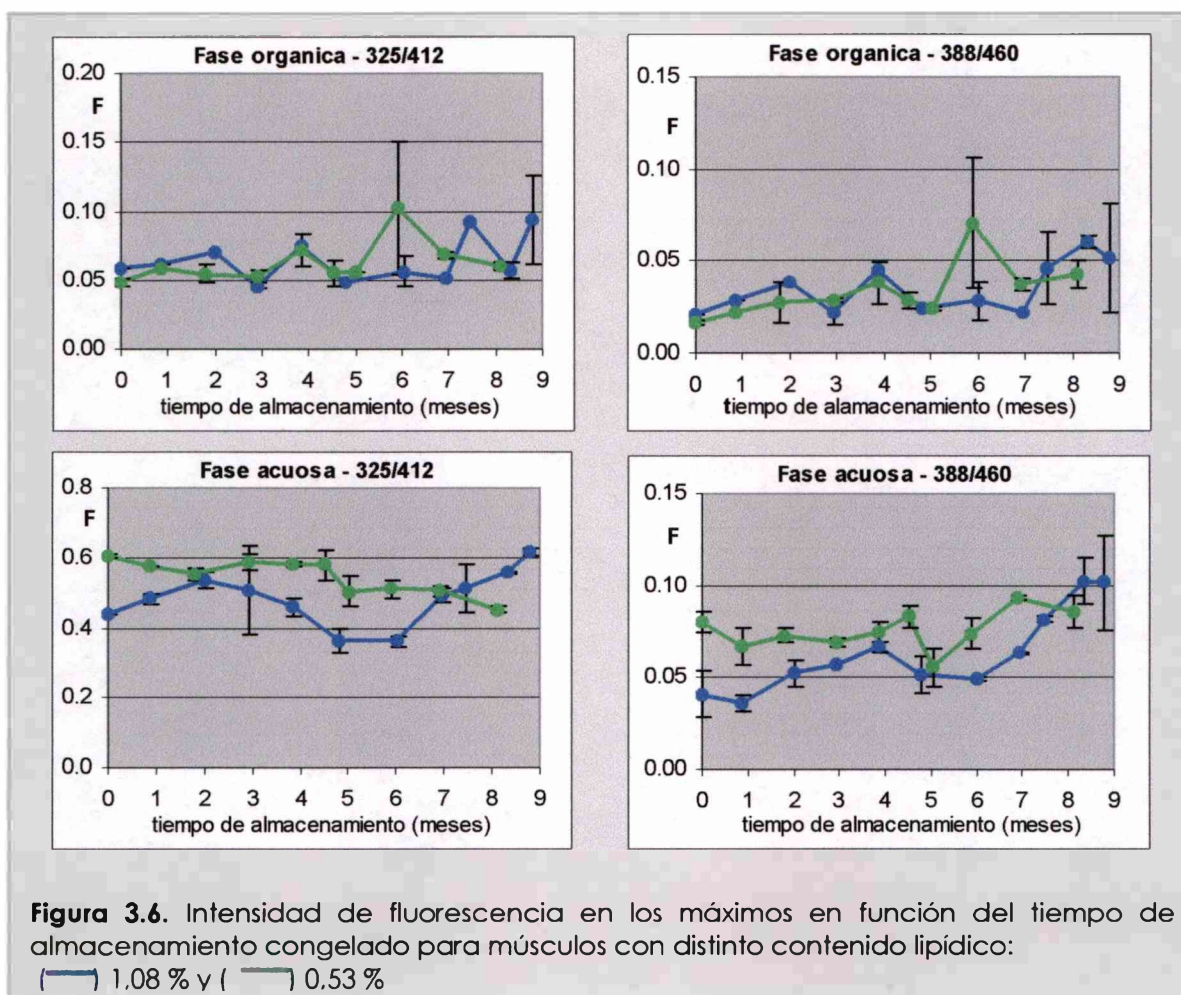
La fracción  $\omega$ 6 presentó un descenso en su contenido de ácido 20:4 (araquidónico) de alrededor de un 2 % luego de 4 meses de almacenamiento congelado (Figura 3.5.). En este caso también existe una diferencia con respecto al músculo refrigerado, ya que en aquél no se registraron modificaciones en esta fracción.

El ácido araquidónico es un ácido muy abundante en la fracción de fosfolípidos. En función de ello podría sugerirse una relación entre la hidrólisis de los fosfolípidos, la cual liberaría dicho ácido graso, y la oxidación del mismo. Sin embargo, esta hipótesis no puede ser confirmada mediante los presentes estudios.

### 3.3.3. Compuestos fluorescentes

Al igual que en el ensayo de TBA, se tomaron dos muestras al azar a fin de realizar la detección de compuestos fluorescentes. Se registraron los espectros de emisión con excitación a 325 nm y a 388 nm, tanto en la fase acuosa como en la orgánica, a partir de los cuales se obtuvieron los valores correspondientes a los máximos de excitación/emisión antes determinados (sección 2.3.4.1. - **Resultados y Discusión - Capítulo 2**) en función del tiempo de almacenamiento. En la Figura 3.6. se presentan los resultados obtenidos en músculos con distinto contenido lipídico. Como puede observarse, la evolución general de los compuestos fluorescentes fue similar para ambos músculos.

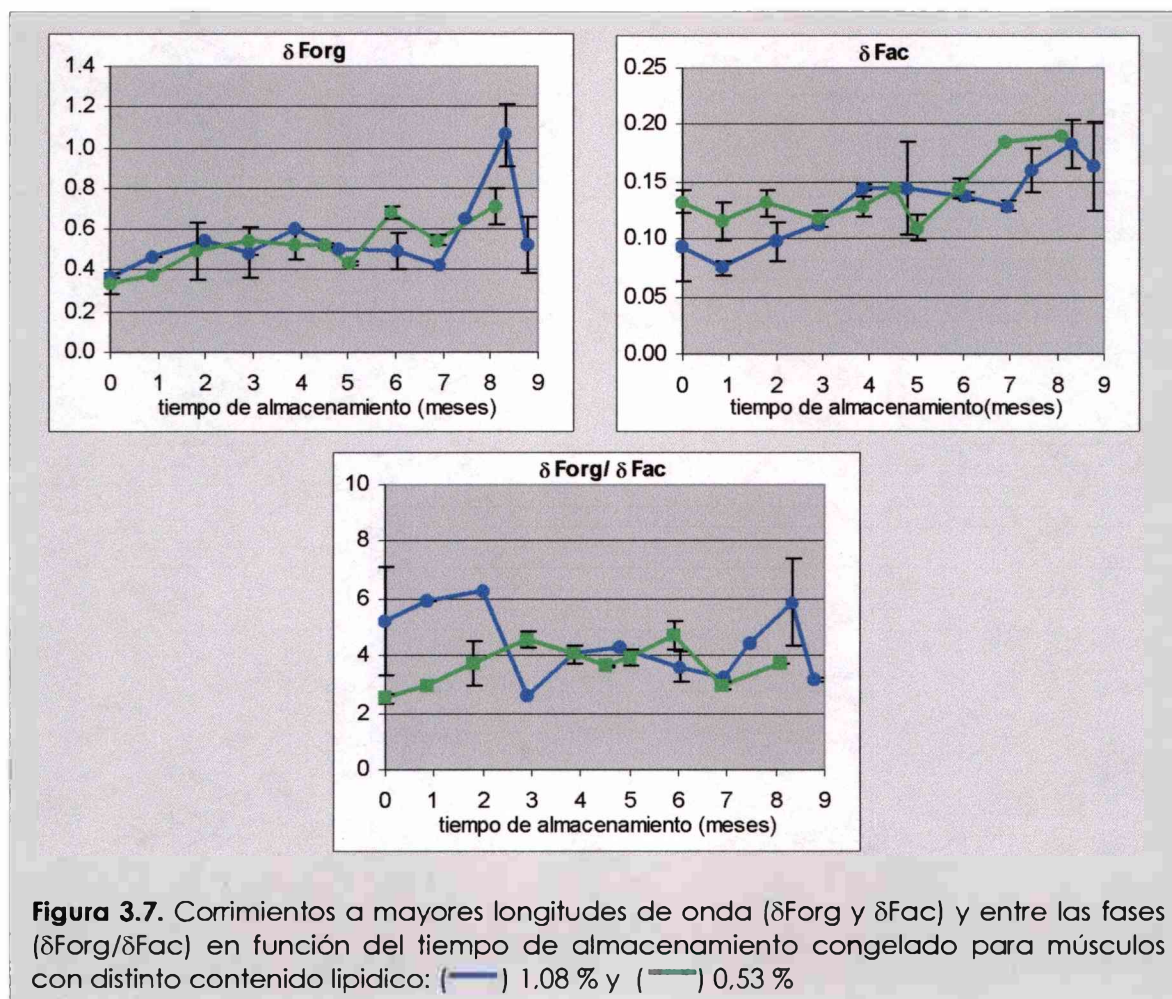




La fase orgánica no mostró variaciones significativas en su fluorescencia a 325/412 a lo largo de todo el almacenamiento, observándose sólo pequeños aunque estadísticamente significativos aumentos ( $p < 0,05$ ) a 7,5 y 9 meses de almacenamiento para el músculo con mayor contenido lipídico. La fluorescencia a 388/460 se comportó de manera similar presentando valores mayores ( $p < 0,05$ ) a partir de los 7,5 meses en el mismo caso.

En fase acuosa, la fluorescencia a 325/412 presentó una disminución a partir del quinto mes en ambos casos. En el músculo con mayor contenido lipídico aumentó nuevamente a partir de los 7,5 meses. A 388/460 se observó un leve aumento de la fluorescencia hacia el final del almacenamiento, el cual fue significativo en el caso del músculo con mayor contenido lipídico ( $p < 0,05$ ).

Los corrimientos a mayor longitud de onda  $\delta\text{Forg}$  y  $\delta\text{Fac}$  así como el corrimiento entre las fases  $\delta\text{Forg}/\delta\text{Fac}$  fueron calculados, pudiendo ser observados en la **Figura 3.7**.



El  $\delta\text{Forg}$  mostró un aumento progresivo en función del tiempo de almacenamiento congelado, siendo significativo ( $p < 0,05$ ) a partir de los 2 meses para el músculo con menor contenido lipídico y a 7,5 y 8,5 meses en el caso del músculo con mayor contenido de lípidos, para disminuir posteriormente. Este comportamiento es comparable al observado durante el almacenamiento refrigerado, donde también se evidenció un aumento y posterior descenso en este parámetro.

El  $\delta\text{Fac}$  presentó una tendencia al aumento en función del tiempo de almacenamiento congelado, el cual fue significativo ( $p < 0,05$ ) a partir de los 4

meses para el músculo con mayor contenido lipídico y de los 7 meses para el de menor contenido.

En cuanto al  $\delta\text{Forg}/\delta\text{Fac}$ , se observó una dispersión muy importante de este parámetro en función del tiempo, principalmente durante el almacenamiento del músculo con mayor contenido lipídico, no presentando una tendencia definida en función del avance del deterioro.

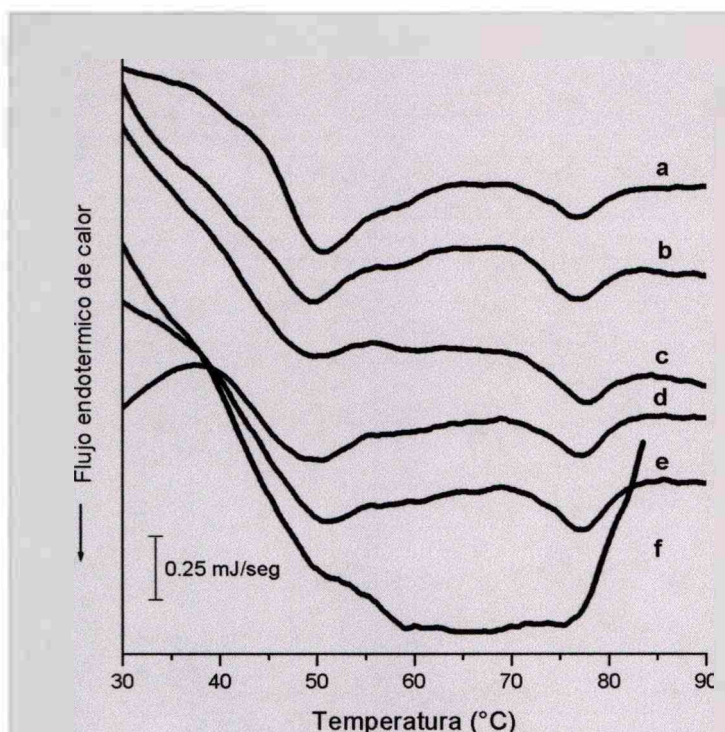
Los resultados obtenidos son comparables a los informados en literatura para otras especies magras. En polaca (*Micromesistius poutassou*) almacenada congelada a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se observó un aumento en el  $\delta\text{Forg}$  que comienza a los 5 meses de almacenamiento, con un máximo a los 7 meses; mientras que el  $\delta\text{Fac}$  presentó un incremento a los 7 meses con un máximo a los 9 meses (Aubourg, 1999b). En músculo de eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) almacenado a la misma temperatura (Aubourg y Medina, 1999), el  $\delta\text{Forg}$  comenzó a aumentar su valor a los 7 meses de almacenamiento mostrando un máximo a los 9 meses, y el  $\delta\text{Fac}$  se incrementó a los 9 meses. Por otra parte, en músculo de bacalao (*Gadus morhua*), el  $\delta\text{Forg}$  aumentó a los 7 meses y luego disminuyó mientras que el  $\delta\text{Fac}$  también comenzó a aumentar a los 7 meses de almacenamiento a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Aubourg y Medina, 1999).

Es notable la diferencia en la evolución de los compuestos fluorescentes que presentan las especies grasas con respecto a las magras. En un estudio realizado en sardinas (*Sardina pilchardus*) congeladas se observó un aumento significativo del  $\delta\text{Forg}$  a los 10 días de almacenamiento mientras que el  $\delta\text{Fac}$  aumentó significativamente a los 60 días (Aubourg y col., 1998). Cabe aclarar que en este caso, a los 10 días de almacenamiento a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  el número de TBA alcanzado era superior al máximo registrado para el salmón de mar u otras especies magras.

### **3.3.4. Modificaciones de la fracción proteica**

#### **3.3.4.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

Se analizaron muestras de músculo de salmón de mar congelado a fin de evidenciar posibles modificaciones en la estructura de las proteínas constituyentes. En la **Figura 3.8.** se muestran los termogramas obtenidos para distintos tiempos de almacenamiento en comparación con el correspondiente al músculo fresco.



**Figura 3.8.** Termogramas DSC de músculo de salmón de mar, para distintos tiempos de almacenamiento congelado: **a)** músculo fresco; **b)** 1 mes; **c)** 2 meses; **d)** 3 meses; **e)** 4 meses; **f)** 6 meses

El almacenamiento a  $-11$  °C produjo modificaciones en los perfiles térmicos de las proteínas musculares. Luego de un mes de almacenamiento, fue posible observar una menor temperatura de onset,  $T_o$ , para el pico de miosina (**Tabla 3.1**), evidenciando una pérdida de estabilidad térmica. Sin embargo, la temperatura de pico  $T_{máx}$ , se mantuvo constante en los primeros 4 meses de almacenamiento. Además, se hizo más evidente la presencia de un "hombro" en la zona de los 60 °C en función del tiempo de almacenamiento. La actina no presentó cambios en su temperatura de desnaturalización (**Tabla 3.1**).

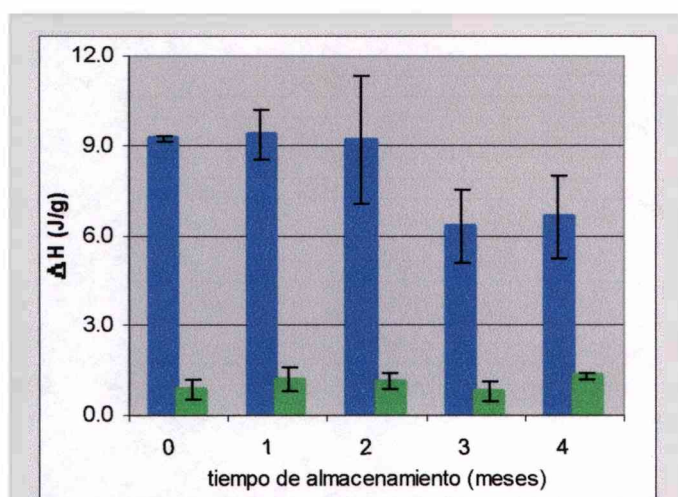
en la zona de los 60 °C en función del tiempo de almacenamiento. La actina no presentó cambios en su temperatura de desnaturalización (**Tabla 3.1**).

A los 6 meses de almacenamiento congelado, el músculo de salmón de mar presentó termogramas con notorias modificaciones, en los cuales no pueden diferenciarse los picos característicos de miosina y actina (**Figura 3.8.e.**).

**Tabla 3.1.** Temperaturas de onset y de desnaturalización de miosina y actina en función del tiempo de almacenamiento congelado

Tiempo (meses)	To (°C)	Tmio(°C)	Tact(°C)
0 (fresco)	42,8 ± 0,4	50,7 ± 0,04	76,8 ± 0,2
1	37,8 ± 0,9	49,7 ± 0,5	77,5 ± 0,9
2	38,2 ± 1,5	49,7 ± 0,3	76,9 ± 0,9
3	38,0 ± 2,1	49,6 ± 1,2	77,9 ± 0,4
4	38,3 ± 1,2	50,3 ± 0,7	77,2 ± 0,3

La entalpía de desnaturalización de la miosina también se vio afectada por el almacenamiento congelado. Este parámetro se mantuvo constante durante los



**Figura 3.9.** Entalpías de desnaturalización de miosina (barras azules) y actina (barras verdes) en función del tiempo de almacenamiento congelado

primeros 2 meses de almacenamiento, presentando una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) al tercer mes del mismo (Figura 3.9.). No se observaron diferencias entre el tercer y cuarto mes. La entalpía de desnaturalización de la actina no presentó variaciones significativas durante los primeros 4 meses de almacenamiento.

Estos resultados sugieren que a partir del tercer mes de almacenamiento, la estructura de la miosina sufre un proceso de desnaturalización. Según los valores de la entalpía de desnaturalización de esta proteína, se alcanzó un nivel de desnaturalización de aproximadamente el 30 % al tercer mes de almacenamiento.

Como ya se mencionó anteriormente los termogramas correspondientes al sexto mes de almacenamiento no mostraron picos definidos, por lo cual no se presentan aquí datos de las correspondientes entalpías de desnaturalización. Sin embargo, no puede descartarse la presencia de proteínas distintas de miosina y

actina, que aún permanezcan en estado nativo luego de este tiempo de almacenamiento congelado (**Figura 3.8.e.**).

Estudios realizados en otras especies pesqueras (bacalao y tilapia) congeladas y almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  mostraron una disminución de la  $T_{\text{máx}}$  de la miosina, sin cambios en la temperatura de desnaturalización de la actina. La entalpía de desnaturalización de la miosina disminuyó en una magnitud similar para ambas especies (30-40 % de desnaturalización) (Poulter y col., 1985). En músculo de bacalao almacenado a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  se observaron cambios en los termogramas a las 2 semanas de almacenamiento, sin cambios importantes después de ese período (Hastings y col., 1985). El pico correspondiente a la desnaturalización de la miosina, agudo en músculo sin congelar, se transformó en un pico más ancho, desdoblado, con una nueva transición a menor temperatura. Sin embargo, en la misma especie almacenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se registraron modificaciones similares a lo largo de 30 semanas de almacenamiento (Davies y col., 1994).

Resultados similares fueron obtenidos mediante estudios de DSC de miofibrillas aisladas a partir de músculos almacenados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Howell y col., 1991). Distintas especies presentaron un ensanchamiento del pico de miosina indicando una pérdida de cooperatividad; aunque los cambios ocurrieron más lentamente en pescados tropicales que en pescados de aguas frías.

Los resultados mostrados para músculo de salmón de mar correlacionan bien con el comportamiento general de las proteínas de pescado congeladas, donde la principal alteración es un ensanchamiento del pico de miosina con una temperatura de onset inferior. Este comportamiento evidencia que, probablemente, una región de la molécula de miosina fue alterada aumentando su sensibilidad térmica. Es posible que la región más alterada –por lo menos al inicio del almacenamiento- corresponda al dominio S1 o cabeza de la miosina, ya que esta región ha sido asociada a la transición de menor temperatura del pico de miosina, mientras que la transición de mayor temperatura correspondería a la cola (Wagner y Añón, 1986a). Además, se comprobó una pérdida de la estructura nativa de la miosina durante el almacenamiento congelado.

Sin embargo, en ninguno de los estudios anteriormente mencionados se observaron modificaciones tan drásticas en los termogramas tales como las observadas a los 6 meses de almacenamiento del músculo de salmón de mar. Una posible causa de estas diferencias es que en el presente trabajo el músculo fue picado y luego congelado y almacenado mientras que en los otros casos se almacenó músculo entero. Es posible que dicho procesamiento y el almacenamiento en esas condiciones favorezca el proceso de deterioro de la estructura proteica.

La actina no mostró modificaciones en función del tiempo de almacenamiento congelado. Estas observaciones están de acuerdo con los otros estudios de DSC anteriormente comentados y además, con otros análisis realizados en proteínas de músculo de bacalao almacenado a  $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Matsumoto, 1979). Dichos análisis mostraron que la actina permaneció sin modificaciones luego de un almacenamiento de 30 semanas a dicha temperatura, basándose en estudios de diferentes propiedades fisicoquímicas tales como la viscosidad intrínseca, la capacidad de combinación de la miosina y su comportamiento frente a la ultracentrifugación.

#### **3.3.4.2. Proteína extraíble total y proteínas miofibrilares solubles**

Se analizaron los cambios en la solubilidad de las proteínas musculares durante el almacenamiento congelado, mediante la determinación de la concentración de proteínas en la fracción de proteínas extractables totales (PT) y en la fracción de proteínas miofibrilares solubles (PM).

A fin de evaluar si el proceso de congelación en sí mismo afectaba a las proteínas desde el punto de vista de su solubilidad, se realizaron las determinaciones en músculo fresco y en músculo inmediatamente descongelado luego de la congelación (no almacenado en estado congelado). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el músculo fresco y el congelado y descongelado tanto para el extracto de proteínas totales como para el de proteínas miofibrilares.

Estos resultados están de acuerdo con datos de la literatura. Diversos estudios mostraron que cuando se congelaba músculo de pescado de manera rápida y se descongelaba inmediatamente no se producían cambios significativos en la solubilidad de las proteínas (Love, 1967). Otros trabajos han demostrado que se obtienen valores de solubilidad proteica similares congelando a distintas velocidades y descongelando inmediatamente, tanto en músculo de pescado (Ironsides y Love (1958), Connell (1962), Anderson y Ravesi (1970)) como en músculo de bovino (Wagner, 1986).

Como ya se mencionó en el **Capítulo 2** (sección 2.3.5.2.) los valores de proteínas extraíbles en músculo de salmón de mar fresco fueron muy bajos con respecto a lo esperado, fundamentalmente por una baja extractabilidad de las proteínas miofibrilares. En el caso de los ejemplares de salmón de mar utilizados para realizar los almacenamientos congelados, este hecho fue observado nuevamente, aunque se encontraron diferencias entre diferentes ejemplares analizados. Por una parte, en individuos de 2,2 - 3,5 kg se determinaron los siguientes valores de proteínas solubles, los cuales fueron similares a los informados anteriormente en el **Capítulo 2**:

Fracción	g proteínas solubles/ 100 g músculo	g proteínas solubles/ 100 g proteínas totales
PT	7,4 ± 0,2	42,1 ± 0,9
PM	1,6 ± 0,04	9,5 ± 0,2
PS	5,7 ± 0,1	32,7 ± 0,7

La relación PM/PT en este caso fue de 22,4 ± 0,1 %.

Sin embargo, determinaciones realizadas en un ejemplar de mayor tamaño (11 kg) arrojaron los siguientes resultados:

Fracción	g proteínas solubles/ 100 g músculo	g proteínas solubles/ 100 g proteínas totales
PT	14,4 ± 0,5	77,2 ± 2,9
PM	6,7 ± 0,2	36,0 ± 1,3
PS	7,7 ± 0,4	41,2 ± 2,2

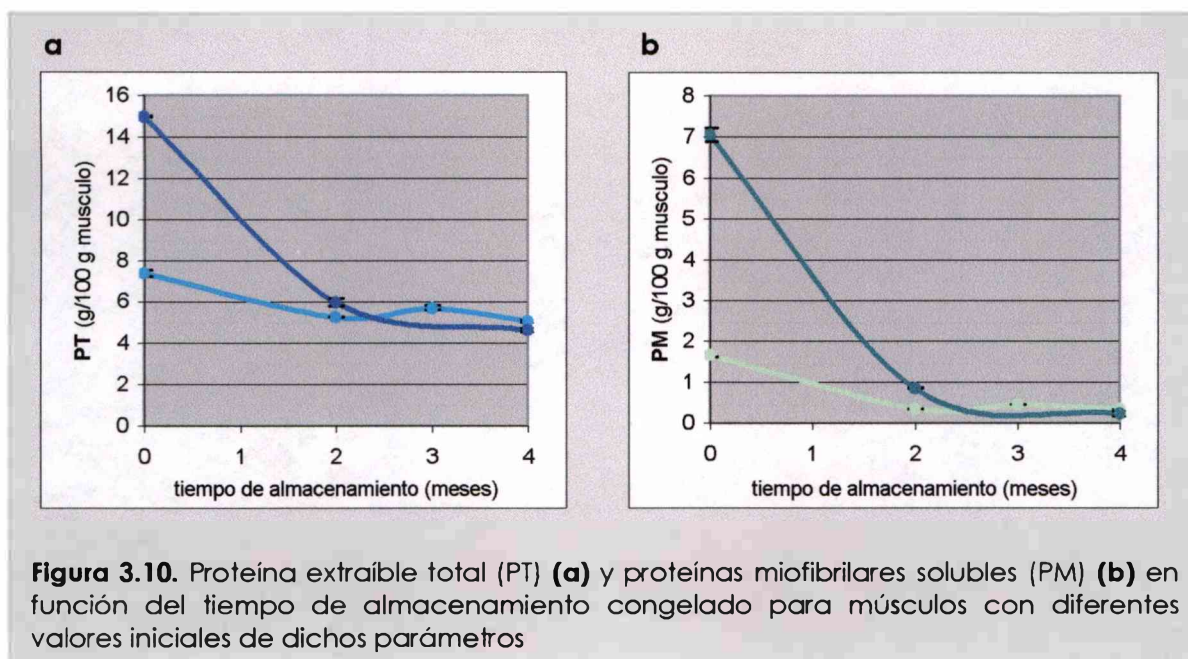


Como puede observarse, alrededor de un 77 % de las proteínas totales fueron solubilizadas con la solución salina lo cual constituye casi el doble de la proporción solubilizada en el caso anterior. La relación de proteínas miofibrilares solubles a proteínas totales solubles PM/PT fue de  $46,7 \pm 1,3$ , muy superior también a la hallada anteriormente. Estas diferencias indican una mayor solubilización de las proteínas miofibrilares, lo cual sugiere diferencias en el estado conformacional de dichas proteínas en el músculo al inicio del almacenamiento.

Dichas diferencias podrían estar asociadas a distintos factores tales como la edad de los ejemplares, el contenido lipídico (mucho mayor en el ejemplar de mayor tamaño) y las interacciones lípidos-proteínas, así como también la manipulación previa antes de la llegada al laboratorio. Otros factores que afectan la solubilización de las proteínas musculares son: el estado de pre o post-desove y post-migración, el estado de rigor mortis, el stress pre-captura y el estado nutricional (Contreras Guzmán, 2002; Leinot y Cheftel, 1990). No obstante, no es posible precisar una causa que justifique la baja solubilidad de las proteínas del músculo de salmón de mar fresco detectada en todas las muestras analizadas.

Por otra parte, se evaluó el efecto del almacenamiento en estado congelado sobre la solubilidad proteica. A fin de analizar la influencia de la solubilidad inicial sobre la evolución de este parámetro durante el almacenamiento congelado, en la **Figura 3.10.** se compara la concentración de proteínas en la fracción PT (**Figura 3.10.a.**) y en la fracción PM (**Figura 3.10.b.**) durante los primeros cuatro meses de almacenamiento de los músculos anteriormente caracterizados. Como puede observarse, la solubilidad de la fracción PT así como de la PM alcanzaron valores comparables luego de 2 meses de almacenamiento a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ , los cuales se mantuvieron constantes posteriormente. Por lo tanto, durante los 2 primeros meses del almacenamiento ocurriría un proceso de agregación e insolubilización que afectaría a un amplio porcentaje de las proteínas miofibrilares solubles antes de la congelación.

Cabe aclarar que fue necesario realizar algunas modificaciones al método anteriormente descrito para la obtención de las fracciones PT y PM (sección **2.2.9.**), dada la baja concentración proteica existente en la fracción de proteínas miofibrilares. Para poder detectar estas proteínas se partió de un mayor volumen

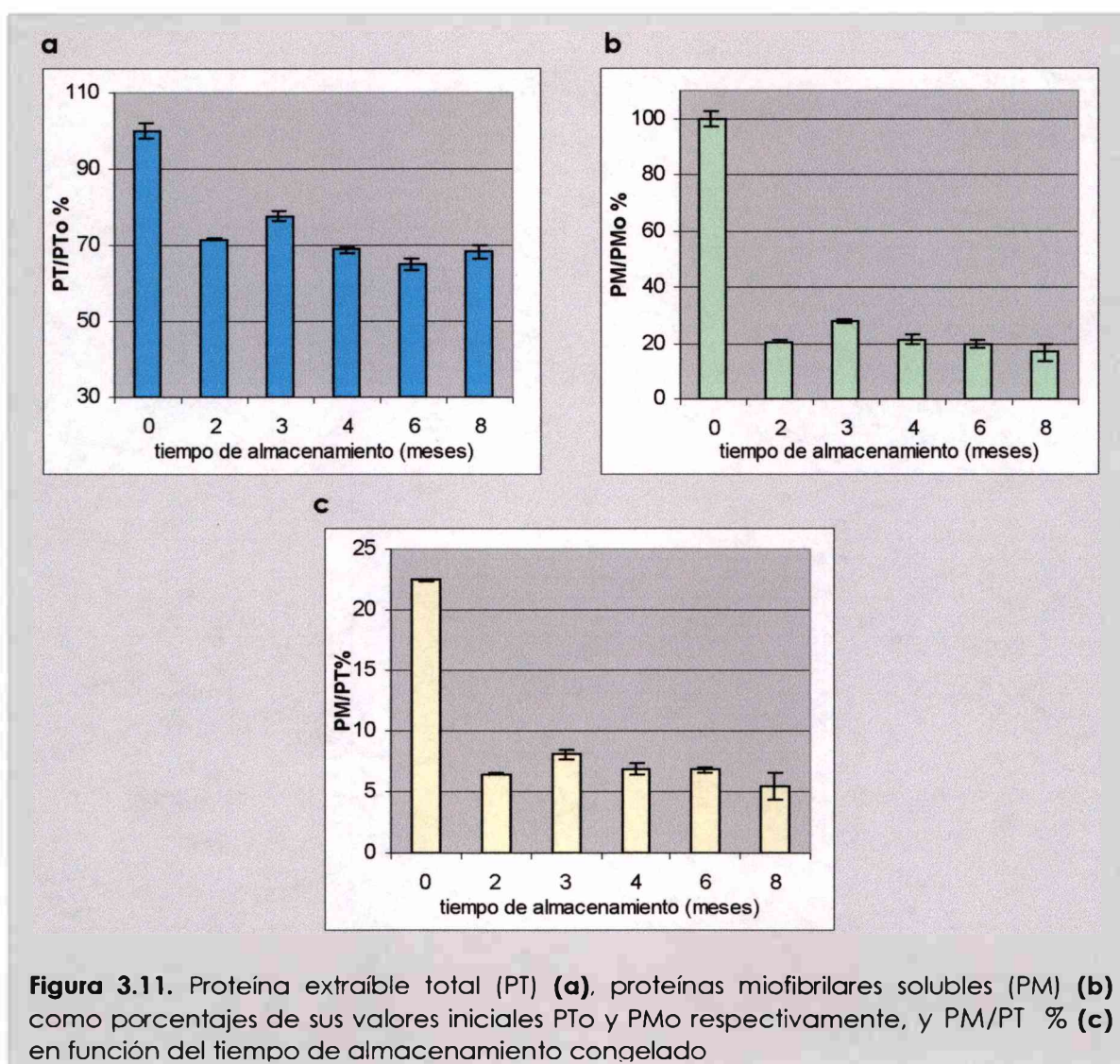


de extracto total (20,00 ml en lugar de 10,00 ml), realizando la resuspensión final en un volumen menor (2,00 ml en lugar de 5,00 ml).

En la **Figura 3.11.** se muestra la evolución de la concentración de PT y PM como porcentajes con respecto a sus valores iniciales, así como la relación PM/PT a lo largo de un mayor tiempo de almacenamiento para el músculo de menor solubilidad inicial, a fin de poder evidenciar más claramente el nivel de alteración proteica. La solubilidad de las PT mostró una disminución cercana a un 30 % en los 2 primeros meses de almacenamiento, sin variaciones importantes posteriormente (**Figura 3.11.a.**). Dicha variación se produjo a expensas de una drástica disminución de la solubilidad de las PM, las cuales presentaron a los 2 meses de almacenamiento una solubilidad remanente de alrededor de un 20 % del valor inicial. Estos valores de solubilidad de las PM se mantuvieron aproximadamente constantes durante los meses posteriores de almacenamiento congelado (**Figura 3.11.b.**).

La **Figura 3.11.c.** muestra el descenso en la relación PM/PT paralelo a la disminución de la solubilidad de las PM, evidenciando que ésta es la fracción proteica principalmente afectada por el almacenamiento congelado.

Existen en literatura muchos estudios que demuestran una pérdida de solubilidad de las proteínas musculares por el almacenamiento congelado. En



1937, Reay y col. mostraron que durante el almacenamiento congelado de eglefino, las proteínas solubles en sal se hacían insolubles mientras que las solubles en agua (sarcoplásmicas) no eran afectadas; mientras que una correlación entre el deterioro de las propiedades organolépticas en pescado congelado y la desnaturalización de la miosina fue demostrada por Dyer (1951) (tomado de Matsumoto, 1979).

En diversos estudios en especies variadas, se ha demostrado que las proteínas miofibrilares pero no las sarcoplásmicas, son alteradas durante el almacenamiento congelado de músculo de pescado, haciéndose insolubles (Awad y col., 1969).

En un estudio realizado en bacalao almacenado a  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , no se observaron cambios en la solubilidad de las proteínas miofibrilares en las primeras 4 semanas, registrándose una caída de dicho parámetro (de 65 a 30 %) en las 4 semanas subsiguientes (Dyer y col, 1950). Resultados similares han sido informados para una especie de agua dulce almacenada a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Awad y col, 1969). Badii y Howell (2002) mostraron una disminución de la solubilidad proteica en filetes de bacalao y eglefino en función del tiempo de almacenamiento congelado, siendo dicha disminución mayor y más rápida para filetes almacenados a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  con respecto a filetes almacenados a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

En otros estudios, se ha investigado la extractabilidad de la actomiosina natural (NAM) en NaCl 0,6 M a partir de filetes de bacalao y de merluza almacenados congelados a  $-20$  y  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , observándose al igual que en el caso anterior una mayor disminución de la solubilidad a temperaturas de almacenamiento más altas (Careche y col., 1998; del Mazo y col., 1999).

Si se compara la información obtenida mediante las determinaciones de solubilidad proteica con la proveniente de los análisis de DSC, puede observarse que no hay una correlación directa entre las alteraciones proteicas mostradas por ambos estudios. La caída importante en la solubilidad, lo cual implica la formación de agregados proteicos, se produjo en los 2 primeros meses de almacenamiento. Sin embargo, a ese tiempo de almacenamiento no se registraron variaciones en la entalpía de desnaturalización de las proteínas miofibrilares, fundamentalmente de la miosina, sugiriendo que dicha agregación no estaría involucrando una desnaturalización proteica significativa. Por el contrario, si se registró a ese tiempo una menor estabilidad térmica de la miosina. El cambio significativo en la entalpía de desnaturalización de la miosina ocurrió a los 3 meses de almacenamiento, sin variaciones adicionales de la solubilidad. Estos resultados no se correlacionan con los resultados informados por Wagner y Añón (1986b) en músculo bovino, donde se demostró que la desnaturalización de las proteínas miofibrilares ocurrió previamente a la formación de agregados insolubles. No puede descartarse en nuestro caso que los agregados puedan tener un comportamiento térmico diferente a las proteínas nativas no agregadas.

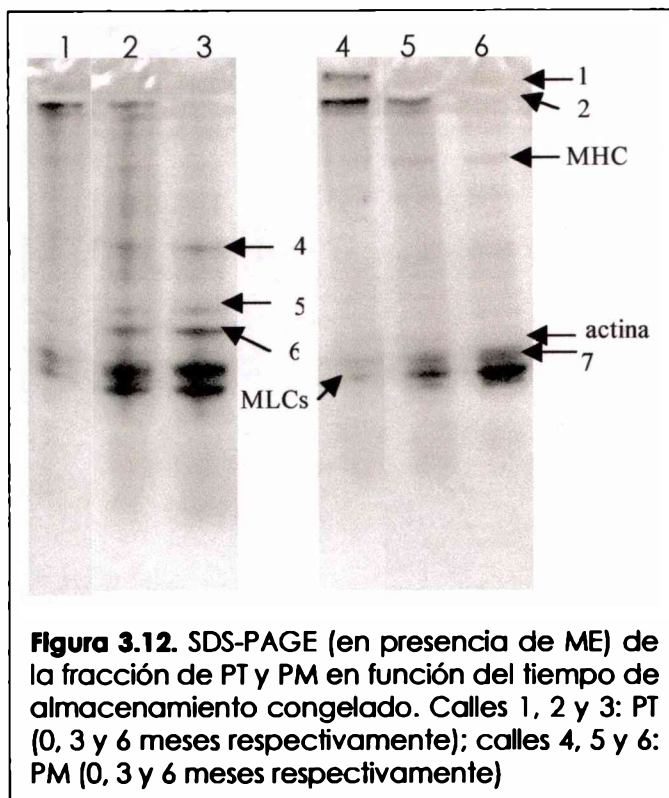
Por otra parte, es notable la drástica caída de la solubilidad que ocurre durante los 2 primeros meses de almacenamiento, ya que la información proveniente de otros estudios mencionados anteriormente muestra una disminución más progresiva de la solubilidad en función del tiempo de almacenamiento. Probablemente, el deterioro más rápido, podría estar relacionado con el hecho de haber almacenado músculo picado en lugar de filetes, tal como se sugirió anteriormente. También podría existir una vinculación entre el estado en que se encuentran las proteínas inicialmente en el músculo, que como se mostró presentaron una solubilidad muy baja, y la velocidad de alteración durante el almacenamiento congelado.

Como ha sido mencionado anteriormente, una posible causa de las alteraciones proteicas durante el almacenamiento congelado de pescado es la oxidación lipídica. Tratando de establecer una vinculación entre ambos procesos en el músculo de salmón de mar picado y almacenado a - 11 °C, podemos decir que la pérdida de solubilidad proteica ocurre en las primeras etapas (2 meses) del almacenamiento, donde el número de TBA está aumentando pero aún no alcanzó sus máximos valores. Paralelamente, a dicho tiempo de almacenamiento no se registraron modificaciones en los compuestos fluorescentes, principalmente en fase acuosa, como cabría esperar si hubiera ocurrido una interacción significativa entre los productos de oxidación y las proteínas.

#### **3.3.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Se analizaron las fracciones solubles mediante SDS-PAGE a fin de evidenciar posibles cambios en las especies proteicas presentes en cada fracción, dado el proceso de agregación anteriormente evidenciado. En la **Figura 3.12.** se muestran los perfiles obtenidos en muestras tratadas con SDS, urea y 2-ME, sembrando igual masa de proteínas en todas las calles. Los perfiles obtenidos en ausencia de ME no otorgaron información adicional.

Los perfiles electroforéticos correspondientes a la fracción de proteínas totales (**Figura 3.12. – calles 1, 2 y 3**) muestran una disminución en la banda ubicada entre el gel apilador y el gel separador (*banda 2*) a los 3 meses de



almacenamiento, entre el gel apilador y el gel separador (banda 2) a los 3 meses de almacenamiento, prácticamente desapareciendo a los 6 meses. Idéntico comportamiento presentó la fracción de proteínas miofibrilares solubles (Figura 3.12. - calles 4, 5 y 6), dado que la banda 2 está constituida posiblemente por proteínas miofibrilares formando especies de alta masa molecular. En este caso, también fue evidente la desaparición de la banda que

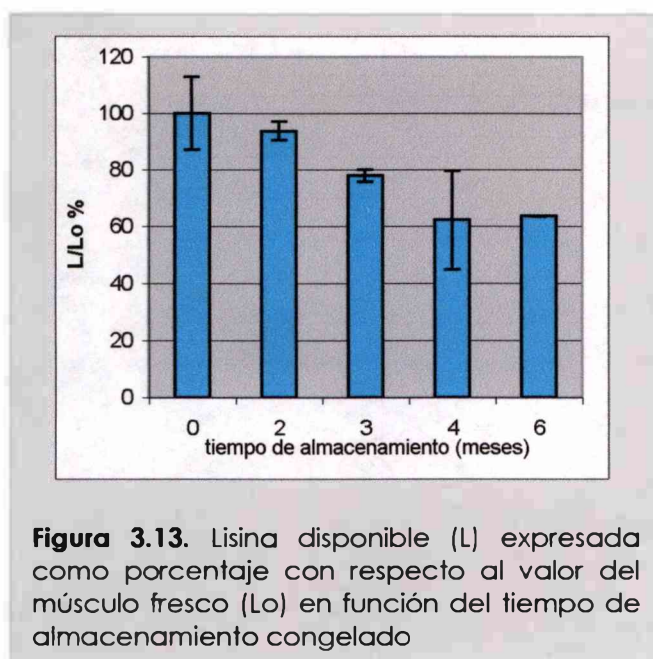
no ingresa al gel de stacking (banda 1) ya a los 3 meses de almacenamiento. Dado que en todas las calles se sembró el volumen de muestra necesario para tener similar masa de proteínas (30  $\mu\text{g}$ ), se registró un aumento de las bandas correspondientes a las proteínas que permanecieron solubles –fundamentalmente polipéptidos de baja masa molecular indicados como 4, 5, 6, 7 y cadenas livianas de miosina MLCs-, en función de la disminución de las especies proteicas insolubilizadas. La cadena pesada de miosina MHC presentó un leve aumento a los 3 meses de almacenamiento congelado, disminuyendo a los 6 meses.

El análisis de los geles de SDS-PAGE muestra que las especies proteicas involucradas en la formación de agregados insolubles durante el almacenamiento congelado, son fundamentalmente los polipéptidos de alta masa molecular que no ingresan al gel de electroforesis. La MHC y la actina también estarían involucradas en la formación de los agregados insolubles ya que, de lo contrario, su intensidad debería aumentar en los perfiles electroforéticos correspondientes al músculo almacenado, como ocurre con otras proteínas miofibrilares y con proteínas sarcoplásmicas no vinculadas con dicho proceso.

Estos estudios permitieron conocer cuáles son las proteínas responsables de la formación de agregados de gran tamaño insolubles en el músculo almacenado a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sin embargo, no dan información acerca del tipo de interacciones involucradas en la agregación. Estudios realizados en bacalao han demostrado que la naturaleza de los agregados cambia considerablemente según el tiempo y la temperatura de almacenamiento así como con el grado de integridad del músculo. De esta manera, en filetes de bacalao almacenados a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  los agregados están principalmente estabilizados por interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas), mientras que si el almacenamiento se realiza a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  una proporción de las interacciones son de tipo covalente, tanto puentes de tipo disulfuro como otras uniones covalentes. La proporción de enlaces de tipo covalente se incrementa en el caso de músculo picado almacenado congelado (Careche y col. , 1998). A fin de comprobar si estos resultados se registran en músculo de salmón de mar, sería interesante en un futuro realizar ensayos en los cuales se trate a la fracción proteica insoluble con buffers conteniendo distintos agentes caotrópicos (SDS, urea, 2-ME) y analizar el perfil electroforético de las proteínas que logran solubilizarse en cada una de ellos.

#### **3.3.4.4. Lisina disponible**

Se evaluó una posible pérdida de lisina disponible durante el almacenamiento congelado del músculo de salmón de mar, así como la formación de uniones covalentes a través de los grupos amino libres de los residuos de lisina. En la **Figura 3.13**. se muestran los resultados obtenidos. Cabe aclarar que no se registraron diferencias significativas entre el músculo fresco y el músculo congelado e inmediatamente descongelado, indicando que el proceso de congelación no tuvo efecto sobre el contenido de lisina disponible.



partir del tercer mes de almacenamiento (alrededor de un 20 %), siendo de aproximadamente un 40 % al sexto mes.

Como ya ha sido mencionado con anterioridad, una posible causa de disminución del contenido de lisina disponible es la interacción de los productos de oxidación lipídica con los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina. La lisina es uno de los aminoácidos más reactivos frente al malonaldehído en estado congelado (Buttkus, 1967). La variación de este parámetro a los 3 meses coincide con el momento en el cual el número de TBA se incrementa llegando a sus valores máximos, por lo cual sería posible dicha interacción.

Estudios realizados en arenque (*Clupea harengus*) almacenado a  $-8$  °C mostraron que a medida que el número de TBA aumentaba (alcanzando un valor máximo de 11 a los 25 días), el contenido de lisina disponible disminuía (Kuusi y col., 1975). Según dichos autores, a medida que la concentración de malonaldehído se eleva, los sitios de las moléculas proteicas capaces de reaccionar con esta sustancia son progresivamente ocupados. Finalmente, cuando todos los grupos amino libres han reaccionado, se hace dominante la interacción entre las proteínas, provocando una disminución de la solubilidad. De acuerdo con lo postulado por Buttkus (1967), la velocidad de esta reacción en estado congelado se vería incrementada, lo cual puede ser atribuido a un efecto



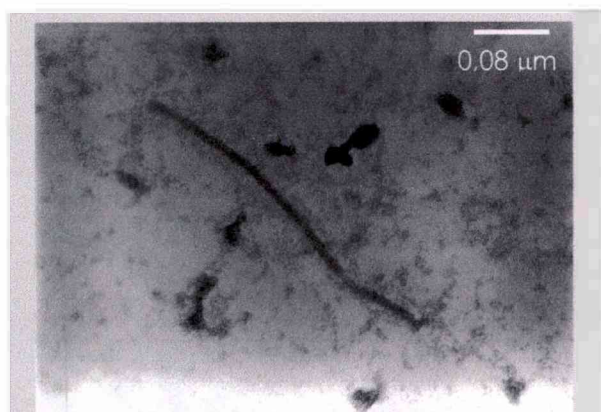
de la concentración de los reactantes y a un efecto catalítico que involucra a la estructura del hielo formado.

Sin embargo, en el caso del salmón de mar no podría aplicarse la teoría enunciada por Kuusi y col. (1975) (reacción de las proteínas con malonaldehído y posterior agregación) ya que, como se mostró anteriormente, la insolubilización proteica ocurre antes que la disminución del contenido de lisina disponible.

Es importante resaltar que la disminución de la lisina fue simultánea con el comienzo de la desnaturalización de la miosina evaluada mediante DSC, mientras que una posterior disminución ocurrió paralelamente con la pérdida total de estructura de la miosina (6 meses).

#### 3.3.4.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Tal como se determinó anteriormente, el almacenamiento congelado indujo en el músculo de salmón de mar una importante disminución en la

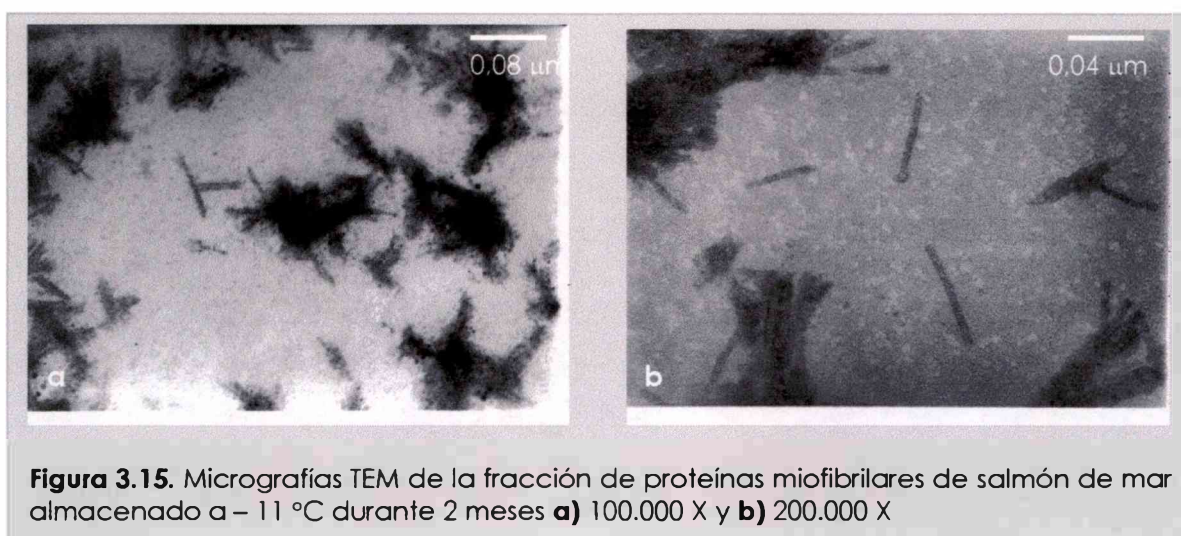


**Figura 3.14.** Micrografía TEM de la fracción de proteínas miofibrilares de músculo fresco mostrando un filamento característico (100.000 x)

solubilidad de las proteínas, especialmente en la fracción de proteínas miofibrilares. En función de estos resultados, se investigaron posibles cambios en la microestructura de dichas proteínas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Dicha técnica ya había sido utilizada para analizar las modificaciones estructurales ocasionadas por el malonaldehído en las proteínas miofibrilares en los

sistemas modelo (sección 1.3.5. - **Resultados y Discusión - Capítulo 1**).

En dicha sección, se informó que las proteínas miofibrilares de salmón de mar mostraban estructuras filamentosas -probablemente filamentos de actomiosina- tal como es posible observar en la **Figura 3.14**. Las micrografías obtenidas para proteínas miofibrilares extraídas de músculo que había sido



almacenado congelado durante 2 meses, se muestran en las **Figuras 3.15.a. y b** con distinta magnificación. Las imágenes obtenidas muestran que las proteínas miofibrilares se encuentran agregadas, formando estructuras que podrían caracterizarse como "paquetes" de filamentos. Dichas estructuras podrían estar formadas por los filamentos de actomiosina encontrados en el músculo fresco interaccionando entre sí. Las micrografías sugieren que, a pesar de la agregación, se conserva la estructura filamentosa original. Estas modificaciones difieren de las observadas en el caso de las proteínas miofibrilares tratadas con malonaldehído, donde además de producirse agregación, se observaron estructuras deformadas y plegadas. Los agregados mostrados en aquel caso fueron de mayor tamaño, presentando conformaciones totalmente diferentes que no se encuentran en las presentes micrografías, tales como las estructuras tipo "red" (sección **1.3.5. - Resultados y Discusión - Capítulo 1**). Estas diferencias encontradas en las estructuras sugieren diferentes mecanismos de agregación en ambos casos.

Es importante notar que las micrografías fueron obtenidas sobre la fracción de proteínas miofibrilares solubles, y que, probablemente, las modificaciones más importantes de las estructuras podrían encontrarse en el residuo proteico insoluble del músculo.

Jarenbäck y Lijemark (1975) analizaron el cambio en las estructuras de las proteínas miofibrilares extraídas y en los residuos miofibrilares de músculo de bacalao almacenado congelado mediante microscopía electrónica,

observando una disminución en el número de filamentos de actomiosina y un incremento en el número y tamaño de grandes agregados. Por otra parte, luego de la congelación e inmediata descongelación de músculo de carpa, los filamentos de actomiosina aparecen formando estructuras en forma de cruz. Después de un almacenamiento congelado por varias semanas, la estructura nativa se pierde y sólo aparecen agregados de filamentos entrecruzados al azar. Dichos filamentos agregados mostraron ser más finos y flexibles que los encontrados en el músculo no congelado, relacionándolos con filamentos de F-actina, mientras que otras partículas encontradas en las micrografías fueron atribuidas a masas agregadas de moléculas de miosina (Matsumoto, 1979).

#### 3.3.4.6. Textura del músculo

Durante la congelación y el almacenamiento congelado de pescado ocurren cambios en la textura del músculo, los cuales ocasionan un producto duro, fibroso y seco (Herrero y col., 2004). En virtud de ello, se analizaron los parámetros de textura del músculo picado de salmón de mar en función del tiempo de almacenamiento a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mediante un análisis de perfil de textura TPA. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 3.2**.

**Tabla 3.2.** Parámetros de textura TPA del músculo en función del tiempo de almacenamiento a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tiempo meses)	F (N)	E	C	A (N.sec)
0	$7,12 \pm 1,17$	$0,78 \pm 0,09$	$0,58 \pm 0,02$	$-0,78 \pm 0,16$
1	$6,15 \pm 0,42$	$0,82 \pm 0,004$	$0,69 \pm 0,007$	$-0,33 \pm 0,08$
2	$5,65 \pm 1,19$	$0,90 \pm 0,004$	$0,70 \pm 0,02$	$-0,40 \pm 0,41$
3	$6,07 \pm 0,37$	$0,92 \pm 0,04$	$0,69 \pm 0,02$	$-0,28 \pm 0,11$
4	$4,76 \pm 1,05$	$0,92 \pm 0,004$	$0,71 \pm 0,02$	$-0,59 \pm 0,09$
6	$2,15 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,02$	$-0,11 \pm 0,03$
7	$4,76 \pm 1,16$	$0,91 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,006$	$-0,30 \pm 0,21$

La firmeza de los discos de músculo picado de salmón de mar presentó una disminución en función del tiempo de almacenamiento congelado,

haciéndose significativa ( $p < 0,05$ ) a los 4 meses de almacenamiento. Estos resultados no estarían de acuerdo con el endurecimiento informado para el músculo de pescado como consecuencia del almacenamiento congelado (Matsumoto, 1979; Mackie, 1993). Tanto la elasticidad, E, como la cohesividad, C, presentaron un aumento a partir de 1 mes de almacenamiento congelado, mientras que la adhesividad no mostró cambios significativos.

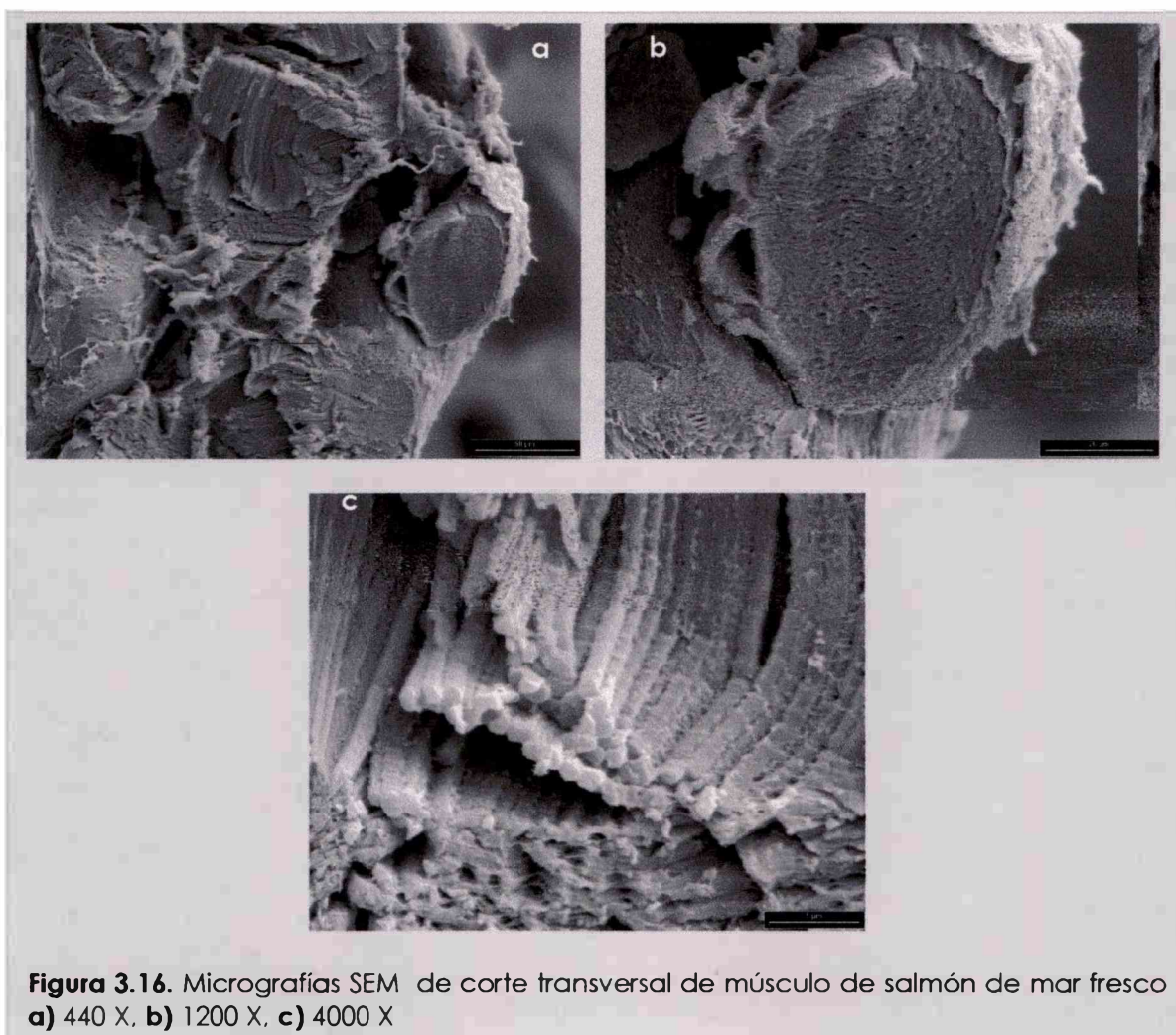
Por otra parte, la simple observación macroscópica y la manipulación de las muestras de músculo de salmón de mar congelado evidenciaron cambios notorios en la textura. El músculo fresco picado se presentaba como una especie de pasta, fácilmente manipulable, por ejemplo para armar los discos tipo hamburguesa. El músculo almacenado a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ , presentó porciones más compactas, con sectores separados entre sí. En este caso, revistió una mayor dificultad la realización de las tomas de muestras y la obtención de discos homogéneos a ser empleados en las determinaciones de textura. Esta falta de unión interna podría explicar los resultados registrados en cuanto a la firmeza de los discos.

#### **3.3.4.7. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) del músculo**

La microestructura del músculo de salmón de mar se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), a fin de evidenciar las alteraciones de la estructura muscular debidas a la congelación y/o el almacenamiento congelado.

La **Figura 3.16.a.** muestra el corte transversal de una fibra muscular, donde pueden apreciarse los haces de miofilamentos. En la **Figura 3.16.b.** se muestra un haz de miofilamentos con mayor detalle y en la **Figura 3.16.c.** pueden observarse los miofilamentos estriados.

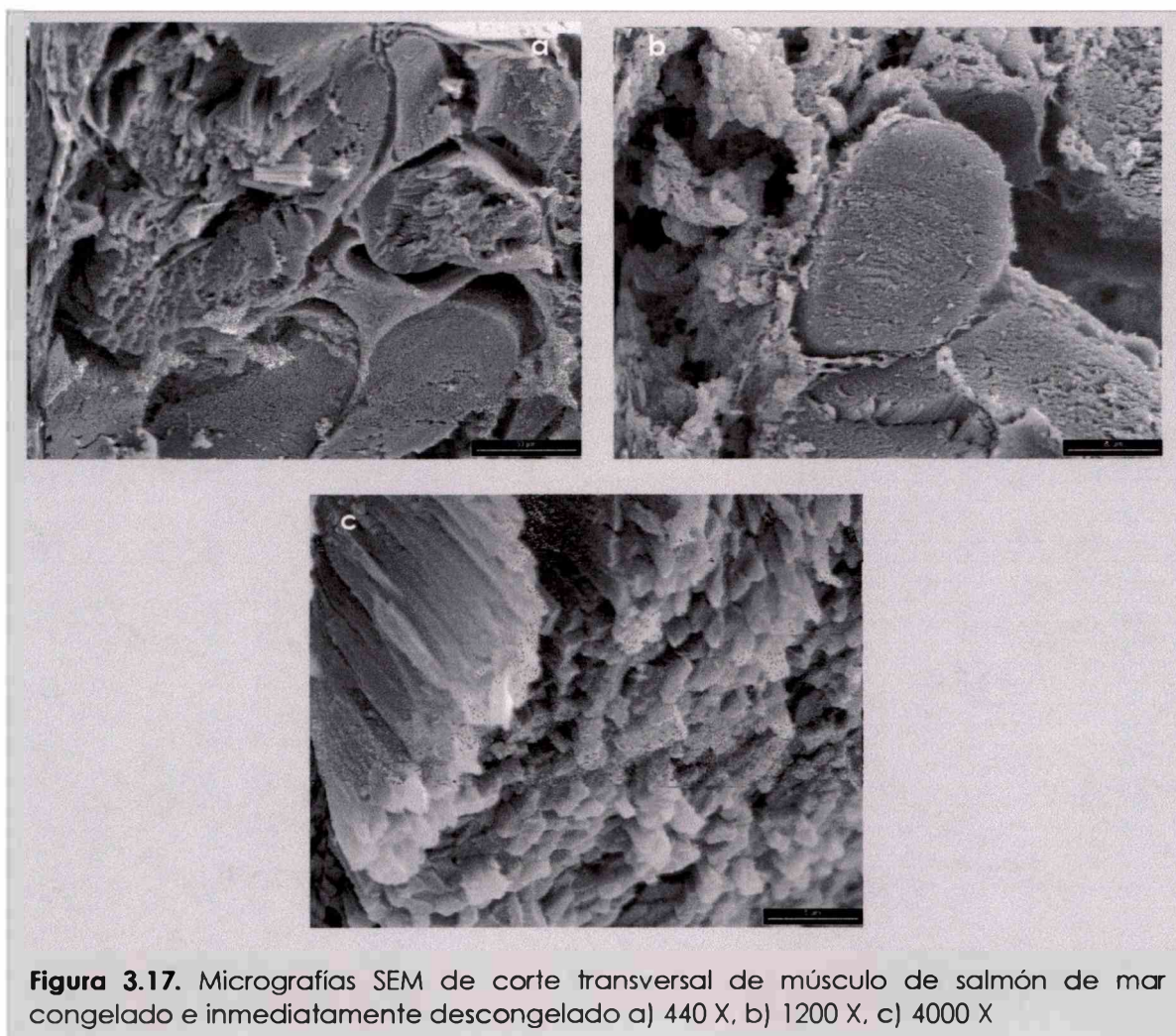
Si se observan imágenes análogas correspondientes al músculo congelado e inmediatamente descongelado (**Figura 3.17.**) pueden notarse algunas diferencias. Alrededor de los haces de miofilamentos se observan formaciones que no aparecían en el músculo fresco (**Figura 3.17.b**), las cuales podrían provenir de estructuras dañadas tales como membranas. En cuanto a los miofilamentos,



**Figura 3.16.** Micrografías SEM de corte transversal de músculo de salmón de mar fresco a) 440 X, b) 1200 X, c) 4000 X

éstos no presentan la estructura estriada característica y aparecen más unidos entre ellos (**Figura 3.17.c.**). En función de estas observaciones, podemos decir que el proceso de congelación podría haber producido algunas alteraciones en la estructura de la fibra muscular como así también en los miofilamentos.

A fin de investigar la influencia del almacenamiento congelado a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$  en la estructura del músculo de salmón de mar, se analizaron las micrografías correspondientes a 2 meses de almacenamiento, momento en el cual, tal como se determinó anteriormente se registró una importante disminución de la solubilidad proteica. En este caso, los haces de miofilamentos se encuentran más desorganizados, con algunos miofilamentos desprendidos y con ausencia del tejido que los envuelve (**Figura 3.18.a y b.**). Los miofilamentos muestran un arreglo diferente al del músculo fresco, apareciendo muy unidos entre sí como puede

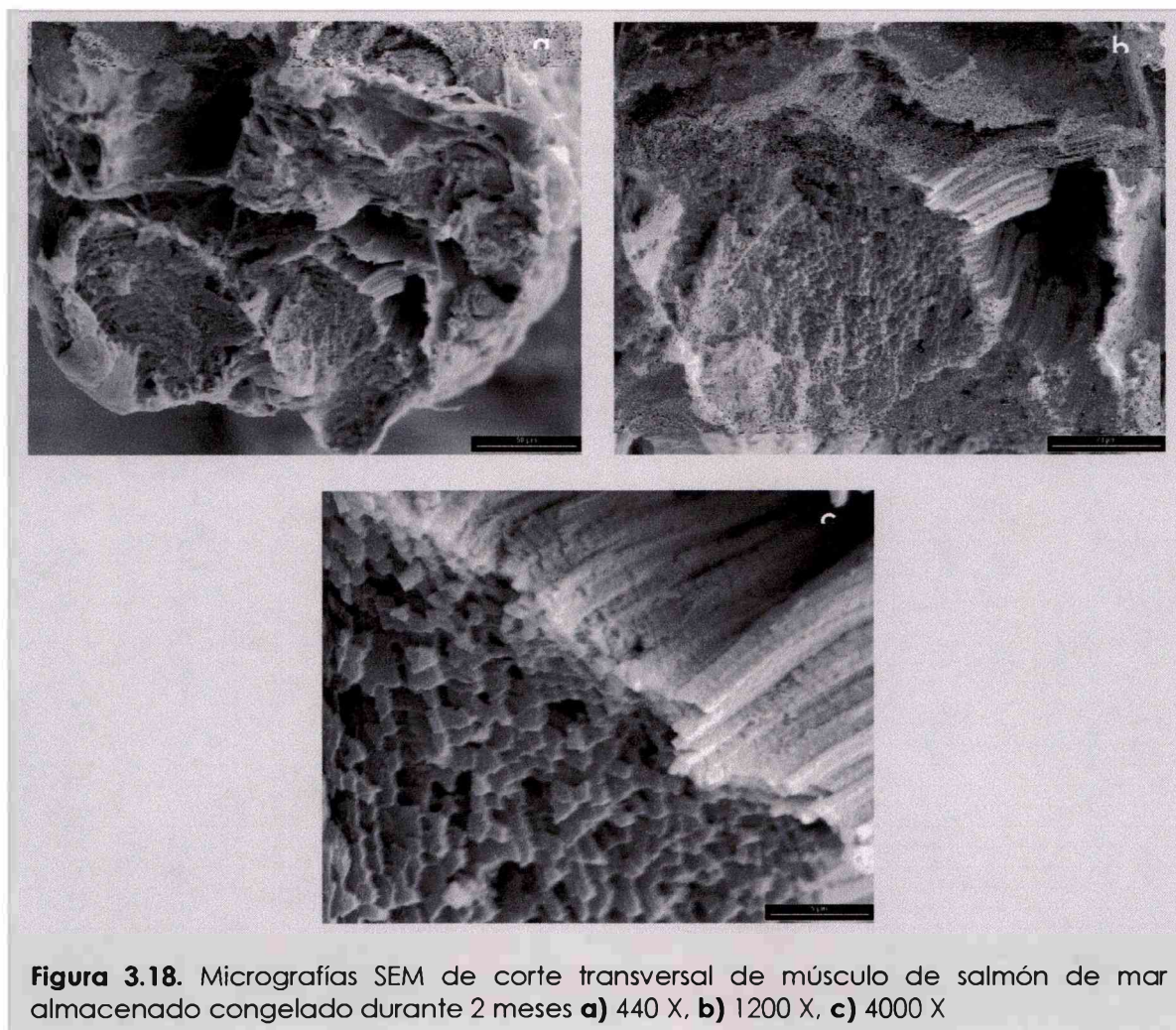


**Figura 3.17.** Micrografías SEM de corte transversal de músculo de salmón de mar congelado e inmediatamente descongelado a) 440 X, b) 1200 X, c) 4000 X

observarse en la **Figura 3.18.c**. En función de estas observaciones podemos decir que el almacenamiento congelado del músculo de salmón de mar produjo una ruptura de la estructura que envuelve los haces de miofilamentos y además, una agregación de los miofilamentos los cuales aparecen unidos, formando haces. Esta agregación podría explicar la pérdida de solubilidad observada en la fracción correspondiente a las proteínas miofibrilares.

#### **3.3.4.8. Funcionalidad proteica: Gelación térmica**

De la misma manera que para los almacenamientos refrigerados, se obtuvieron geles a partir de músculo lavado o "surimi" y se analizaron sus



propiedades texturales en función del tiempo de almacenamiento congelado del músculo utilizado como materia prima. Es de esperar que las importantes modificaciones observadas en la estructura y solubilidad de las proteínas miofibrilares tengan una notoria incidencia en las propiedades de los geles.

En la **Tabla 3.3.** se presentan los resultados obtenidos para los distintos parámetros de textura. Los geles no presentaron adhesividad al igual que en los casos anteriores.

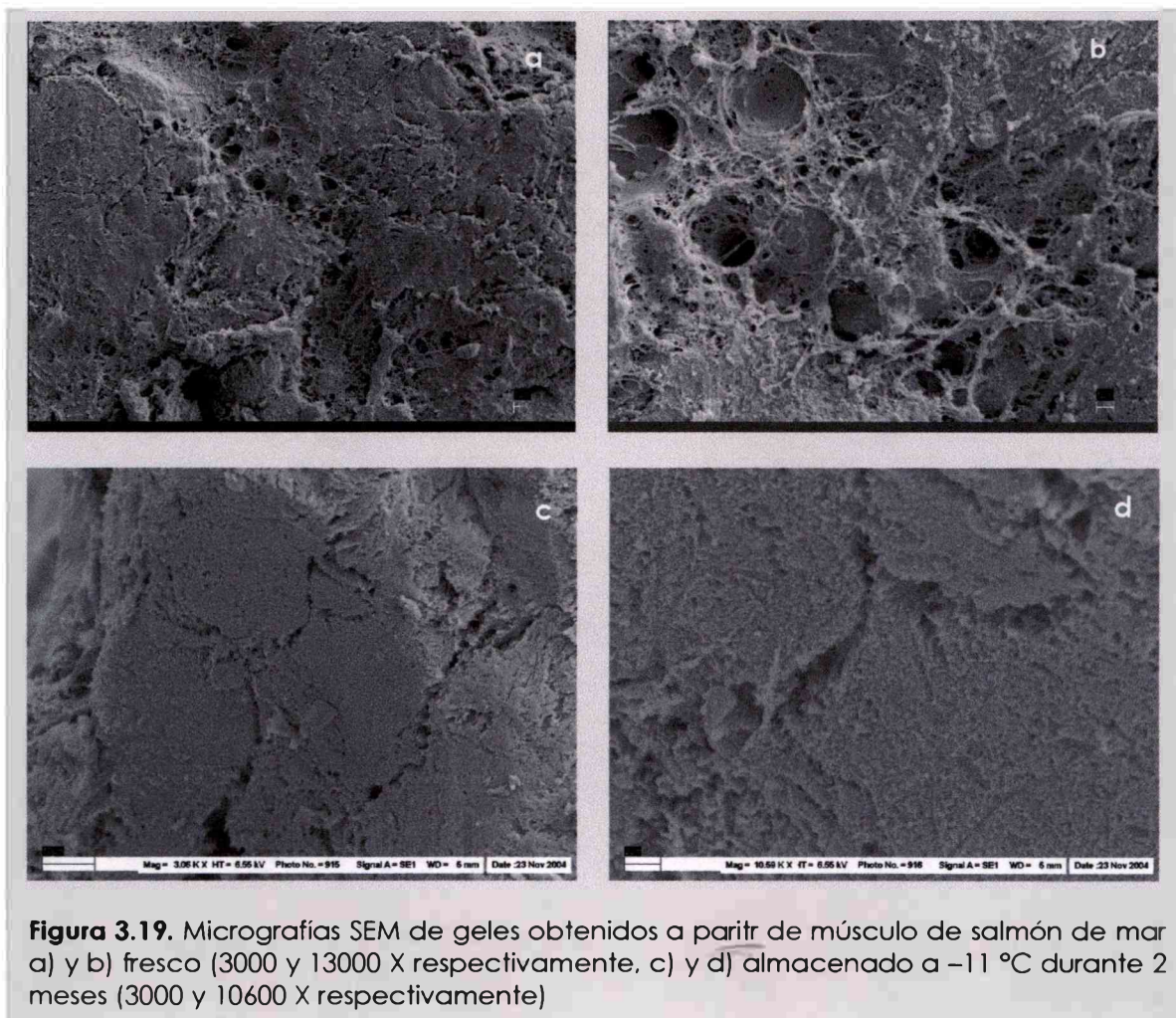
Los geles obtenidos por tratamiento térmico presentaron un aumento significativo en su firmeza  $F$  ( $p < 0,05$ ) para el caso del músculo almacenado durante 6 meses a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La elasticidad,  $E$ , no mostró variaciones significativas en función del tiempo de almacenamiento mientras que la cohesividad,  $C$ , registró un leve incremento a los 2 meses, aunque de muy pequeña magnitud.

**Tabla 3.3.** Parámetros de textura TPA de geles en función del tiempo de almacenamiento a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ 

Tiempo (meses)	F (N)	E	C
0	$8,24 \pm 0,82$	$0,93 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,01$
2	$9,91 \pm 0,50$	$0,92 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,01$
4	$8,17 \pm 0,79$	$0,89 \pm 0,02$	$0,63 \pm 0,00$
6	$11,01 \pm 0,75$	$0,92 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,01$

En función de estos resultados podemos decir que la drástica caída de la solubilidad registrada a los 2 meses de almacenamiento congelado no tuvo consecuencias importantes en los valores de los parámetros de textura de los geles, como cabría esperar dada la importancia de la conformación proteica en la formación de la matriz del gel.

Sin embargo, a pesar de no haberse registrado cambios en los



**Figura 3.19.** Micrografías SEM de geles obtenidos a partir de músculo de salmón de mar a) y b) fresco (3000 y 13000 X respectivamente, c) y d) almacenado a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 meses (3000 y 10600 X respectivamente)



parámetros de textura, la microestructura de los geles mostró importantes modificaciones. Como puede observarse en las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM), los geles obtenidos a partir de músculo fresco presentaron la estructura típica de una red de filamentos finos formando huecos (**Figura 3.19.a y b**). Las matrices de los geles obtenidos a partir de músculo que había sido almacenado a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 meses mostraron estructuras más compactas, las cuales se asemejaban a la conformación de haces de miofilamentos propios de la estructura muscular (**Figura 3.19.c y d**). Estas imágenes sugieren que, dado el proceso de agregación que ocurre en el músculo almacenado congelado, las proteínas miofibrilares no se solubilizarían con el tratamiento con sal en la obtención del "surimi", manteniendo una estructura similar a la encontrada en los haces de miofilamentos del músculo durante el proceso de gelación térmica.

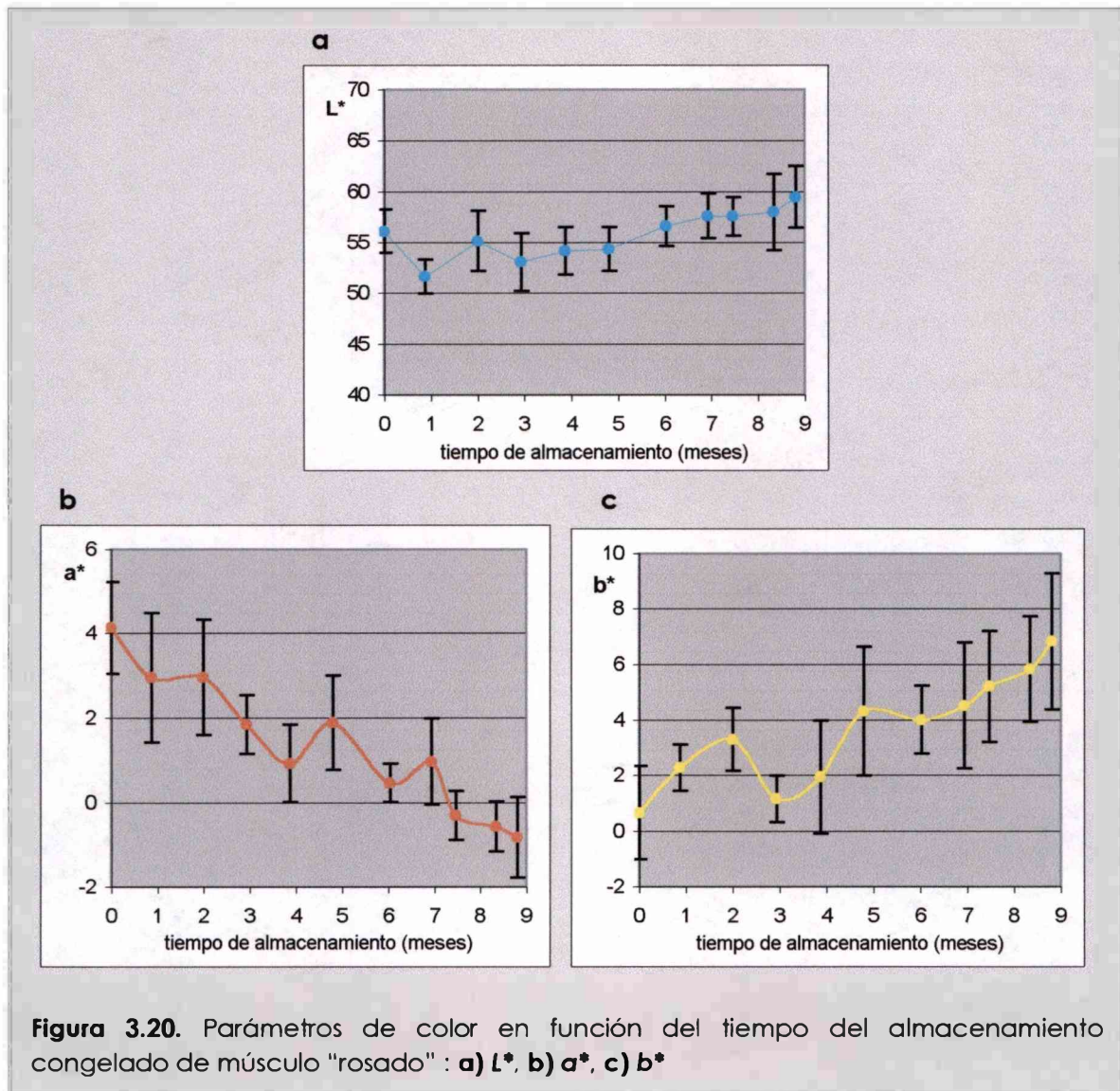
### 3.2.5. Color

Las modificaciones del color del músculo durante su almacenamiento congelado fueron evaluadas mediante la determinación de los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$ .

Tal como se ha comentado en la sección 2.3.6., distintos ejemplares de salmón de mar presentaron diferente color en sus músculos, distinguiéndose entre músculo "blanco" y músculo "rosado". Diferencias similares se encontraron entre los distintos ejemplares utilizados para llevar a cabo el almacenamiento congelado. Por una parte, el músculo fresco de un ejemplar de gran tamaño (11 kg) mostró valores de los parámetros de color que corresponderían a un músculo "rosado", mientras que ejemplares con pesos entre 2,2 y 3,5 kg presentaron músculos caracterizados como "blancos". Nuevamente se observa una importante influencia de la edad de los peces sobre las características del músculo.

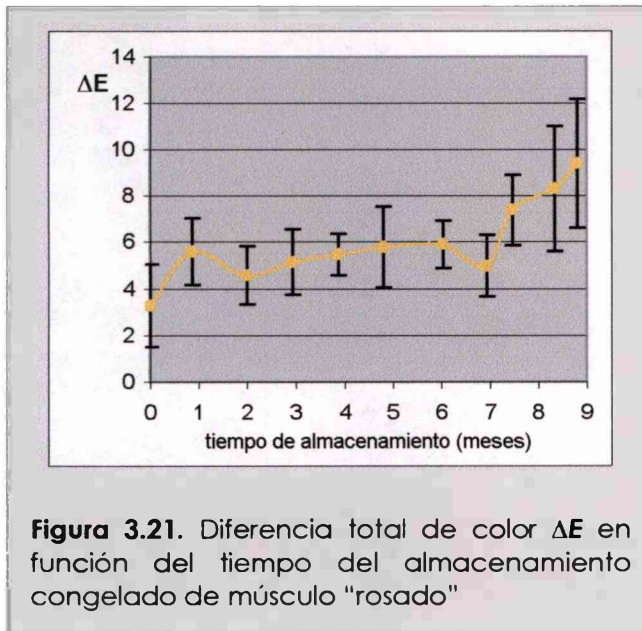
Los resultados obtenidos para el músculo "rosado" se muestran en la **Figura 3.20**. El parámetro  $L^*$  no mostró cambios en función del tiempo de almacenamiento congelado. El parámetro  $a^*$  disminuyó progresivamente en

función del tiempo de almacenamiento del músculo, dicho cambio fue significativo ( $p < 0,05$ ) a partir de los 3 meses de almacenamiento. La pérdida del



color rojizo-rosado determinada mediante la disminución de este parámetro correlaciona bien con la notoria pérdida de ese color a nivel macroscópico. En cuanto al parámetro  $b^*$ , se observó un progresivo aumento en función del tiempo de almacenamiento, especialmente a partir del quinto mes, correlacionándose estos resultados con la visualización de la aparición de un color amarillento en el músculo. Tanto el parámetro  $a^*$  como el  $b^*$  presentaron dispersiones importantes en sus valores; este hecho refleja la presencia en las muestras de músculo picado de zonas con diferente color.

De la misma manera que en el caso del almacenamiento refrigerado, se calculó la diferencia total de color  $\Delta E$  a partir de los valores de  $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$

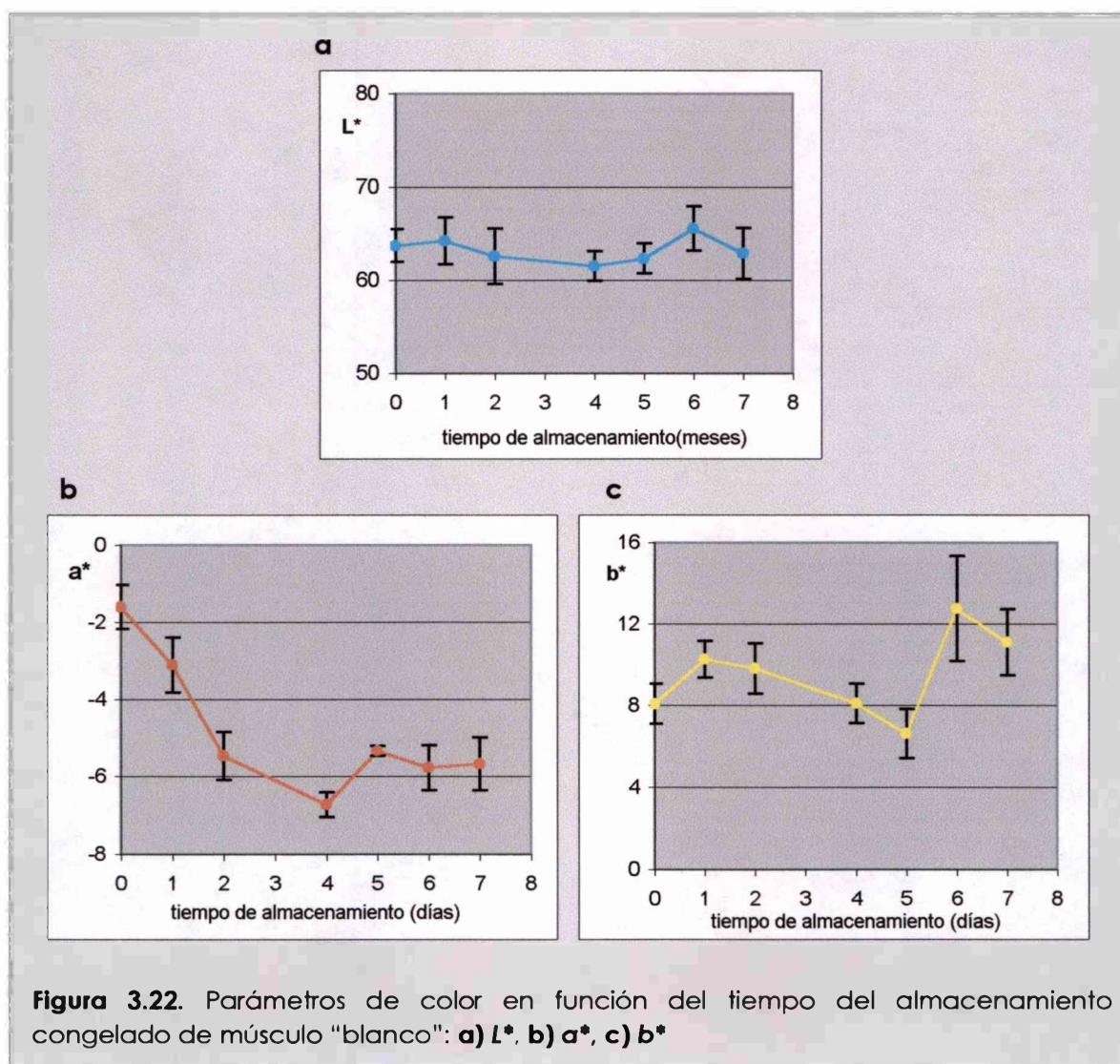


(calculando las diferencias entre cada valor individual y el valor promedio del correspondiente parámetro al inicio del almacenamiento). La diferencia total de color fue constante durante los primeros siete meses de almacenamiento congelado, aumentando con posterioridad (Figura 3.21.). Estos resultados indican que, en este caso, el parámetro  $\Delta E$  no fue un buen indicador de los cambios de color

ya que, tanto el parámetro  $a^*$  como el  $b^*$ , presentaron variaciones a tiempos anteriores de almacenamiento.

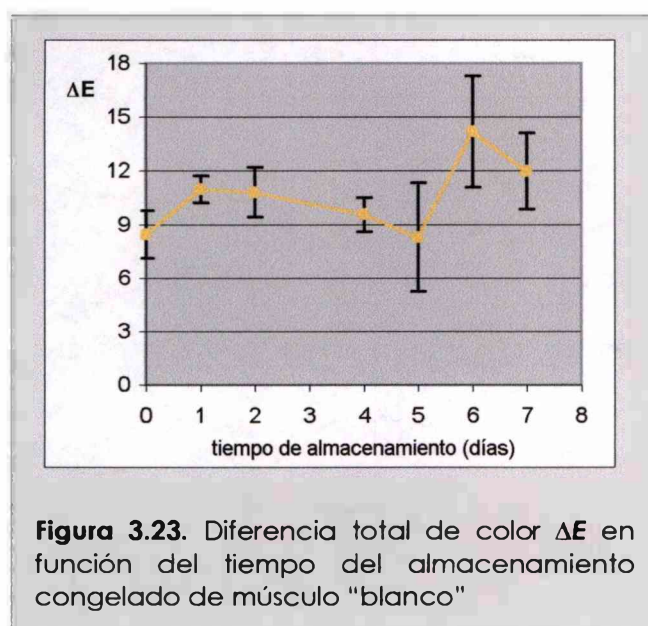
Si se correlacionan estos resultados con la evolución del número de TBA, puede observarse que la variación del parámetro  $a^*$  comienza en el momento de máximo aumento de los productos de la oxidación lipídica, lo cual sugiere un paralelismo entre ambos procesos. Sin embargo, los cambios en  $b^*$  se registraron en una etapa del almacenamiento en la cual el número de TBA se mantuvo aproximadamente constante, no existiendo una relación manifiesta entre la evolución de estos dos parámetros. La evolución de la coloración del músculo hacia una tonalidad amarillenta puede ser causada, entre otras razones, por la formación de pigmentos amarillo-marrones debido a la interacción de los productos de oxidación con otros componentes. Desde este punto de vista, es esperable que los cambios en  $b^*$  ocurran con posterioridad a los cambios de  $a^*$ , los cuáles estarían principalmente relacionados con la oxidación de grupos hemo presentes en el músculo.

En el caso del músculo "blanco" se registró una evolución similar de los parámetros de color a pesar de sus diferencias en el estadio inicial (Figura 3.22.). El



parámetro  $L^*$  no registró diferencias significativas a lo largo del almacenamiento congelado. El parámetro  $a^*$  disminuyó en función del tiempo, registrándose en este caso diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) luego de un mes de almacenamiento en este caso. Cabe señalar que el cambio total en este parámetro al final del almacenamiento fue similar (aproximadamente 5 unidades) al anterior, aunque los valores iniciales fueron muy diferentes. El parámetro  $b^*$  presentó un leve incremento en los 2 primeros meses de almacenamiento - también observado en el músculo "rosado" aunque el mismo no fue significativo en este caso-, disminuyendo luego hasta el quinto mes. Posteriormente, se registró un aumento significativo en dicho parámetro ( $p < 0,05$ ).

Como puede observarse en las figuras, el músculo blanco presentó una menor dispersión en los valores de  $a^*$  y  $b^*$ , concordantemente con una mayor homogeneidad del color del músculo a nivel macroscópico.



La diferencia total de color  $\Delta E$  presentó una evolución correlativa con la evolución del parámetro  $b^*$ , con un aumento significativo a los 6 meses de almacenamiento (Figura 3.23.). Según estos resultados, la variación del parámetro  $a^*$  no se vio reflejada en la diferencia total de color  $\Delta E$ , indicando que, al igual que en el caso del músculo "rosado", éste no es un buen indicador de los cambios de color

que ocurren en el músculo congelado del salmón de mar.

### 3.3.6. Otros parámetros relacionados con el deterioro

Es conocido que el deterioro microbiológico en el músculo de pescado puede ser inhibido mediante la congelación. En función de ello, en pescado almacenado congelado los principales aportes de aminas volátiles (NBV-t) provienen de la degradación del óxido de trimetilamina, en el caso de los pescados que poseen la enzima necesaria (óxido de trimetilamina demetilasa) – especies de la familia Gadidae (bacalao, merluzas)- (Sotelo y Rehbein, 2000); y por otra parte, de la desaminación de aminoácidos. El primer proceso genera dimetilamina como amina volátil (además de formaldehído) mientras que la desaminación de aminoácidos produce amoníaco. En el caso del salmón de mar, es de esperar que el NBV-t producido provenga principalmente de la desaminación de aminoácidos.

A fin de evaluar la calidad del salmón de mar almacenado a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$  desde este punto de vista, se realizaron determinaciones de NBV- $\dagger$  y TMA en función del tiempo de almacenamiento. Luego de 6 meses de almacenamiento, el contenido de NBV fue similar al inicial ( $11,7 \pm 1,8\text{ mg N}/100\text{ g}$  músculo), mientras que a los 9 meses de almacenamiento el valor registrado fue de  $23,5 \pm 0,8\text{ mg N}/100\text{ g}$  músculo. Aunque a los 9 meses de almacenamiento congelado este parámetro presentó un aumento, su valor siguió manteniéndose por debajo del nivel aceptado ( $30\text{ mg \% N}$ ).

Por otra parte, la TMA no experimentó cambios a lo largo de 9 meses de almacenamiento ( $< 1\text{ mg N}/100\text{ g}$  de músculo), corroborando la inhibición del crecimiento microbiano durante el almacenamiento congelado.

En función de lo expuesto anteriormente, el pH del músculo mostró leves cambios durante el almacenamiento congelado, presentando un valor de  $6,75 \pm 0,02$  a los 9 meses de almacenamiento. Por lo tanto, a diferencia de lo que ocurre en el almacenamiento refrigerado, éste no fue un factor relevante en el deterioro de las proteínas.

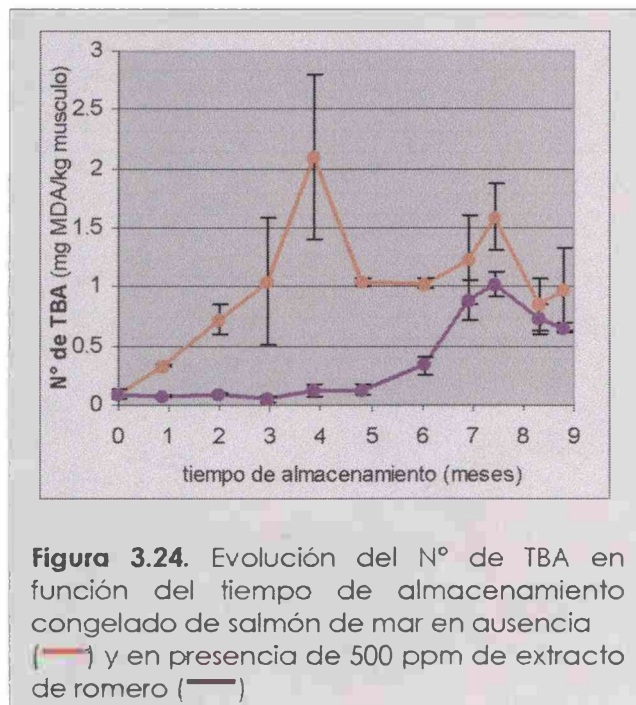
## B. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE EXTRACTO DE ROMERO AL MUSCULO ALMACENADO CONGELADO

Del mismo modo que en el caso del almacenamiento refrigerado de salmón de mar, se ensayó la aplicación del extracto comercial de romero Guardian Rosemary extract 09 (Danisco), en concentraciones similares (200 y 500 ppm). Se realizaron ensayos monitoreando la evolución de los distintos parámetros analizados simultáneamente con el músculo sin antioxidante como sistema control.

### 3.3.7. Efecto del extracto de romero sobre la oxidación lipídica

#### 3.3.7.1. Número de TBA

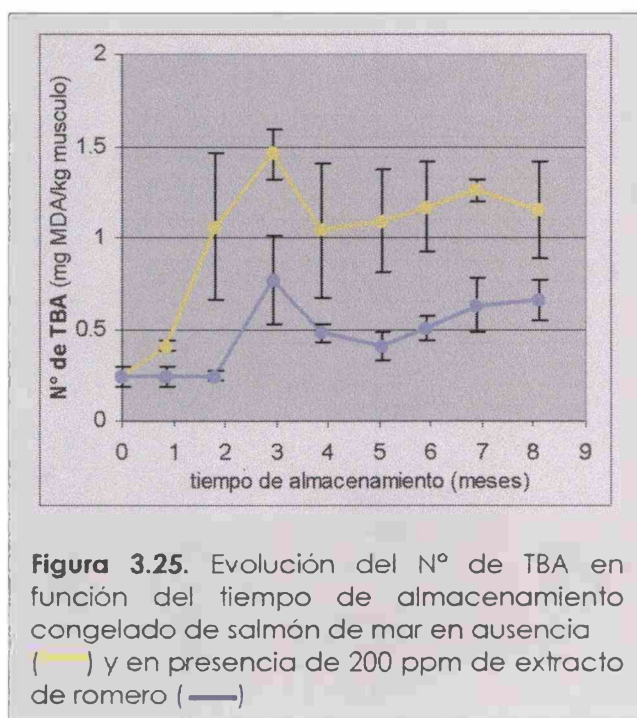
Al igual que en el caso del almacenamiento refrigerado, la aplicación de 500 ppm de extracto de romero produjo una importante inhibición en el desarrollo de los productos secundarios de la oxidación lipídica, como se muestra en la **Figura 3.24**.



En las muestras tratadas con extracto de romero, el número de TBA permaneció constante durante los primeros 5 meses de almacenamiento a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego de 6 meses se observó una tendencia al aumento, el cual fue significativo ( $p < 0,05$ ) a los 7 meses de almacenamiento congelado, alcanzando un valor máximo (número de TBA alrededor de 1) a los 7,5 meses. Este valor corresponde a un 50 % del nivel máximo alcanzado por el músculo

sin agregado de antioxidante. En función de estos resultados, podemos decir que el agregado de 500 ppm de extracto de romero tuvo un efecto positivo sobre el desarrollo del proceso de oxidación lipídica durante los 9 meses de almacenamiento ensayados, produciendo un retardo en el comienzo de este proceso (5 - 6 meses) y a la vez, disminuyendo a la mitad el máximo nivel de oxidación alcanzado en el período estudiado.

El agregado de 200 ppm de extracto de romero también mostró efectos beneficiosos sobre el desarrollo de la oxidación lipídica del músculo de salmón de mar almacenado a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aunque con algunas diferencias con respecto a la aplicación de 500 ppm del antioxidante.



En este caso, no se registraron cambios en el número de TBA durante los dos primeros meses de almacenamiento congelado, observándose un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) a los 3 meses (Figura 3.25.).

Posteriormente, no se registraron variaciones adicionales en el número de TBA hasta el final del almacenamiento. Al igual que en el caso del agregado de 500 ppm de extracto de romero, al aplicar 200 ppm el nivel máximo de productos secundarios de oxidación alcanzado fue aproximadamente el 50 % con respecto al nivel máximo alcanzado en el músculo sin antioxidante. Sin embargo, en el último caso los niveles máximos fueron alcanzados por ambas muestras al mismo tiempo de almacenamiento (3 meses), mientras que con el agregado de 500 ppm el nivel máximo fue alcanzado con posterioridad con respecto al músculo sin antioxidante (7,5 meses vs 4 meses).

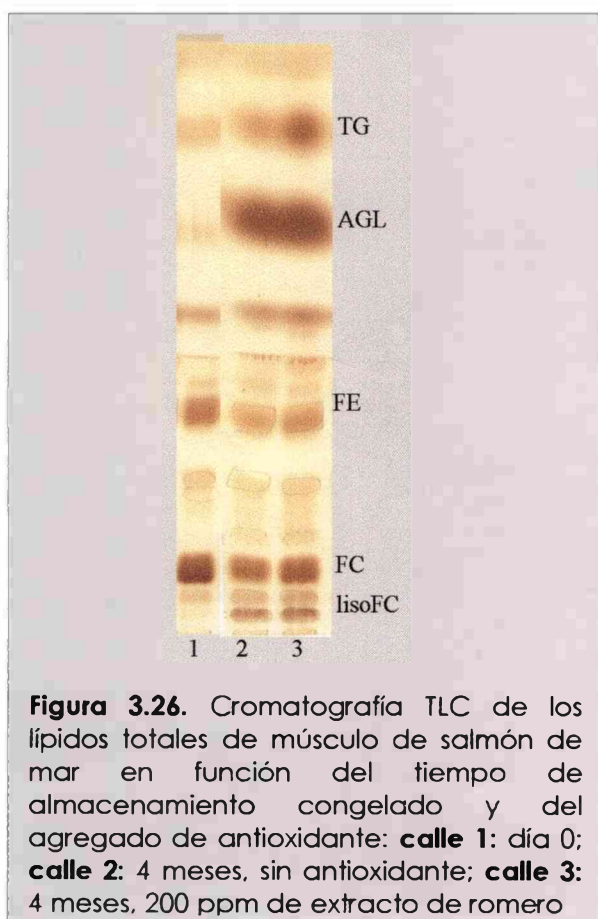
Los resultados obtenidos muestran que el agregado de 200 ppm de extracto de romero inhibió en aproximadamente un 50 % la producción de



compuestos oxidados, aunque no fue capaz de retrasar el comienzo del proceso de oxidación lipídica.

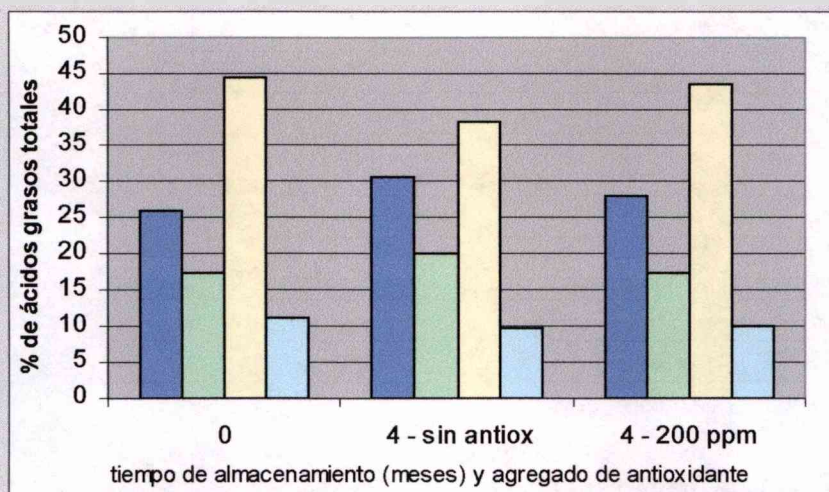
### 3.3.7.2. Composición de la fracción lipídica

Se analizó el efecto del agregado de extracto de romero (200 ppm) sobre las modificaciones de la fracción lipídica durante el almacenamiento congelado del músculo de salmón de mar.



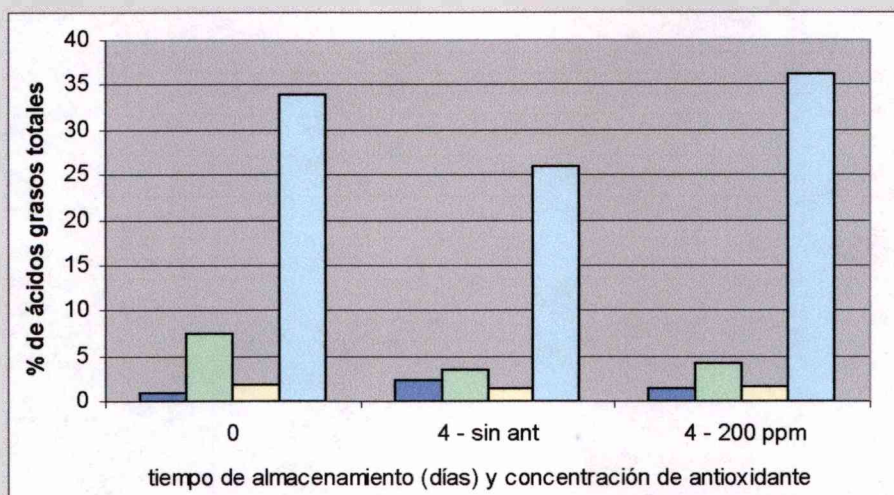
La cromatografía en capa fina (TLC) mostró una hidrólisis de fosfolípidos muy importante en el músculo con 200 ppm de extracto de romero, de manera similar a lo detectado para el músculo sin antioxidante (**Figura 3.26. - calles 2 y 3**). La diferencia más notoria entre las muestras sin y con antioxidante fue la intensidad de la mancha correspondiente a los TG, siendo ésta mucho más intensa en presencia de antioxidante. La menor intensidad en el músculo sin antioxidante podría explicarse por la oxidación que sufrió la fracción de los TG en dichas muestras.

Los perfiles de ácidos grasos obtenidos por cromatografía gaseosa de la fracción de lípidos totales arrojaron los resultados mostrados en la **Figura 3.27**. Luego de 4 meses de almacenamiento, los lípidos provenientes de músculo tratado con antioxidante (200 ppm) no presentaron diferencias importantes en la proporción de las distintas clases de ácidos grasos con respecto al día 0 de almacenamiento, registrándose una disminución menor al 1% de los ácidos  $\omega 3$ , mientras que para el músculo sin antioxidante dicha disminución fue del 6 % (expresada en función de los ácidos grasos totales).



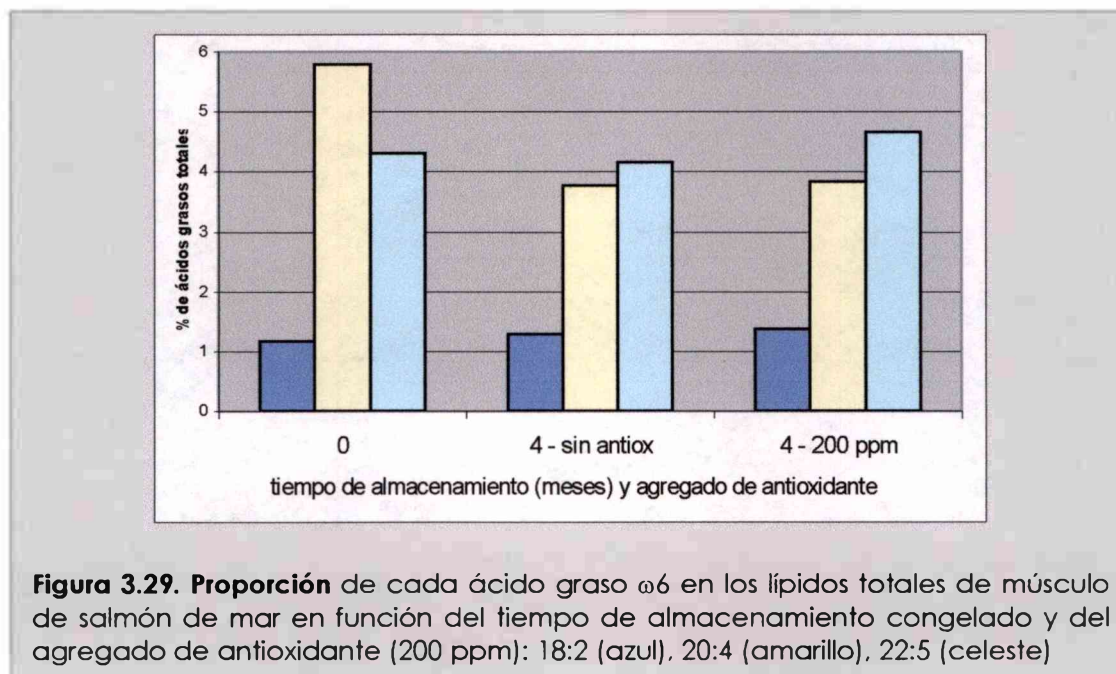
**Figura 3.27.** Distribución de clases de ácidos grasos en los lípidos totales de músculo de salmón de mar en función del tiempo de almacenamiento congelado y del agregado de extracto de romero (200 ppm). Saturados (azul), monoinsaturados (verde), poliinsaturados  $\omega$ 3 (amarillo), poliinsaturados  $\omega$ 6 (celeste)

El análisis de la composición de la fracción  $\omega$ 3 mostró que la proporción del ácido DHA (22:6) no presentó variaciones a los 4 meses de almacenamiento en presencia de 200 ppm de extracto de romero, aunque si se registró una disminución en el contenido del ácido graso 20:5 (Figura 3.28.)



**Figura 3.28.** Proporción de cada ácido graso  $\omega$ 3 en los lípidos totales de músculo de salmón de mar en función del tiempo de almacenamiento congelado y del agregado de extracto de romero (200 ppm): 18:3 (azul), 20:5 (verde), 22:5 (amarillo), 22:6 (celeste)

La fracción  $\omega 6$  del músculo tratado con 200 ppm de extracto de romero mostró similares modificaciones que la correspondiente fracción proveniente de músculo sin antioxidante (Figura 3.29.), detectándose principalmente una disminución en el contenido de ácido araquidónico (20:4).

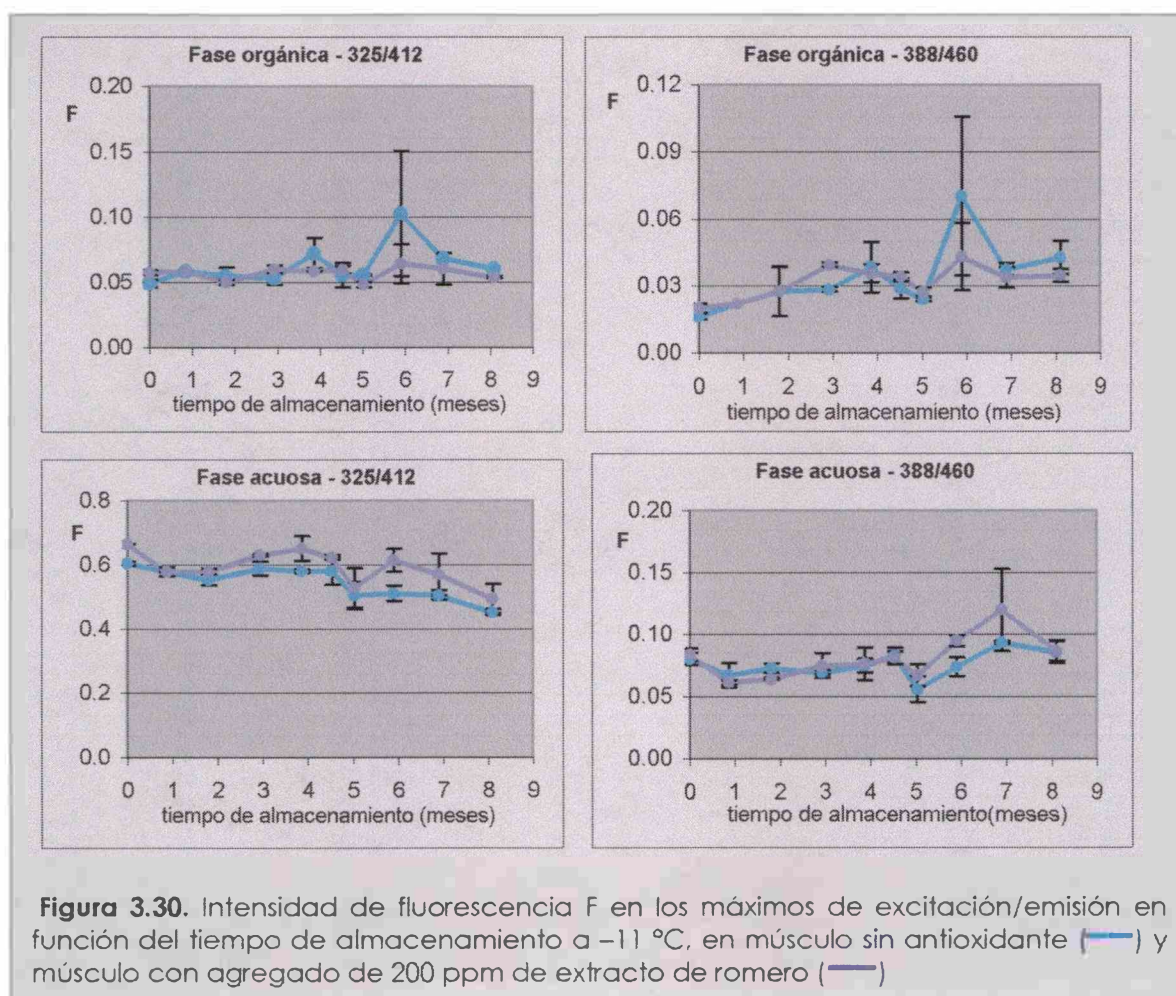


En función de los resultados obtenidos, podemos decir que el extracto de romero (200 ppm) fue efectivo para inhibir la oxidación del ácido poliinsaturado 22:6  $\omega 3$ , el cual es el principal ácido involucrado en dicho proceso. Sin embargo, aún en presencia del antioxidante, otros ácidos se vieron afectados (22:5  $\omega 3$  y 20:4  $\omega 6$ ), indicando que el extracto de romero no fue capaz de prevenir su deterioro. La oxidación de estos ácidos podría ser responsable del aumento en el número de TBA registrado para el músculo con 200 ppm de extracto de romero durante los primeros 4 meses del almacenamiento a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

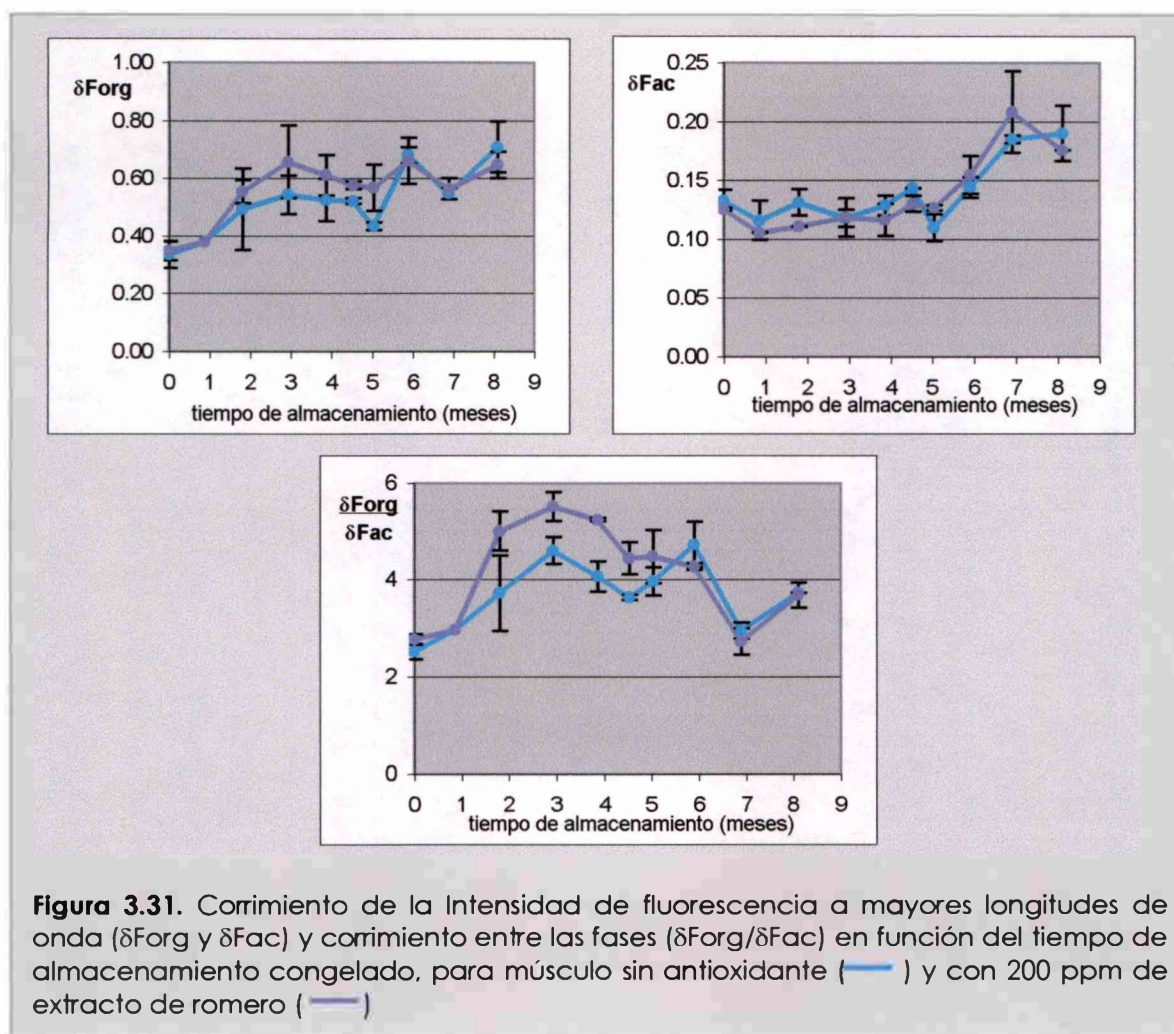
### 3.3.8. Compuestos fluorescentes

Se analizó la evolución de los compuestos fluorescentes en función del tiempo de almacenamiento congelado para los músculos con agregado de 200 y 500 ppm de extracto de romero, respectivamente.

En la **Figura 3.30.** se muestra la evolución de los máximos de excitación/emisión (325/412 y 388/460) comparando el músculo sin antioxidante y el músculo con 200 ppm de extracto de romero.



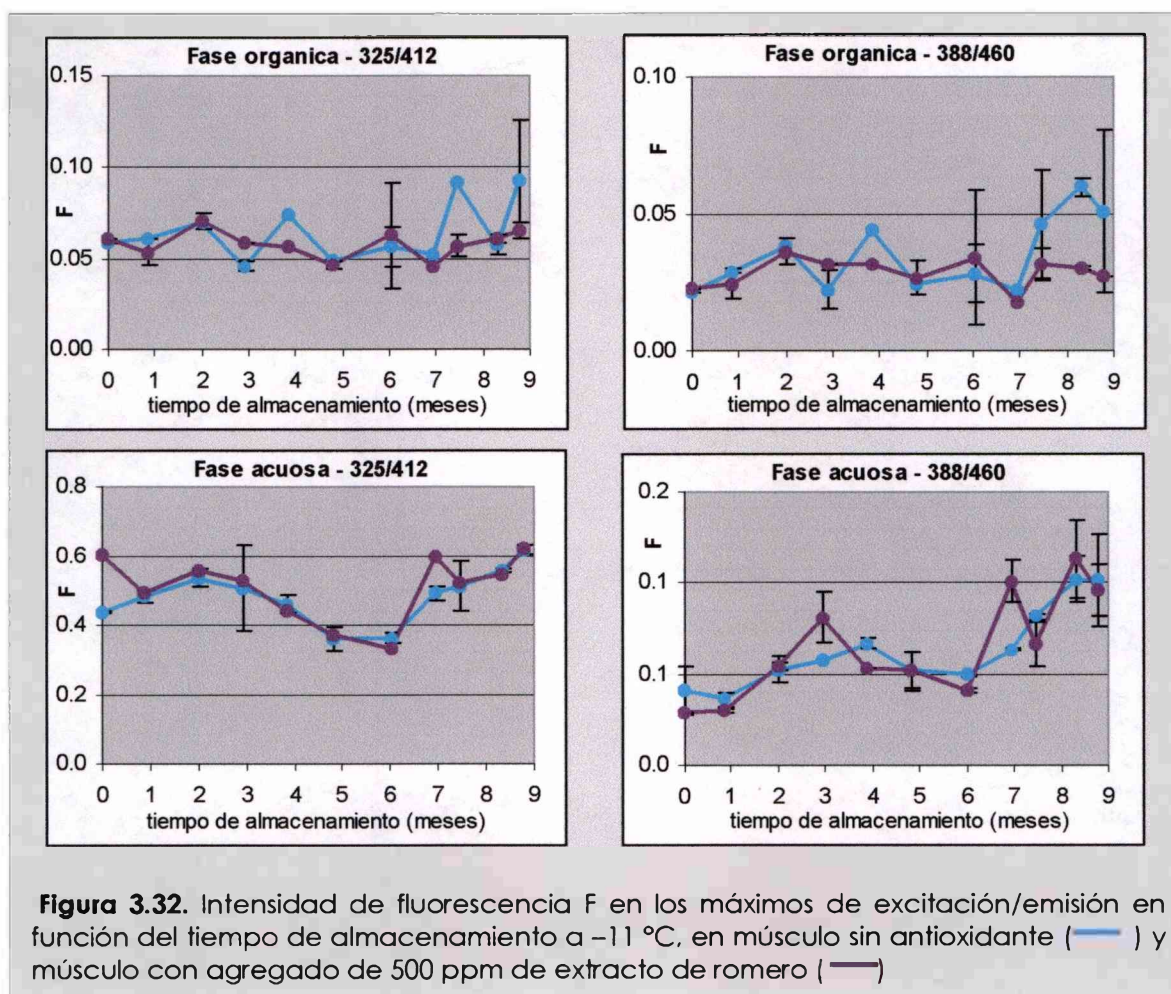
En la fase orgánica, la intensidad de fluorescencia a 325/412 y a 388/460 no presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al músculo sin antioxidante durante todo el período de almacenamiento estudiado. La fase acuosa mostró un comportamiento similar, sin diferencias entre el músculo sin antioxidante y con 200 ppm del mismo.



**Figura 3.31.** Corrimiento de la Intensidad de fluorescencia a mayores longitudes de onda ( $\delta Forg$  y  $\delta Fac$ ) y corrimiento entre las fases ( $\delta Forg/\delta Fac$ ) en función del tiempo de almacenamiento congelado, para músculo sin antioxidante (—) y con 200 ppm de extracto de romero (—)

En la **Figura 3.31.** se muestra la evolución de los corrimientos a mayor longitud de onda en las fases orgánica y acuosa ( $\delta Forg$  y  $\delta Fac$ ) y el corrimiento entre las fases ( $\delta Forg/\delta Fac$ ). El  $\delta Forg$  no presentó diferencias significativas entre el músculo sin antioxidante y el músculo con 200 ppm de extracto de romero a lo largo de todo el almacenamiento, presentándose en ambos casos un aumento progresivo en función del mismo. Resultados similares fueron registrados para el  $\delta Fac$ , sin diferencias entre las muestras con (200 ppm) y sin antioxidante, presentando ambas un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) a partir del séptimo mes de almacenamiento. En cuanto a la relación  $\delta Forg/\delta Fac$ , ambos sistemas presentaron una evolución similar, aunque con mayores valores para el músculo con 200 ppm de romero para algunos tiempos del almacenamiento (3 – 4 meses).

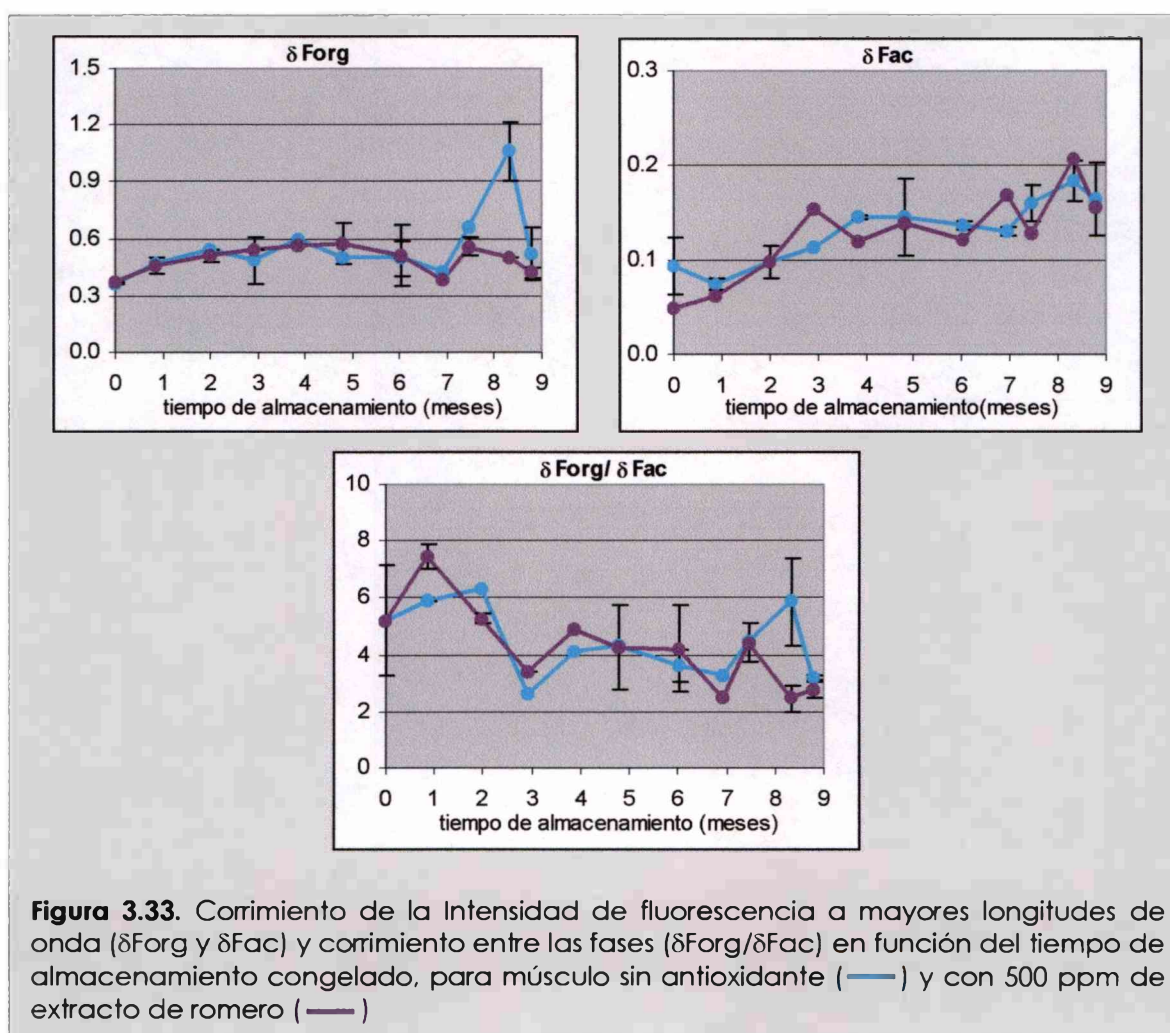
En el caso del músculo de salmón de mar con agregado de 500 ppm de extracto de romero, los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.32**.



Al igual que en el caso anterior, no se observaron diferencias en la evolución de la intensidad de fluorescencia a 325/412 y 388/460 entre el músculo con 500 ppm de antioxidante y el músculo sin antioxidante, tanto en la fase orgánica como en la fase acuosa. Solamente se registraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la fluorescencia a 325/412 y 388/460 en fase orgánica entre los 7,5 y 9 meses de almacenamiento, siendo mayor en el caso del músculo sin antioxidante.

El  $\delta F_{org}$  presentó un mayor valor ( $p < 0,05$ ) para el músculo sin antioxidante a los 8,5 meses de almacenamiento, sin diferencias significativas en el resto de los tiempos de almacenamiento analizados (**Figura 3.33**). En la fase acuosa no se

encontraron diferencias significativas en el corrimiento a mayores longitudes de onda en función del tiempo de almacenamiento, con una tendencia de ambas a aumentar progresivamente. Tampoco se registraron diferencias significativas entre ambas muestras en el parámetro  $\delta\text{Forg}/\delta\text{Fac}$ , excepto a los 8,5 meses de almacenamiento, donde el músculo sin antioxidante presentó un valor mayor. En fase orgánica se insinúa una posible formación de compuestos de interacción recién a los 9 meses de almacenamiento, con aumento del  $\delta\text{Forg}$ .



Los resultados anteriormente expuestos muestran que la determinación de compuestos fluorescentes no fue, en el caso del músculo de salmón de mar almacenado congelado, un análisis que permita el seguimiento del proceso de oxidación lipídica a través de la interacción de los productos oxidados - proteínas. Si bien se registraron variaciones en función del tiempo de almacenamiento a -11

°C, dichos cambios también ocurrieron en el músculo con antioxidante donde el desarrollo de productos de oxidación secundarios había sido fuertemente inhibido. En fase acuosa no se registró ninguna diferencia entre las muestras con y sin antioxidante, sugiriendo que no ocurrió interacción -al menos detectable por este método- entre los productos de la oxidación lipídica y los grupos amino de otros componentes del músculo, en particular las proteínas. En fase orgánica, se observó una diferencia entre el músculo sin antioxidante y con 500 ppm de extracto de romero luego de los 8 meses de almacenamiento, lo cual sugeriría la formación de compuestos de interacción solubles en un medio orgánico. Dichos compuestos han sido relacionados con los lípidos de membrana, ya que los fosfolípidos actuarían como compuestos donores de los grupos amino (Fletcher y col., 1973; Tappel, 1980; Aubourg, 1999a). Asumiendo que el aumento detectado en el  $\delta$ Forg luego de los 8 meses de almacenamiento se correlaciona con la formación dichos compuestos de interacción, es importante resaltar que este proceso fue detectado con mucha posterioridad al aumento en el número de TBA, lo cual indicaría un retardo en la formación de dichos compuestos con respecto a la formación de los productos secundarios de la oxidación. Por lo tanto, podría sugerirse una muy baja velocidad de formación de los compuestos de interacción en el músculo congelado.

### **3.3.9. Efecto del extracto de romero sobre las modificaciones proteicas**

A fin de analizar si el agregado de extracto de romero tuvo alguna influencia sobre las alteraciones observadas en la estructura y funcionalidad de las proteínas musculares durante el almacenamiento congelado, se realizaron las determinaciones relacionadas con la fracción proteica en el músculo con extracto de romero (200 y 500 ppm) paralelamente con el músculo sin antioxidante. De esta manera, pudo evaluarse si alguna de dichas alteraciones estuvo relacionada con el proceso de oxidación lipídica.

En primer término, los termogramas obtenidos por DSC para el músculo con antioxidante (200 ppm) fueron similares a los del músculo sin antioxidante (resultados no mostrados). Así, los perfiles térmicos presentaron las mismas modificaciones que las descritas para el músculo sin antioxidante durante los

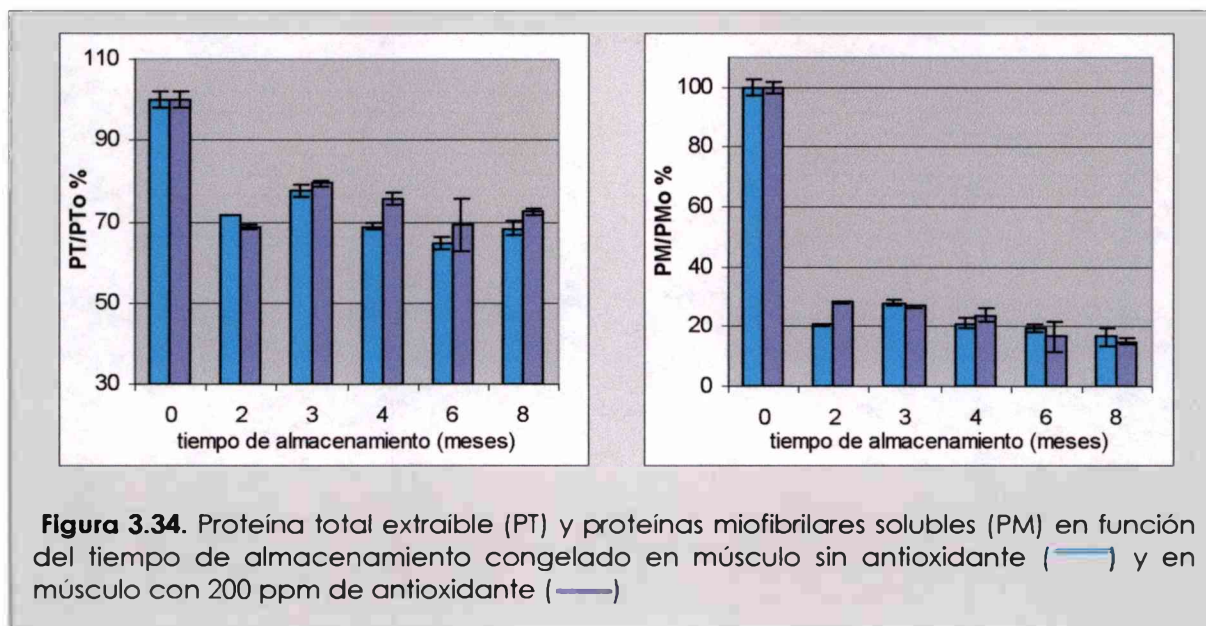


primeros 4 meses de almacenamiento congelado: pérdida de estabilidad térmica de una región de la miosina, "pequeños picos" alrededor de los 60 °C (sección 3.3.4.1.). De la misma manera, las entalpías de desnaturalización de la miosina y de la actina no presentaron diferencias significativas entre el músculo sin antioxidante y con extracto de romero ( $p < 0,05$ ). A los 6 meses de almacenamiento, ambas muestras presentaron el mismo cambio drástico en los termogramas, evidenciando la pérdida de estructura nativa de la miosina.

Según los resultados obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido, las alteraciones estructurales que ocurrieron durante el almacenamiento congelado del músculo de salmón de mar en las proteínas -fundamentalmente la miosina- no pueden ser relacionadas con los productos de oxidación lipídica ya que un menor desarrollo de dichos productos no tuvo incidencia sobre las alteraciones.

El análisis de la solubilidad proteica -medida como *Proteína extraíble total* PT y *Proteínas miofibrilares solubles* PM- sugiere similares conclusiones. No se registraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la evolución de las PT y las PM entre el músculo sin y con antioxidante. En la **Figura 3.34.** se presentan los resultados obtenidos en el caso del agregado de 200 ppm de extracto de romero, mostrando idéntico comportamiento el músculo con 500 ppm.

En función de estos resultados, podemos decir que la disminución de la



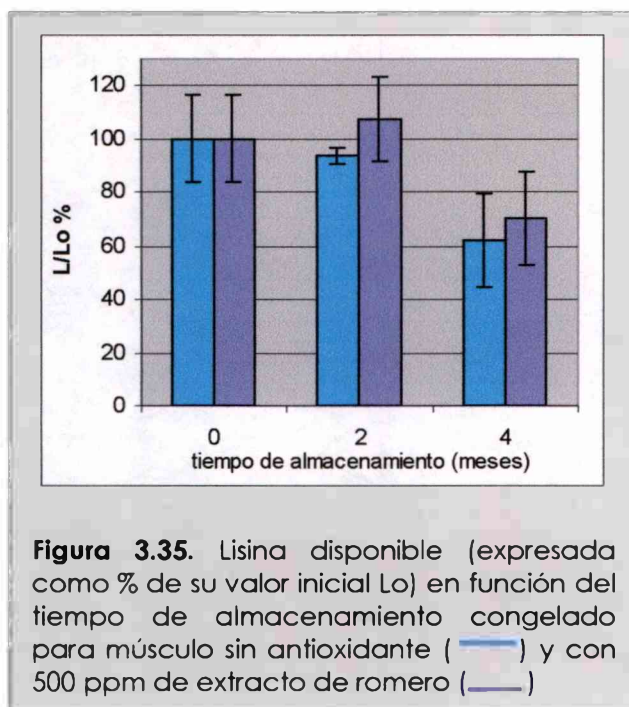
solubilidad proteica durante el almacenamiento congelado no mostró una vinculación con el desarrollo de los productos de oxidación lipídica. Este comportamiento también muestra correlación con los resultados obtenidos en la determinación de compuestos fluorescentes de interacción, ya que de haber existido un proceso de agregación e insolubilización proteica mediante la reacción con los productos secundarios de la oxidación, se esperaría la detección de dichos compuestos mediante la fluorescencia de los mismos, principalmente en la fase acuosa.

Los resultados hasta aquí obtenidos sugieren que, en el período de almacenamiento ensayado, no se detectaron indicios de una interacción entre los productos de oxidación y las proteínas musculares.

Al analizar los perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de las fracciones solubles PT y PM provenientes de músculo con antioxidante (200 y 500 ppm) no se encontraron diferencias con respecto a los mostrados en la sección **3.3.4.3.** para las correspondientes proteínas del músculo sin antioxidante, como cabe esperar de acuerdo con los resultados expuestos anteriormente. Así, en presencia o en ausencia de antioxidante la agregación involucró las mismas especies proteicas, particularmente aquellas de alta masa molecular que no ingresan al gel de electroforesis, lo cual fue principalmente evidenciado luego de 6 meses de almacenamiento.

El contenido de lisina disponible también fue analizado en músculo almacenado en presencia de ambas concentraciones de extracto de romero. Este parámetro no presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en función del agregado de antioxidante (200 y 500 ppm), tal como se muestra en la **Figura 3.35.** para el caso del agregado de 500 ppm de extracto de romero.

Como fue mencionado en la sección **3.3.4.4.** el contenido de lisina disponible disminuyó entre los 3 y 4 meses de almacenamiento congelado. Dicha disminución ocurrió también en presencia de 500 ppm de extracto de romero (cabe remarcar que a los 4 meses de almacenamiento en presencia de 500 ppm de romero no se había registrado ningún aumento en el número de TBA con respecto al valor inicial). Por lo tanto, la disminución observada en el contenido de lisina disponible no puede ser atribuida a la reacción de sustancias



**Figura 3.35.** Lisina disponible (expresada como % de su valor inicial  $L_0$ ) en función del tiempo de almacenamiento congelado para músculo sin antioxidante (—) y con 500 ppm de extracto de romero (—).

carbonílicas procedentes de la oxidación de los lípidos - específicamente a las sustancias reactivas al TBA- y el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina. Este hecho está de acuerdo con la falta de evidencia de formación de compuestos de interacción de carácter fluorescente antes comentada.

En función de estos resultados, la disminución en el contenido de lisina disponible podría estar vinculado con las alteraciones estructurales y la formación de

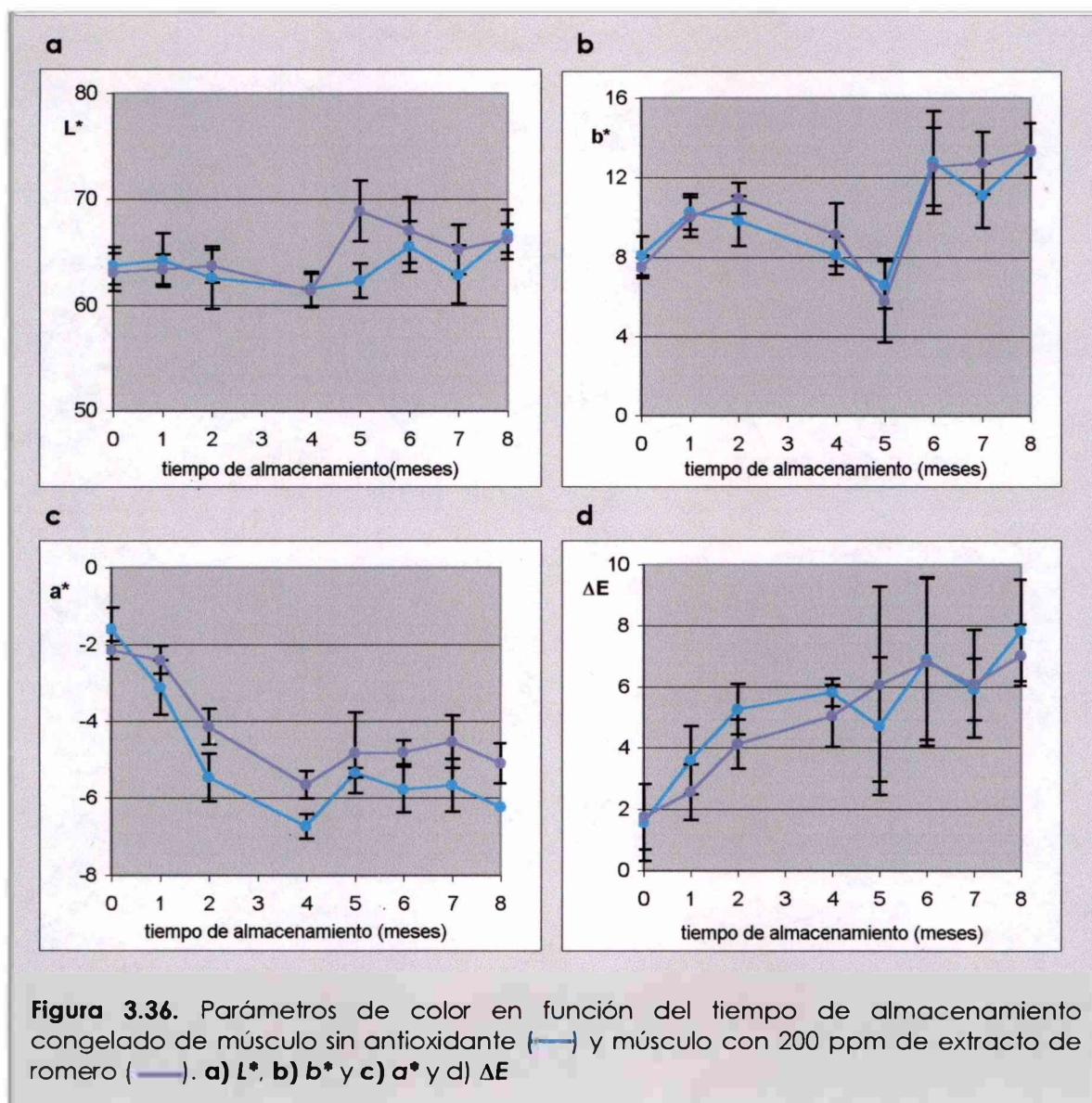
agregados que ocurren como consecuencia del almacenamiento congelado.

### 3.3.10. Efecto del extracto de romero sobre los cambios de color

Se determinaron los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$  a lo largo del almacenamiento congelado de las muestras sin y con (200 y 500 ppm) de antioxidante. Los resultados obtenidos para el músculo con agregado de 200 ppm de extracto de romero se muestran en la **Figura 3.36**.

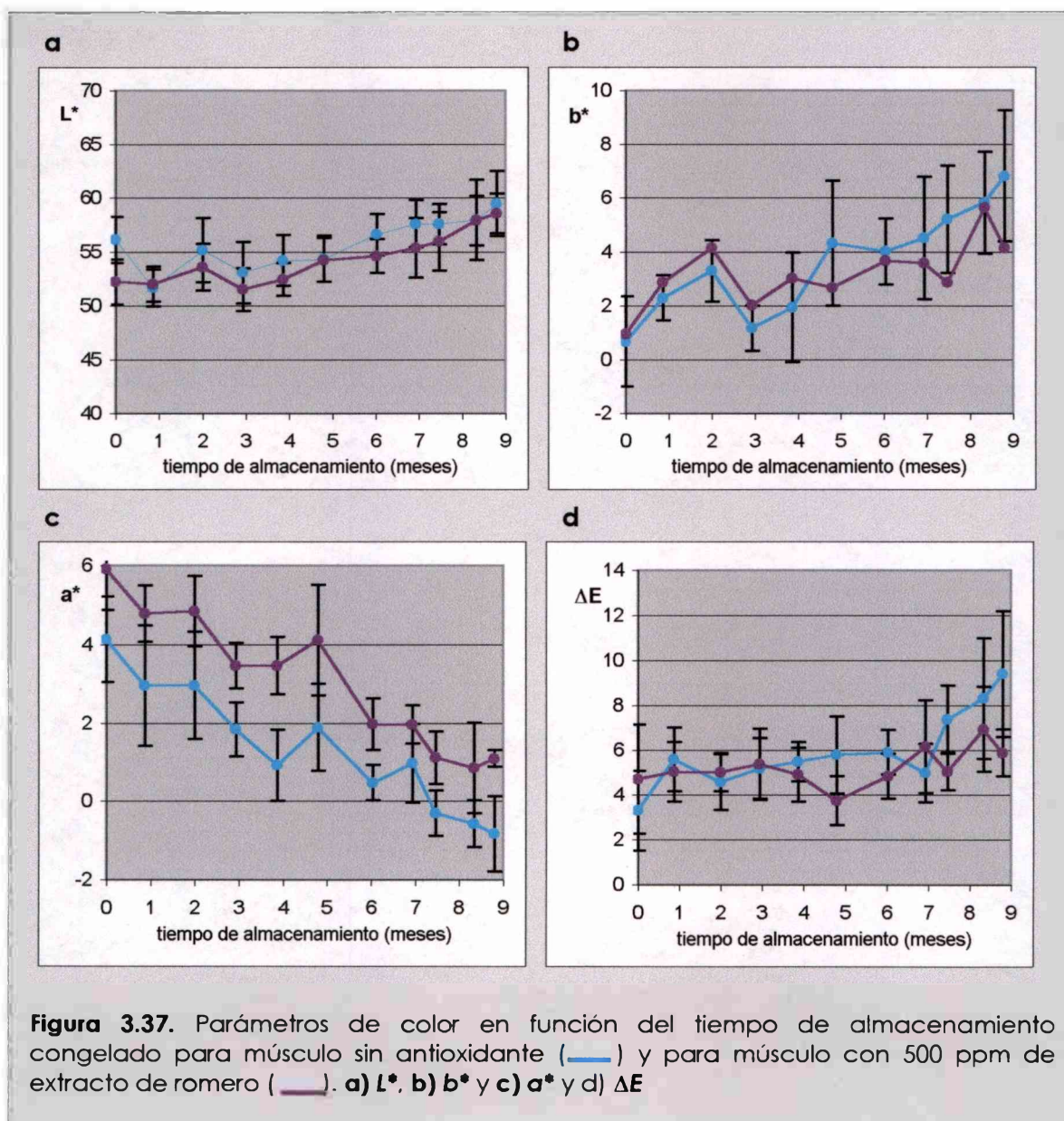
El parámetro  $L^*$  no mostró diferencias entre las muestras sin y con 200 ppm antioxidante, así como tampoco hubo diferencias en la evolución del parámetro  $b^*$ . En el caso de  $a^*$ , se observó una progresiva disminución en función del tiempo de almacenamiento para ambas muestras. Sin embargo, el valor correspondiente al músculo con 200 ppm de extracto de romero se mantuvo por encima al correspondiente al músculo sin antioxidante, siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en todos los tiempos de almacenamiento analizados excepto a los 5 meses. Esta información indica una menor pérdida de color rojizo durante el almacenamiento a  $-11\text{ }^\circ\text{C}$  en el músculo con 200 ppm de

extracto de romero. El  $\Delta E$  no presentó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en función del agregado de 200 ppm de antioxidante.



Cuando se agregaron 500 ppm de extracto de romero se obtuvieron resultados comparables a los comentados sobre la preservación del color (Figura 3.37.). Al igual que en el caso anterior, tanto el parámetro  $L^*$  como el  $b^*$  no fueron modificados por la presencia de antioxidante a lo largo del almacenamiento congelado. Por otra parte, el parámetro  $a^*$  disminuyó progresivamente en función del tiempo de almacenamiento en ambas muestras, aunque en aquéllas con 500 ppm de extracto de romero, dicha disminución fue más lenta manteniéndose por

mayor tiempo el color rojizo de la carne, hecho que además pudo ser comprobado visualmente. La diferencia total de color  $\Delta E$  no presentó diferencias significativas en función del agregado de 500 ppm de extracto de romero.



Los resultados obtenidos mediante la determinación de los parámetros de color demuestran que existe una vinculación entre la pérdida de color rojo del músculo almacenado congelado y el proceso de oxidación, ya que al inhibir este último, se logra también un cierto grado de preservación del mismo. Sin embargo, si bien durante los primeros 6 meses de almacenamiento en presencia de 500

ppm de extracto de romero se inhibió casi completamente el desarrollo de los productos secundarios de la oxidación lipídica, igualmente hubo una pérdida de color rojo. Este hecho sugiere que además del proceso de oxidación otros factores -sobre los cuales no tendría efecto el antioxidante- estarían involucrados en la pérdida de este atributo de calidad. Resultados similares se encontraron en el almacenamiento refrigerado del músculo de salmón de mar (sección **2.3.10**) , así como en otras especies (Wetterskog y Undeland, 2004).

Por otra parte, la similar evolución del parámetro  $b^*$  en ausencia y en presencia de antioxidante sugiere que el proceso de oxidación lipídica no tendría vinculación con el aumento de tonalidad amarillenta del músculo, de igual manera que en el caso del almacenamiento refrigerado.

### 3.4. CONCLUSIONES

Durante el almacenamiento congelado (-11 °C), el músculo de salmón de mar picado sufrió diversas alteraciones, tanto a nivel de su fracción lipídica, de sus proteínas como así también en aspectos relacionados con la calidad nutritiva y la aceptabilidad sensorial del alimento.

De la misma manera que durante el almacenamiento refrigerado, la oxidación lipídica mostró un considerable desarrollo, alcanzando sus valores máximos entre los 3 y 4 meses de almacenamiento. Sin embargo, se registraron algunas diferencias con respecto al almacenamiento refrigerado en cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados alterados por dicho proceso, ya que además del ácido 22:6  $\omega$ 3, se vieron involucrados otros ácidos grasos tales como el 22:5  $\omega$ 3 y el 20:4  $\omega$ 6. También pudo detectarse una hidrólisis muy intensa de los fosfolípidos, probablemente debida a la acción de fosfolipasas activas durante el almacenamiento congelado.

Como ya ha sido previamente mencionado, los factores que limitan la vida útil del pescado almacenado en estado congelado están relacionados principalmente con las alteraciones que ocurren a nivel de las proteínas miofibrilares y sus consecuencias sobre la funcionalidad y la textura del músculo. Dichas alteraciones fueron evaluadas en el presente trabajo a través de diversas determinaciones a fin de analizar distintos aspectos de las mismas. El cambio más rápido y más drástico observado fue un descenso en la solubilidad de las proteínas miofibrilares, con una disminución cercana al 80 % a los 2 meses de almacenamiento. Es conocido que la agregación proteica es uno de los principales procesos de deterioro de las proteínas musculares durante el almacenamiento congelado. En el músculo de salmón de mar picado y almacenado a -11 °C, la agregación proteica ocurrió en una amplia extensión en corto tiempo.

Sin embargo, dicho proceso no fue simultáneo con otras alteraciones proteicas. Así, la desnaturalización de las proteínas miofibrilares -evidenciada a través de estudios de calorimetría diferencial de barrido- comenzó posteriormente

(a los 3 meses de almacenamiento), continuando progresivamente hasta los 6 meses donde la desnaturalización de la miosina fue prácticamente total. Análogamente, aunque la solubilidad proteica no se modificó luego de los 2 meses de almacenamiento, los perfiles electroforéticos presentaron cambios entre los 3 y los 6 meses. Dichos cambios estuvieron relacionados con la desaparición total, a los 6 meses, de las especies proteicas de alto peso molecular presentes en la fracción soluble de proteínas miofibrilares del músculo fresco, las cuales habían disminuido parcialmente a los 3 meses de almacenamiento.

Los resultados anteriores sugieren que aunque durante los 2 primeros meses de almacenamiento a  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$  se produjo el máximo grado de insolubilización, posteriormente continuaron ocurriendo modificaciones en las proteínas, las cuales llevaron a la desnaturalización de la miosina y a cambios en la naturaleza de los agregados. Una posible causa de estas modificaciones podría estar relacionada con cambios en el tipo de interacciones en los agregados. Aunque esta hipótesis no puede afirmarse a partir de la información experimental obtenida, las determinaciones de lisina disponible la avalan en ese sentido, ya que se observó una disminución en el contenido de dicho parámetro a partir de los 3 meses de almacenamiento, sugiriendo algún tipo de interacción covalente que involucra a los grupos amino libres de la lisina.

La agregación proteica también pudo ser evidenciada a través de la observación microscópica de las proteínas miofibrilares (TEM), pudiéndose observar "paquetes" de filamentos agregados.

La observación microscópica (SEM) de las matrices de los geles obtenidos térmicamente, las cuales presentaron una estructura que se asemeja a la estructura muscular (haces de filamentos), también evidenciaría la falta de extractabilidad de las proteínas miofibrilares. No obstante las notorias alteraciones de la matriz, los geles no presentaron modificaciones en sus parámetros de textura.

Los parámetros texturales del músculo no presentaron correlación con los cambios descritos en la literatura para el músculo de pescado congelado, probablemente debido al tipo de muestra analizada. Dichos cambios -un músculo más duro, fibroso y seco- fueron evidenciados visualmente en el músculo



de salmón de mar, pero no mediante las medidas instrumentales, principalmente no se registró un aumento en la firmeza como cabría esperar. El aumento de la cohesividad determinado podría dar cuenta del mayor grado de interacción entre las estructuras proteicas en el músculo.

Una de las principales causas de las alteraciones proteicas durante el almacenamiento congelado está dada por la formación de los cristales de hielo. Sin embargo, existen otros procesos que pueden contribuir a dichas alteraciones, entre los cuales se encuentra la oxidación lipídica. En función de ello, se evaluó la posible incidencia de este proceso en las modificaciones proteicas analizadas. Al igual que en el caso del almacenamiento refrigerado, la aplicación de extracto de romero como antioxidante permitió realizar dicha diferenciación.

Las concentraciones de extracto de romero utilizadas (200 y 500 ppm) fueron efectivas para prevenir la oxidación lipídica en el músculo de salmón de mar almacenado a -11 °C. Una concentración de antioxidante de 200 ppm inhibió el desarrollo de los productos de oxidación en aproximadamente un 50 % con respecto al músculo sin antioxidante, mientras que con 500 ppm se inhibió totalmente la oxidación durante los primeros 6 meses de almacenamiento, alcanzando luego valores 50 % menores a los correspondientes al músculo sin antioxidante.

Los compuestos de carácter fluorescente presentaron algunas variaciones en función del tiempo de almacenamiento congelado, tales como un aumento y posterior disminución del  $\delta$ For<sub>g</sub> y un aumento progresivo del  $\delta$ Fac. Sin embargo, dichas variaciones se presentaron tanto en el músculo sin antioxidante como con antioxidante (200 y 500 ppm), indicando que los cambios no estarían vinculados con el proceso de oxidación lipídica.

Por otra parte, todas las alteraciones proteicas anteriormente comentadas ocurrieron de igual manera en ausencia y en presencia del extracto de romero, aún con 500 ppm cuando el proceso de oxidación había sido inhibido en gran medida.

En función de los resultados obtenidos, se puede concluir que no pudo detectarse una influencia del proceso de oxidación lipídica y sus productos sobre

las alteraciones que ocurrieron en el músculo de salmón de mar almacenado a -11 °C.

La hidrólisis lipídica, con la consecuente formación de ácidos grasos libres, podría estar implicada en las alteraciones proteicas. Dado que este proceso se presentó en ausencia como en presencia del extracto de romero, el agregado del mismo no permitió establecer alguna relación entre los dos procesos.

El extracto de romero tuvo un efecto positivo sobre los cambios de color del músculo almacenado congelado, previniendo parcialmente la pérdida de color rojo del mismo, con las dos concentraciones ensayadas (200 y 500 ppm), aunque su eficiencia fue mayor con 500 ppm.

# IV. Conclusiones Generales



#### IV. CONCLUSIONES GENERALES

- ❖ Se obtuvo información básica acerca del salmón de mar, relacionada con: la composición química del músculo y su variabilidad; la composición de la fracción lipídica y el perfil de ácidos grasos, fundamentalmente en cuanto a su composición de ácidos grasos poliinsaturados; las características de sus proteínas tales como estabilidad térmica, solubilidad, perfiles electroforéticos y propiedades frente al proceso de gelación térmica. La especie en estudio mostró algunas características particulares, tal como un porcentaje muy alto de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ 3, siendo particularmente abundante el ácido 22:6  $\omega$ 3. En cuanto a la fracción proteica, es notoria la baja solubilidad de las proteínas miofibrilares obtenida en el músculo fresco al inicio de los almacenamientos, la cual podría ser atribuida a que dichas proteínas se encontrarían formando grandes agregados mediante uniones covalentes y no covalentes.
  
- ❖ El estudio de los sistemas modelo -en condiciones de un ensayo acelerado- mostró los efectos potenciales del malonaldehído sobre las proteínas miofibrilares. Se estudiaron los cambios que ocurren en la estructura, tales como desnaturalización y agregación, evaluándose las especies proteicas y los tipos de uniones involucradas; así como en aspectos funcionales tales como la solubilidad y la gelación térmica de las proteínas miofibrilares. Se comprobó una importante influencia de los factores concentración de MDA y tiempo de interacción en las alteraciones.
  
- ❖ Se investigaron las alteraciones del músculo de salmón de mar picado almacenado en refrigeración, estimándose la vida útil y analizando las modificaciones ocurridas en dicho período. La oxidación lipídica alcanzó un considerable desarrollo, aunque no fue posible detectar una vinculación entre este proceso y el deterioro de la fracción proteica.

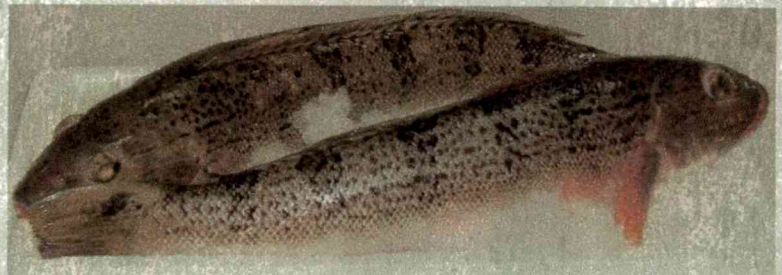
- ❖ En el caso del músculo almacenado congelado, se analizaron los cambios en la fracción proteica dada su importancia entre los factores que limitan la vida útil de este tipo de productos. Análogamente a lo registrado en el almacenamiento refrigerado, la oxidación mostró una importante evolución de sus productos secundarios, no pudiéndose detectar un efecto de dichos compuestos sobre las alteraciones proteicas.
- ❖ Tanto en el caso del almacenamiento refrigerado como del almacenamiento congelado, los resultados sugieren que la fracción lipídica principalmente afectada por el proceso de oxidación es la de los triglicéridos, siendo el ácido graso 22:6  $\omega$ 3 el más involucrado, aunque en el caso del músculo congelado también fueron afectados otros ácidos grasos poliinsaturados. No fue posible detectar una vinculación entre la hidrólisis de los lípidos -fundamentalmente de los fosfolípidos- y la oxidación de los mismos, registrándose en ambos casos que la oxidación fue anterior a la hidrólisis.
- ❖ La determinación de los compuestos de interacción fluorescentes no demostró ser -tanto en el músculo de salmón de mar refrigerado como congelado- una herramienta útil para el seguimiento del proceso de oxidación lipídica, ya que algunos de los cambios registrados -principalmente en la fase acuosa- no pudieron ser atribuidos a la interacción de proteínas con productos de la oxidación, mientras que los cambios en fase orgánica, posiblemente relacionados con la oxidación se registraron a tiempos avanzados de los respectivos almacenamientos. Dado que la detección de compuestos fluorescentes es un método muy sensible -más sensible que el TBA-, los resultados encontrados sugieren que no ocurrió una reacción significativa de los productos secundarios de la oxidación con grupos amino en el músculo de salmón de mar. Entre las posibles causas de este comportamiento, puede sugerirse que los niveles de productos secundarios generados en esta especie magra no son suficientes para producir alteraciones proteicas detectables. Por otra parte, esta información -obtenida en ausencia y en presencia de antioxidante- replantea los resultados obtenidos en otros estudios donde todos

los cambios en los compuestos fluorescentes eran atribuidos al proceso de oxidación lipídica. Posiblemente, puedan existir en el músculo otras reacciones que generen este tipo de compuestos.

- ❖ Se analizó el efecto del agregado de un antioxidante de origen natural tal como el extracto de romero en el músculo picado refrigerado y congelado. Las dos concentraciones utilizadas (200 y 500 ppm) mostraron ser eficientes en la inhibición de la formación de productos secundarios de la oxidación lipídica reactivos al TBA así como en la preservación de los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ 3, en ambos sistemas. La mayor concentración mostró ser más eficiente, principalmente en el almacenamiento congelado donde permitiría un almacenamiento de aproximadamente 6 meses sin una evolución apreciable de dichos productos de oxidación. Ambas concentraciones mostraron también efectos positivos en la preservación del color del músculo, inhibiendo parcialmente la pérdida de color rojo. Estos resultados abren un promisorio futuro para la aplicación de este tipo de antioxidante a productos formulados con músculo de salmón de mar picado, tales como podrían ser productos tipo hamburguesas u otros que posteriormente deban ser almacenados en refrigeración o congelación antes de su consumo. Además, sería interesante evaluar la efectividad del extracto de romero al aplicarlo en trozos de músculo entero, tales como rodajas o filetes, ya que en estos casos la aplicación sería superficial.
- ❖ La oxidación de los lípidos en el músculo no tuvo consecuencias detectables en la estructura de las proteínas miofibrilares comparables a las observadas en los sistemas modelo. Este hecho podría estar relacionado con las diferentes condiciones presentes en los distintos sistemas. Una diferencia fundamental fue la concentración de malonaldehído, mucho mayor en los sistemas modelo que el nivel alcanzado en el músculo, siendo probablemente más importante la concentración relativa de dicha sustancia con respecto a la de las proteínas miofibrilares. Por otra parte, en el músculo existen barreras físicas dadas por la estructura tisular que podrían dificultar la interacción proteínas -

lípidos oxidados, con respecto a la reacción en una solución como en el caso de los sistemas modelo. Además, en el músculo pueden estar presentes otras sustancias que podrían reaccionar con el malonaldehído y otros productos oxidados neutralizándolos e impidiendo su reacción con las proteínas.

# V. Bibliografía





**V. BIBLIOGRAFIA**

1. Ackman, R. G. (1980) Fish lipids. Part I. En: *Advances in fish science and technology*; ed. J. J. Connell, Staff of the Torry Research Station; Fishing news books, Ltd, Inglaterra; pp. 86.
2. Ackman, R. G. (1982). Fatty acid composition of fish oils. En: *Nutritional evaluation of long-chain fatty acids in fish oils*; ed. S. M. Barlow y M. E. Stansby; Academic Press, New York, USA; pp. 25.
3. Ackman, R. G. (1988). Concerns for utilization of marine lipids and oils. *Food Tech.*; pp. 151.
4. Alasnier, C.; Meynier, A.; Viau, M y Gandemer, G. (2000). Hydrolytic and oxidative changes in the lipids of chicken breast and thigh muscles during refrigerated storage. *J.Food Sci* 65, 1, 9.
5. Amlacher, E. (1961). Rigor-mortis in fish. En: *Fish as food*, vol.I; ed.: G. Borgstrom, Academic Press, New York, USA; pp. 345.
6. Anderson, M. L. y Ravesi, E. M. (1970). On the nature of the association of protein in frozen-stored cod muscle. *J. Food Sci.* 35, 551.
7. Arntfield, S. D.; Ismond, M. A. H. y Murray, E. D. (1990). Thermal analysis of food proteins in relation to processing effects. En: *Thermal analysis of foods*, cap. 3; ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York, USA; pp 51.
8. Arvidson, G.A.E. (1968) Structural and metabolic heterogeneity of rat liver glycerophosphatides. *Eur. J. Biochem.*, 4, 478.
9. ASTM E967-83 (1984). Standard practice for temperature calibration of differential scanning calorimeters and differential thermal analyzers. *Annual book of standards*, 14, 02, 782.
10. ASTM E968-83 (1984). Standard practice for heat flow calibration of differential scanning calorimeters. *Annual book of standards*, 14, 02, 788.
11. Aubourg, S.P.; Pérez-Martín, R.; Medina, I. Y Gallardo, J. (1992a). Fluorescence formation by interaction of albacore (*Thunnus alalunga*) muscle with acetaldehyde in a model system. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1805.
12. Aubourg, S.P.; Sotelo, C. G. y Pérez-Martin, R. (1992b). Assessment of quality in frozen sardine (*Sardina pilchardus*) by fluorescence detection. *J. Am. Oils Chem. Soc.* 75 (5), 575.

13. Aubourg, S.P.; Medina, I. y Pérez Marín, R. (1995). A comparison between conventional and fluorescence methods of cooking-induced damage to tuna fish lipids. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 200, 252.
14. Aubourg, S.P. y Medina, I. (1997). Quality differences assessment in canned sardine (*Sardina pilchardus*) by fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3617.
15. Aubourg, S.P.; Sotelo, C. G. y Gallardo, J. (1997). Quality assessment of sardines during storage by measurement of fluorescence compounds. *Ibid.* 62, 295.
16. Aubourg, S.P.; Medina, I. y Gallardo, J. M. (1998). Quality assesment of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) during chilled storage by monitoring lipid damages. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3662.
17. Aubourg, S. P. (1999a). Recent advances in assessment of marine lipid oxidation by using fluorescence. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 4, 409.
18. Aubourg, S. P. (1999b). Lipid damage detection during the frozen storage of an underutilized fish species. *Food Res. Int.* 32, 497.
19. Aubourg, S.P. y Medina, I. (1999). Influence of storage time and temperature on lipid deterioration during cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) frozen storage. *J. Sci. Food and Agric.* 79, 1943.
20. Aubourg, S.P.; Rey-Mansilla, M. y Sotelo, C. G. (1999). Differential lipid damage in various muscle zones of frozen hake (*Merluccius merluccius*). *Z. Lebensm. Unters Forsch A* 208, 189.
21. Awad, A.; Powrie, W. D. y Fennema, O. (1969). Deterioration of fresh-water whitefish muscle during frozen storage at  $-10^{\circ}\text{C}$ . *J. Food Sci.*, 34, 1.
22. Badii, F. y Howell, N. K. (2002). Changes in the texture and structure of cod and haddock fillets during frozen storage. *Food Hydrocolloids* 16, 4, 313.
23. Barlow, S. (1987). Beneficial medical effects of fish oils. *Infofish Marketing Digest* (1), 38.
24. Beas, V. E.; Wagner, J. R.; Crupkin, M. and Añón, M. C. (1990). Thermal denaturation of hake (*Merluccius hubbsi*) myofibrillar proteins. A diferential scanning calorimetric and electrophoretic study. *J. Food Sci.* 55, 683.
25. Bensadoun, A. y Weinstein, D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 70, 241.

26. Bligh, E. y Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911.
27. Booth, V. H. (1971). Problems in the determination of FDNB-available lysine. *J. Sci. Food Agric.* 22, 658.
28. Botsoglou, N. A.; Fletouris, D. J.; Papageorgiou, G. E.; Vassilopoulos, V. N.; Mantis, A. J. y Trakatellis, A. G. (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1931.
29. Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Tech.*, julio, 62.
30. Bouzas, J; Kamarei, A. y Karel, M. (1985). Effect of extraction procedures on fluorescent cromophores in milk. *J. Food Sci.* 50, 1515.
31. Bracco, U.; Loliger, J. y Viret, J. L. (1981). Production and use of natural antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 58, 686.
32. Braddock R. J. y Dugan L. R. (1973). Reaction of autoxidizing linoleate with coho salmon myosin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 50, 343.
33. Bremner, H. A. y Hallet, I. C. (1985). Muscle fiber-connective tissue junctions in the fish blue grenadier (*Macruronus novaezelandiae*). A scanning electron microscope study. *J. Food Sci.* 50, 975.
34. Buttkus H. (1967). The reaction of myosin with malonaldehyde. *J. Food Sci.* 32, 432.
35. Calvo, C y Durán, L (1997). Propiedades físicas II. Ópticas y color. En: *Temas en Tecnología de Alimentos*; J. M. Aguilera ed.; Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), Instituto Politécnico Nacional, México; pp 261.
36. Careche, M.; Del Mazo, M. L.; Torrejón, P. y Tejada, M. (1998). Importance of frozen storage temperature in the type of aggregation of myofibrillar proteins in cod (*Gadus morhua*) filets. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1539.
37. Cassens, R. G. (1976). Estructura microscópica de los tejidos animales. En: *Ciencia de la carne y los productos cárnicos*, cap. 2; eds.: J. F. Price y B. S. Schweigert; Acribia, España.
38. Chan, J. K.; Gill, T. A. y Paulson, A. T. (1992a). Cross-linking of myosin heavy chains from cod, herring and silver hake during thermal setting. *J. Food Sci.* 57, 906.
39. Chan, J. K.; Gill, T. A. y Paulson, A. T. (1992b). The dynamics of thermal denaturation of fish myosins. *Food Res. Int.* 25, 117.

40. Chio S. y Tappel A. L. (1969a). Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. *Biochem.* 8, 2821.
41. Chio S. y Tappel A. L. (1969b). Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malonaldehyde. *Biochem.* 8, 2827.
42. Chipault, J. R.; Mizuno, G. R., Hawkins, J. M. y Lundberg, W. O. (1952). *Food Res.* 17, 46.
43. Connell, J.J. (1961). The relative stabilities of the skeletal muscle myosins of some animals. *Biochem. J.* 80, 503.
44. Connell, J.J. (1962). Changes in amount of myofibrillar extractable from cod flesh during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.* 13, 607.
45. Consejo Federal de Inversiones (CFI).  
[http://www.cfired.org.ar/esp2/sectores/pesca/f\\_pesca.htm](http://www.cfired.org.ar/esp2/sectores/pesca/f_pesca.htm).
46. Contreras Guzmán, E (2002). *Bioquímica de pescados e invertebrados*. Ed: CECTA – USACH, Santiago, Chile.
47. Contreras Guzmán, E (2003). Determinación de lisina disponible (comunicación oral).
48. Conway, E. J. y Byrne, A. (1933). An absorption apparatus for the microdetermination of certain volatile substances. 1. The micro-determination of ammonia. *Biochem. J.* 27, 419.
49. Cousseau, M. B. y Perrota, R. G. (2003). Peces marinos de Argentina. Biología, distribución y pesca. INIDEP. <http://www.inidep.edu.ar/peces-argentina/peces.htm>.
50. Cowie, W. P. (1968). Identification of fish species by thin-slab polyacrilamide gel electrophoresis of the muscle myogens. *J. Sci. Food Agric.* 19, 226.
51. Christie (1982). *Lipid Analysis*, 2nd edition WW. Pergamon Press.
52. Crosgrave, J. P.; Church, D. F. y Pryor, W. A. (1987). The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 22, 299.
53. Crupkin, M.; Barassi, C. A.; Argüello, J. M. Y Trucco, R. E. (1982). Effect of post-rigor fish storage on ice on physicochemical properties of actomyosin. *J. Sci. Food Agric.* 33, 1129.
54. Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides and proteins. En: *Food Chemistry*, Cap. 15. Ed. O. Fennema. Marcel Dekker, Inc. , New York, USA; pp 321.

55. Davidovich, L. A.; Soulé, C. L. y Lupín, H. M. (1980). Kinetics of fish meal oxidación. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 43.
56. Davies, J. R.; Bardsley, R. G.; Ledward, D. A. y Poulter, R. G. (1988). Myosin thermal stability in fish muscle. *J. Sci. Food Agric.* 45, 61.
57. Davies, J. R.; Ledward, D. A.; Bardsley, R. G. y Poulter, R. G. (1994). Species dependence of fish myosin stability to heat and frozen storage. *Int. J. Food Sci. and Tech.*, 29, 287.
58. Davis, H. K. (1982). Fluorescence of fish muscle: description and measurement of changes occurring during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.* 33, 1135.
59. Davis, H. K. y Reece, P. (1982). Fluorescence of fish muscle: causes of change occurring during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.* 33, 1143.
60. Decker, E.; Xiong, Y., Calvert, A.; Crum, A. and Blanchard, S. (1993). Chemical, physical and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. *J. Agric. Food Chem.* 41, 186.
61. Del Mazo, M. L.; Torrejón, P. Careche, M. y Tejada, M. (1999). Characteristics of the salt-soluble fraction of hake (*Merluccius merluccius*) fillets stored at -20 and -30 °C. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1372.
62. Dondero, M. (1990). Comportamiento bioquímico de las proteínas de pescado almacenadas bajo 0 °C. En: *Bioquímica y tecnología de la aplicación del frío en alimentos*. Ed: Marta Dondero, Valparaíso, Chile. pp 49.
63. Dyer, W. J.; French, H. V. y Snow, J. M. (1950). Proteins in fish muscle. I. Extraction of proteins fractions in fresh fish. *J. Fish. Res. Bd. (Canadá)* 7, 585.
64. Dyer, W. J. y Fraser, D. I. (1959). Proteins in fish muscle. 13. Lipid hydrolysis. *J. Fish. Res. Bd. (Canadá)* 16, 43.
65. Ehira, S. y Uchiyama, H. (1987). Determination of fish freshness using the K value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness. En: *Seafood quality determination*; eds: D. E. Kramer y J. Liston; Elsevier Sci. Publishers B. V., Amsterdam; pp. 185.
66. Elías, I. y Burgos, G. (1988). Edad y crecimiento del "salmón de mar" , *Pseudoperca semifasciatus* (Cuvier, 1829) (*Osteichthyes, Pinguipedidae*) en aguas norpatagónicas argentinas. *Rev. Biol. Mar.* 27 (1), 133.
67. Elías, I. y Rajoy, C. (1992). Hábitos alimentarios del "salmón de mar" , *Pseudoperca semifasciatus* (Cuvier, 1829): *Pinguipedidae* en aguas norpatagónicas argentinas. *Inv. Pesq.* 52 (4), 533.

68. Fiszman S. M., Pons M., Damásio, M. H. (1998). New parameters for instrumental texture profile analysis: instantaneous and retarded recoverable springiness. *J. Texture Studies* 29: 499.
69. Fletcher, B.; Dillard, C. y Tappel, A. (1973). Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.* 52, 1.
70. Foegeding, E. A.; Lanier, T. C. and Hultin; H. O. (1996). Characteristics of edible muscle tissues. En : *Food Chemistry*, Cap. 15. Ed. O. Fennema. Marcel Dekker, Inc., New York, USA; pp 879.
71. Frankel, E. N. (1998). *Lipid Oxidation*, ed.: The Oily Press; Dundee, Scotland.
72. Fundación Atlántica (1984). El mar Argentino exporta, Mar del Plata, pp 235
73. Goll, D. E. y Robson, R. M. (1967). Molecular properties of post mortem muscle. 1. Myofibrillar nucleoside triphosphatase activity of bovine muscle. *J. Food Sci.* 32, 323.
74. Gonzalez, R. (1995). Biología y ecología del salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*) en el golfo San Matías. Tesis doctoral, Universidad Nacional del Sur.
75. Gram, L. (1992). Evaluation of the bacteriological quality of seafood. *J. Food Microbiol.* 16, 25.
76. Hall, C. A.; Cuppett, S. L. y Dussault, P. (1998). Hydrogen-donating mechanism of rosmariquinone, an antioxidant found in rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 9, 1147.
77. Han, T. y Liston, J. (1988). Correlation between lipid peroxidation and phospholipid hydrolysis in frozen fish muscle. *J. Food Sci.* 53, 1917.
78. Hansen, L. T.; Gill, T.; Rontved, S. D. y Huss, H. H. (1996). Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food. Res. Int.* 29. 2, 181.
79. Hardy, R. y Keay, J. N. (1972). Seasonal variations in the chemical composition of Cornish mackerel (*Scomber scombrus*) , with detailed reference to the lipids. *J. Food Techn.* 7, 125.
80. Hasegawa, K.; Endo, Y. y Fuyimoto, K. (1992). Oxidative deterioration in dried fish model systems assessed by solid sample fluorescence spectrophotometry. *J. Food Sci.* 57, 1123.
81. Hastings, R. J.; Rodger, G. W.; Park, R.; Matthews, A. D. y Anderson, E. M. (1985). Differential scanning calorimetry of fish muscle: The effect of processing and species variation. *J. Food Sci.*, 50, 503.

82. Herrero, A. M.; Carmona, P. y Careche, M. (2004). Raman spectroscopic study of structural changes in hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle proteins during frozen storage. *J Agric. Food Chem.* 52, 2147.
83. Howell, B. K., Matthews, A. D. y Donnelly, A. P. (1991). Thermal stability of fish myofibrils: a differential calorimetric study. *Int. J. Food Sci. and Techn.* 26, 283.
84. Hoyland, D. V. y Taylor, A. J. (1991). A review of the methodology of the 2-thiobarbituric acid test. *Food Chemistry* 40, 271-291.
85. Hozbor, C. M. (1999). Correlación de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*) almacenado a 0 °C. Tesis de grado, Licenciatura en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Mar del Plata.
86. Hultin H. (1976). Characteristics of muscle tissue. En: *Principles of Food Science, part I : Food Chemistry*; ed.: Fennema, O., Marcel Dekker, Inc. , New York. pp 577.
87. Hultmann, L. y Rustad, T. (2004). Iced storage of Atlantic salmon (*salmo salar*) – effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *Food Chem.* 87, 31.
88. Huss, H. H.; Dalgaard, P. y Gram, L. (1997). Microbiology of fish and fish products. En: *Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality*; eds.: J. Luten, T. Borrensen y J. Oehlenschläger, Elsevier Science B. V., Amsterdam; pp 413.
89. Huss, H. H. (1998). *El pescado: su calidad y cambios de su calidad*. FAO Documento Técnico de Pesca N ° 348. Roma.
90. Introzzi, A. (1995). Aceites marinos. Su relación con la aterosclerosis y la nutrición humana. *Aceites y Grasas*, 114.
91. Ironside, J. I. M. y Love, R. M. (1958). Studies on protein denaturation of frozen fish, I-Biological factors influencing the amounts of soluble and insoluble protein present in the muscle of North Sea cod. *J. Sci. Food Agric.* 9, 579.
92. Ishikawa, S.; Nakamura, K. y Fujii (1979). Fish jelly product (kamaboko) and frozen minced meta (frozen surimi) made of sardine. Influence of the treatment methods for material just after catch on the kamaboko forming ability of sardine meat. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 99, 31.
93. Jacquot, R. (1961). Organic constituents of fish and other aquatic foods. In: *Fish and Food*, vol. I; ed.: G. Borgstrom. Academic Press; New Yor, USA; pp 146.
94. Jarenbäck, L. y Liljemark, A. (1975). Ultrastructural changes during frozen storage of cod (*Gadus morhua* L.). *J. Food Techn.* 10, 437 .

95. Jones, N. R.; Burt, R. J.; Murray, J. y Stroud, D.G. (1965). Nucleotides and the analytical approach to the rigor-mortis problem. En: *The technology of fish utilization*; ed.: R. Kreuzer, Fishing News Books Ltd, Londres, Inglaterra, pp. 14.
96. Kamarei, A. R. y Karel, M. (1984). Assessment of autoxidation in freeze-dried meats by a fluorescence assay. *J. Food Sci.* 49, 1517.
97. Karel, M. (1973). Symposium: Protein interactions in food biosystems. Protein – lipid interactions. *J. Food Science* 38, 756.
98. Ke, P. J.; Cervantes, E. y Robles-Martínez, C. (1984). Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in fish tissue by an improved distillation-spectrophotometric method. *J. Sci. Food Agric.* 35, 1248.
99. Kilugawa, K.; Machida, Y.; Kida, M. y Kurechi, T. (1981). Studies on peroxidized lipids III. Fluorescent pigments derived from the reaction of malonaldehyde and amino acids. *Chem. Pharm. Bull.* 29, 10, 3003.
100. Kilugawa, K.; Takayanagi, K. y Watanabe, S. (1985). Polylisines modified with malonaldehyde, hydroperoxylinoleic acid and monofunctional aldehydes. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 5437.
101. Kilugawa, K. y Beppu, M. (1987). Involvement of lipid oxidation products in the formation of fluorescent and cross-linked proteins. *Chem. Physics Lipids* 44, 277.
102. Konosu, S. y Yamaguchi, K. (1982). The flavour components in fish and shellfish. En: *Chemistry and biochemistry of marine food products*; ed. R. E. Martin y col., AVI Publishing Co., Westport, Connecticut; pp. 367.
103. Kuusi T., Nikkilä, O. E., y Savolainen, K. (1975). Formation of malonaldehyde in frozen Baltic herring and its influence on the changes in proteins. *Z Lebensm Unter-Forsch* 159: 285.
104. Kwon T. W., Menzel D. B. y Olcott H. S. (1965). Reactivity of malonaldehyde with food constituents. *J Food Sci* 30, 808.
105. Labuza, T. P.; McNairy, L.; Gallagher, D., Hawekes, J. y Hurtado, F. (1972). Stability of intermediate moisture foods. I. Lipid oxidation. *J. Food Sci.* 37, 154.
106. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227, 680.
107. Lanier, T. C. (1986). Functional properties of surimi. *Food Tech.*, 107.



108. Leal T., Sambucetti M. E. (1987). Comparación de dos variantes del método de Carpenter para la determinación de lisina disponible. *Rev Asoc Bioq Arg* 51, 1.
109. Lee, C. M. (1986). Surimi manufacturing and fabrication of surimi-based products. *Food Techn.*, 115.
110. Lefèvre F, Fauconneau B, Ouali A, Culioli J. (1998). Thermal gelation of brown trout myofibrils: Effect of muscle type, heating rate and protein concentration. *J Food Sci* 63, 299.
111. Leinot, A. y Cheftel, J. C. (1990). Influence of fishing season and of chilled or frozen storage of sardine on the solubility and gelling properties of myofibrillar proteins. En: *Chilling and freezing of new fish products*. International Institute of Refrigeration eds; Paris, Francia; pp 37.
112. Lindberg Madsen, H. y Bertelsen, G. (1995). Spices as antioxidants. *Trends in Food Sci. & Tech.* 6, 271.
113. Li, S. J. y King, A. (1996). Lipid oxidation and myosin denaturation in dark chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3080.
114. Li S. J. y King A. (1999). Structural changes of rabbit myosin subfragment 1 altered by malonaldehyde, a byproduct of lipid oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3124.
115. Liu, G. y Xiong, Y. (2000). Electrophoretic pattern, thermal denaturation and in vitro digestibility of oxidized myosin. *J. Agric. Food Chem.* 48, 624.
116. Liu, Y. M.; Lin, T. S. y Lanier, T. C. (1982). Thermal denaturation and aggregation of actomyosin from Atlantic croaker. *J. Food Sci.* 47, 1916.
117. Love, R. M. (1967). The effect of initial freezing temperature on the behaviour of cod muscle proteins during subsequent storage: a histological study of homogenates. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish* 33, 746.
118. Love, R. M. (1970). *The chemical biology of fishes*. Academic Press, London, UK.
119. Love, R. M. (1975). Variability of Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the Northeast Atlantic: a review of seasonal and environmental influences on various attributes of fish. *J. Fish. Res. Board Canadá* 32, 2333.
120. Lozano V. S. de, Morales A. (1983). *Introducción a la microscopía electrónica*. Centro Regional de Investigaciones Básicas y Aplicadas de Bahía Blanca (CRIBABB). I.S.B.N. 950-43-2205-0.

121. Lund, K. E. y Nielsen, H. H. (2001). Proteolysis in salmon (*Salmo salar*) during cold storage. Effects of storage time and smoking process. *J. Food Biochem.* 25, 5, 379.
122. Lupano C. E. (2000). Gelation of mixed systems whey protein concentrate-gluten in acidic conditions. *Food Research Int.* 33: 691.
123. Macchi, G. J.; Elías, I. y Burgos, G. (1995). Histological observations on the reproductive cycle of the Argentinian sandperch, *Pseudoperca semifasciata* (Osteichthyes, Pinguipedidae). *Scientia Marina* 59, 1, 1.
124. Maciolek, J. A. (1962). Res. Rep. 60 US Dept. Int. Fish and W. Serv., modificado por Inst. Biol. Marina (Mar del Plata, Argentina).
125. Mackie, I. (1993). The effects of freezing on flesh proteins. *Food Reviews Intern.* 9, 575.
126. Mascheroni, R. H. (1977). Transferencia de calor con simultáneo cambio de fase en tejidos cárneos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
127. Massa, A. E.; Palacios, D.; Paredi, M. E. y Crupkin, M. (2002). Vida útil de salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*) almacenado en hielo. *Primeras Jornadas Regionales de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, Balcarce, Universidad Nacional de Mar del Plata.
128. Matsumoto, J.J. (1979). Denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. En: "Proteins at low temperatures". Ed. O. Fennema. *Advances in chemistry series*, N° 180. Am. Chem. Soc., Washington, D.C.
129. Matsumoto, J.J. (1980). Chemical deterioration of muscle proteins during frozen storage. En: "Chemical deterioration of proteins". Eds. J. Whitaker y M. Fujmaki. *AcS Symposium series*, N° 123, 95. Am. Chem. Soc., Washington, D.C.
130. Miyagawa, K.; Hirai, K. y Takeoze, R. (1991). Tocopherol and fluorescence levels in deep-frying oil and their measurement for oil assessment. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 163.
131. Montero, P y Borderías, J. (1989). Distribution and hardness of muscle connective tissue in hake (*Merluccius merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 189, 530.
132. Montero, P y Borderías, J. (1990). Gelification of collagenous material from muscle and skin of hake (*Merluccius merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb) according to variation in pH and the presence of NaCl in the medium. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 191, 11.

133. Morrison W. R. y Smith L. M. (1964). Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride. *J. Lipid Res.* 5, 600.
134. Muramoto, M.; Yamamoto, Y. Y Seki, N. (1989). Comparison of calpain of various fish myosins in relation to their thermal stabilities. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 55, 917.
135. Nair, V.; Vietti, D. y Cooper, C. (1981). Degenerative chemistry of malonaldehyde. Structure, stereochemistry and kinetics of formation of enaminals from reaction with amino acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3030.
136. Nair, V.; Cooper, C.; Vietti, D. y Turner, G. (1986). The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malonaldehyde. *Lipids* 21, 6-10.
137. Nakatani, N. (1997). Antioxidants from spices and herbs. En: *Natural antioxidants*, cap. 4; ed. F. Shahidi, AOAC press, Illinois, USA.
138. Nakhost, Z. and Karel, M. (1983). Changes in bovine myoglobin due to interaction with methyl linoleate in a model system. *J. Food Sci.* 48, 1335.
139. Nawar, W. W. (1996). Lipids. En: *Food Chemistry*, Cap. 15. Ed. O. Fennema. Marcel Dekker, Inc. , New York, USA; pp 879-942.
140. Niwa, E. (1975). Role of hydrofobic bonding in gelation of fish flesh paste. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 48, 907.
141. Offord, E. A.; Guillot, F.; Aeschbach, R. Loliger, J. y Pfeifer, A. M. A. (1997). Antioxidant and biological properties of rosemary components: Implications for food and health. En: *Natural antioxidants*, cap. 6; ed. F. Shahidi, AOAC press, Illinois, USA.
142. Paredi, M. E.; Tomás, M. C.; Crupkin, M. y Añón, M. C. (1994). Thermal denaturation of *Aulacomya ater ater* (Molina) myofibrillar proteins. Differential scanning calorimetric (DSC) study". *J. Agric. Food Chem.* 42 (4), 873.
143. Paredi, M. E.; Tomás, M. C.; Añón, M.C. and Crupkin, M. (1998). Thermal stability of myofibrillar proteins from smooth and striated muscles of scallop (*Chlamys tehuelchus*): A differential scanning calorimetric study. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3971.
144. Paredi, M. E.; Tomás, M. C. y Crupkin, M. (2002). Thermal denaturation of striated and smooth adductor muscle of scallop (*Ziglochlamys patagonica*). A differential scanning calorimetric study (DSC)". *J. Agric. Food Chem.* 50, 830.

145. Pearson, A. M.; Gray, J.I.; Wolzak, A. M. y Horenstein, N.A. (1983). Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. *Food Technology* 7, 121
146. Peleg M. (1979). Characterization of the stress relaxation curves of solid foods. *J Food Sci* 44: 277.
147. Pérez-Villarreal, B. y Howgate, P. (1991). Deterioration of european hake (*Merluccius merluccius*) during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.* 55, 455.
148. Petruccelli, S. and Añón, M. C. (1995). Soy protein isolate components and their interactions. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1762.
149. Pikul, J.; Leszczynski, D. E. y Kummerow, F. A. (1983). Elimination of sample autoxidation by butylated hydroxitoluene additions before thiobarbituric acid assay for malonaldehyde in fat from chicken meat. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 1338.
150. Pikul, J.; Leszczynski, D. E. y Kummerow, F. A. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1309-1313.
151. Pikul, J.; Leszczynski, D. E.; Niewiarowicz, y Kummerow, F. A. (1984). Lipid oxidation in chicken breast and leg meat after sequential treatments of frozen storage, cooking, refrigerated storage and reheating. *J. Food Tech.* 19, 575-584.
152. Pokorny, J. y Dieffenbacher, A. (1989). Determination of 2-thiobarbituric acid value: direct method. *Pure & Appl. Chem.*, 61, 1165.
153. Pokorny, J.; Réblová, Z.; Kourimská, L.; Pudil, F. y Kwiatkowska, A. (1993). Effect of interactions with oxidized lipids on structure change and properties of foods proteins. In *Food Proteins: structure and functionality*. K.D. Schwenke, Mothes, R. Weinheim, VCH; 232.
154. Poulter, R. G.; Ledward, D. A., Godber, S. Hall, G. y Rowlands, B. (1985). Heat stability of fish muscle proteins. *J. Food Tech.*, 20, 203-217.
155. Puppo M. C. y Añón M. C. (1998). Effect of pH and protein concentration on rheological behavior of acidic soybean protein gels. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3039.
156. Raharjo, S.; Sofos, J. N. y Schmidt, G. R. (1993). Solid-phase acid extraction improves thiobarbituric acid method to determine lipid oxidation. *J. Food Sci.*, 4, 921.
157. Rhee, K. S. (1978). Minimisation of further lipid peroxidation in the distillation 2-thiobarbituric acid test of fish and meat. *J. Food Sci.*, 43, 1776.

158. Redes de la industria pesquera argentina (2004), N°136, ed. Segmentos S. A., Buenos Aires.
159. Richards, M. P.; Ostdal, H. y Andersen, H. J. (2002). Deoxyhemoglobin-mediated lipid oxidation in washed fish muscle. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1278-1283.
160. Richards, M. P. y Hultin, H. O. (2003). Effect of added hemolysate from mackerel, herring and rainbow trout on lipid oxidation of washed cod muscle. *Fish. Sci.* 69, 1298.
161. Riedel, L. (1957). Kalorimetrische Untersuchungen über das Gefrieren von Fleisch. *Kältetechnik* 9, 38
162. Robson, R. M.; Goll, D. E. y Temple, M. J. (1968). Determination of protein in Tris buffer by the biuret reaction. *Anal Biochem* 24: 339.
163. Roura S.; Saavedra .; Trucco R. y Crupkin M. (1992). Electron microscopical and biochemical studies of actomyosin from pre- and post-spawned hake. *Comp Biochem Physiol* 101B 3: 361.
164. Roura, S. I. (1992). Propiedades bioquímicas y funcionales de las proteínas miofibrilares de la merluza (*Merluccius hubsi*) de pre- y post- desove. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.
165. Roussel, H. y Chefftel, J.C. (1988). Characteristics of surimi and kamaboko from sardines. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 607.
166. Roussel, H. y Chefftel, J.C. (1990). Mechanism of gelation of sardine proteins: influence of thermal processing and of various additives on the texture and protein solubility of kamaboko gels. *Int. J. Food Sci. Technol.* 25: 260.
167. Salih, A. M.; Smith, D. M.; Price, J. F. y Dawson, L. E. (1987). Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poultry Sci.* 66, 1483.
168. Samejima, K.; Ischioroshi, M. y Yasui, T. (1980). Effect of myosin-actin interaction on the heat-induced gelation of myosin in the presence of F-actin. *Abstr. A-12, 26<sup>th</sup>. Ann. Meeting, European Meat Res. Workers, Colorado. Springs, Co.*
169. Samejima K.; Ishioroshi, M. y Yasui T. (1981). Relative roles of the head and tail portions of the molecule in heat-induced gelation of myosin. *J. Food Sci.* 46: 1412.
170. Saito, T.; Arai, K. y Matsuyoshi, M. (1959). A new method for estimating the freshness of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 24, 749.

171. Sano, T.; Noguchi, S. F. y Matsumoto, J. J. (1988). Dynamic viscoelastic behaviour of natural actomyosin and myosin during thermal gelation. *J. Food Sci.* 53, 924.
172. Sano, T.; Ohno, T.; Otsuka-Fuchino, H.; Matsumoto, J. J. y Tsuchiya, T. (1994). Carp natural actomyosin: thermal denaturation mechanism. *J. Food Sci.* 59: 1002.
173. Shahidi, F. (1997). Natural antioxidants: An overview. En: *Natural Antioxidants*, cap. 1, ed. : F. Shahidi, AOCS Press, Illinois, USA.
174. Sharp A. y Offer G. (1992). The mechanism of formation of gels from myosin molecules. *J. Sci Food Agric.* 58: 63.
175. Shenouda, S. Y. K. (1980). Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. *Adv. Food. Res.* 26, 275.
176. Shewan, J. M. (1977). The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. En: *Proceedings of the Conference on Handling, Processing and Marketing of Tropical fish.* , Tropical Products Institute, London; pp 51.
177. Shewfelt, R. L. (1981). Fish muscle lipolysis – A review. *J. Food Biochem.* 5, 79.
178. Simidu, W. (1961). Nonprotein nitrogenous compounds. En: *Fish as food*; ed. G. Borgstrom, Academic Press, New York y London; vol. I, pp. 353.
179. Sinnhuber, R. O.; Yu, T. C. y Yu, T. C. (1958). Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Food Res.* , 23, 626.
180. Sinnhuber, R. O. y Yu, T. C. (1977). The 2-thiobarbituric acid reaction, an objective measure of the oxidative deterioration occurring in fats and oils. *J. Jap. Oil Chem. Soc.*, 26, 259.
181. Siu, G. M. y Draper, H. H. (1978). A survey of the malonaldehyde content of retail meats and fish. *J. Food Sci.*, 43, 1147.
182. Slavin, J. W. (1968). Frozen fish: Characteristics and factors affecting quality during freezing and storage. En: *The freezing preservation of foods*, vol. 2, Factors affecting quality in frozen foods, cap. 8; eds.: D. K. Tressler, W. B. Van Arsdel y M. J. Copley, The avi publishing company, Inc., Westport, Connecticut, USA.
183. Smith D. M. (1987). Functional and biochemical changes in deboned turkey due to frozen storage and lipid oxidation. *J. Food Sci.* 52: 22.

184. Smith, G.; Hole, M.; Hanson, S. (1990). Assessment of lipid oxidation in Indonesian salted-dried marine catfish (*Arius thalassinus*). *J. Sci. Food Agric.* 51, 194.
185. Sotelo, C. G. y Rehbein, H. (2000). TMAO – degrading enzymes. En: *Seafood enzymes. Utilization and influence in postharvest seafood quality*. Ed. N. Haard y B. Simpson; Marcel Dekker, Inc; New York, USA; pp 167.
186. Srinivisan, S. and Hultin, H. (1995). Hydroxyl radical modification of fish muscle proteins. *J. Food Biochem.* 18, 405-425.
187. Srinivisan, S. y Hultin, H. (1997). Chemical, physical and functional properties of cod proteins modified by a nonenzymic free-radical-generating system. *J. Agric. Food Chem.* 45, 310.
188. Stansby, M.E. (1962). Proximate composition of fish. En: *Fish in nutrition*; eds.: E. Heen y R. Kreuzer, Fishing new books Ltd., London, Inglaterra, pp. 1.
189. Steffe, J. F. (1996). Viscoelasticity. En: *Rheological methods in food process engineering*, cap. 5; ed. J. F. Steffe, Freeman Press, MI, USA, pp 294.
190. Tappel, A. (1980). Measurement of and protection from in vivo lipid peroxidation. En: *Free radical in Biology*, Pryor, W ed; Academic Press, New York, USA, vol. 4, pp 1.
191. Tarladgis, B. G.; Watts, B. M.; Younathan, M. T. y Dugan, L. jr. (1960). A distillation method for the cuantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 39, 44.
192. Tomás, M. C. y Funes, J. (1987). Application of 2-thiobarbituric acid reaction to exudates of frozen and refrigerated meats. *J. Food Sci.* 52, 3, 575.
193. Tomás, M. C. (1988). Oxidación lipídica en carnes refrigeradas y congeladas. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
194. Tsuchida, M.; Miura, T.; Mizutani, K. Y Aibara, K. (1985). Fluorescent substance in mouse and human sera as a parameter of in vivo lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Acta* 834, 196.
195. Uchiyama, M. y Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, 86, 271.
196. Valenzuela, A.; Sanhueza, J. y Garrido, A. (1999). Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3. Cuando y porqué es necesaria la suplementación con estos ácidos grasos. *Aceites y Grasas*, junio, 294.

197. Vyncke, W. (1970). Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrich.*, 12, 1084.
198. Visessanguan, W.; Ogawa, M.; Nakai, S. y An, H. (2000). Physicochemical changes and mechanism of heat-induced gelation of Arrowtooh flounder myosin. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1016.
199. Wagner, J. (1986). Desnaturalización de proteínas de músculo bovino durante la congelación y el almacenamiento en estado congelado. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
200. Wagner, J. R. y Añón, M.C. (1985). Effect of freezing rate on the denaturation of myofibrillar proteins. *J. Food Technol.* 20, 735.
201. Wagner, J. R. y Añón, M.C. (1986a). Effect of frozen storage on protein denaturation in bovine muscle. I. Myofibrillar ATPase activity and differential scanning calorimetric studies. *J. Food Technol.* 21, 9.
202. Wagner, J. R. and Añón, M.C. (1986b). Effect of frozen storage on protein denaturation in bovine muscle. II. Influence on solubility, viscosity and electrophoretic behaviour of myofibrillar proteins. *J. Food Technol.* 21, 547.
203. Wetterskog, D. y Undeland, I. (2004). Loss of redness ( $a^*$ ) as a tool to follow hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed cod mince. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7214.
204. Wilkinson, L. (1990). *Systat. The system for statistics*; SYSTAT, Inc.; Evanston, IL,.
205. Witte, V. C.; Krause, G. F. y Bailey, M. E. (1970). A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *J. Food Sci.*, 35, 582.
206. Wold, J. P. y Mielnik, M. (2000). Nondestructive assessment of lipid oxidation in minced poultry meat by autofluorescence spectroscopy. *J. Food Sci.* 65, 87.
207. Wright, D. J.; Leach, I. B. and Wilding, P. (1977). Differential scanning calorimetry - studies of muscle and its constituent proteins. *J. Sci. Food and Agric.*, 31, 1034.
208. Wu, J.M.; Lee MH; Ho, CT y Chang, S S. (1982). Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59, 8, 339.
209. Yamashita, M. Y Konagaya, S. (1991). High activities of cathepsins B, D, H and L in the white muscle of chum salmon in spawning migration. *Comparative Biochem. and Physiol.* 95 B (1), 149.



210. Yamauchi, K.; Nagai, Y. y Ohashi, T. (1982). Quantitative relationship between alpha-tocopherol and polyunsaturated fatty acids and its connection to development of oxidative rancidity in chicken skeletal muscle. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2719.
211. Yasui, T.; Ishioroshi, M. y Samejima, K. (1980). Heat-induced gelation of myosin in presence of actin. *J. Food Biochem.* 4, 61.