

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

OXIDACION LIPIDICA EN
CARNES REFRIGERADAS Y CONGELADAS

MABEL CRISTINA TOMAS

TESIS DOCTORAL

1988

El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María Cristina Añón.

A José,

A Bruno,

A mis padres,

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme dado la posibilidad de emprender y desarrollar este trabajo de investigación a través de las becas que me fueron otorgadas.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por haberme incorporado en sus claustros, permitiéndome optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires, a través de la formación científica y humana que me brindó.

A la Doctora María Cristina Añón por haber aceptado dirigir el presente trabajo de tesis con responsabilidad y dedicación aportando su guía, visión concreta y respaldo durante el desarrollo del mismo.

Al Dr. Jorge Armando Funes por su sólida dedicación, apoyo y marco conceptual durante la primera parte del desarrollo de este trabajo de tesis.

Al Dr. Alfredo Calvelo por su apoyo y confianza al posibilitarme el grupo y lugar de trabajo.

A los Sres. Vicente Valenti y Arturo Colavita por su considerable aporte a través de la ayuda técnica.

A las Sras. Viviana Segura y Silvia Moya por su eficiente labor en la tarea de mecanografía.

A mis compañeros del CIDCA y amigos, por su colaboración y a todos los que, de alguna manera, contribuyeron a la concreción de este trabajo.

En lugar de nuestro lento y pesado ir y venir a los pesqueros ¡hay una razón para vivir! Podremos alzarnos sobre nuestra ignorancia, podremos descubrirnos como criaturas de perfección, inteligencia y habilidad. ¡Podremos ser libres! ¡Podremos aprender a volar!

Juan Salvador Gaviota, Richard Bach

INDICE

<u>CAPITULO 1</u>	<u>página</u>
INTRODUCCION	
1.1. Consideraciones generales	1
1.2. Estructura del músculo esquelético	2
1.3. Composición química del músculo	7
1.3.1. Proteínas del músculo	10
1.3.1.1. Fracción soluble: proteínas sarcoplásmicas	10
1.3.1.2. Fracción insoluble: proteínas del tejido conectivo	10
1.3.1.3. Proteínas contráctiles o miofibrilares	11
1.3.1.4. Miosina	12
1.3.1.5. Actina	13
1.3.2. Lípidos del músculo	14
1.3.2.1. Composición lipídica	15
1.3.2.2. Composición acídica	17
1.4. Bioquímica del músculo	18
1.5. Cambios post-mortem de la estructura muscular: conversión de músculo en carne	19
1.6. Conservación de la carne	22
1.7. Oxidación de lípidos	25
1.7.1. Mecanismo de la oxidación de lípidos	26
1.7.2. Interacciones lípidos autooxidados-proteínas	33
1.7.3. Métodos de evaluación de la oxidación lipídica	35
1.7.3.1. Evaluación organoléptica	35

1.7.3.2. Índice de peróxido (PV)	36
1.7.3.3. Ensayo de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico)	37
1.7.3.4. Determinación de compuestos carbonílicos totales	39
1.7.3.5. Determinación de pentano	40
1.7.3.6. Fluorescencia	40
1.7.3.7. Absorción de oxígeno	41
1.8. Prevención de la oxidación lipídica	42
1.9. Objetivos	46

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1. Muestras utilizadas	47
2.2. Refrigeración y almacenamiento refrigerado	48
2.3. Congelación y almacenamiento congelado	48
2.3.1. Método de congelación	48
2.3.2. Congelación de músculos de diversas especies a distintas velocidades de congelación	49
2.3.3. Almacenamiento congelado	50
2.4. Descongelación	51
2.5. Obtención de miofibrillas	51
2.6. Extracción de lípidos	53
2.7. Obtención del exudado	54
2.8. Destilación	55
2.9. Ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)	55
2.9.1. Técnica de Matsushita modificada	56
2.9.2. Técnica de Tarladgis	57

2.10. Barridos espectrofotométricos	58
2.11. Ensayos de recuperación	58
2.11.1. Exudados	58
2.11.2. Destilados	60
2.12. Peroxidación de lípidos	61
2.13. Índice de peróxido	62
2.14. Índice de acidez	63
2.15. Determinación de proteínas	63
2.16. Interacción lípidos autooxidados-proteínas	64
2.17. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	65
2.17.1. Preparación de placas de gel de poliacrilamida	67
2.17.2. Preparación de las muestras de proteínas miofibrilares y patrones de peso molecular conocido	67
2.17.3. Condiciones de corrida	68
2.17.4. Coloración de bandas	68
2.18. Densitometría de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	69
2.19. Métodos estadísticos	69

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO 3

OXIDACION LIPIDICA EN CARNES:

EFFECTO DE LA REFRIGERACION Y EL ALMACENAMIENTO

REFRIGERADO

3.1. Consideraciones generales	70
--------------------------------	----

3.2. Determinación de sustancias reactivas al TBA	71
3.2.1. Comparación de los métodos de Matsushita modificado y de Tarladgis	72
3.2.2. Barridos espectrofotométricos	76
3.3. Efecto del tiempo de almacenamiento refrigerado sobre la oxidación de lípidos	83
3.4. Ensayos de recuperación. Cálculo de los factores respectivos	89
3.5. Evaluación de la oxidación lipídica sobre dis- tintos sistemas: Exudado vs. destilado	96

CAPITULO 4

OXIDACION LIPIDICA DE CARNES:

EFFECTO DE LA CONGELACION Y EL ALMACENAMIENTO CONGELADO

4.1. Consideraciones generales	100
4.2. Efecto del tiempo de almacenamiento congelado para diversas especies	101
4.3. Efecto de la temperatura de almacenamiento congelado	115
4.4. Estudio de la influencia de la velocidad de congelación sobre la oxidación de lípidos. Efecto del tiempo de almacenamiento	117
4.5. Conservación de tocino (sin salar) congelado envasado en películas plásticas flexibles	124

CAPITULO 5

INTERACCION LIPIDOS AUTOXIDADOS-PROTEINAS

5.1. Consideraciones generales	134
5.2. Efecto de la oxidación lipídica sobre las proteínas miofibrilares de músculo bovino.	137

ASPECTOS SIGNIFICATIVOS DEL EFECTO DE LAS BAJAS TEMPERATURAS SOBRE LA OXIDACION LIPIDICA EN CARNES.	151
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

CONCLUSIONES	159
--------------	-----

162

BIBLIOGRAFIA

NOMENCLATURA	182
--------------	-----

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1. CONSIDERACIONES GENERALES

La disponibilidad de alimentos ha sido una necesidad y preocupación constantes para el hombre a lo largo de los tiempos.

Paralelamente y con el crecimiento de la población, la producción, las técnicas de procesamiento y distribución se han ido transformando y evolucionando tendiendo a un mayor aprovechamiento y calidad de los alimentos.

Numerosos tejidos animales han sido y son utilizados en tal sentido para consumo humano. De todos ellos, el tejido muscular es uno de los más estimados debido a su alto valor nutritivo.

Es necesario distinguir con la denominación de músculo al tejido en su estado funcional y como carne, al tejido muscular que ha experimentado una serie de cambios químicos y bioquímicos post-mortem.

Por lo tanto, la carne constituye un miosistema comestible proveniente de diversas especies animales (mamíferos, pescados, aves de corral, moluscos), el cual es muy susceptible a alteraciones microbiológicas, bioquímicas y químicas (Fennema y col., 1973).

Dado que se trata de uno de los alimentos más perecederos, es necesario retardar o inhibir los cambios deteriorativos que afectan su calidad (alteraciones indeseables en color, sabor, textura, aroma) mediante los distintos procesos de preservación (Urbain, 1976).

En función de ello, es necesario en primer lugar considerar la estructura del músculo y la composición química del mismo.

1.2. ESTRUCTURA DEL MUSCULO ESQUELETICO

El músculo esquelético está constituido esencialmente por fibras, las cuales son largas y delgadas células cilíndricas y multinucleadas cuya longitud puede alcanzar hasta 47 cm y su diámetro de 10 a 100 μm . Estas fibras musculares están organizadas en forma paralela formando atados o paquetes, grupos de los cuales conforman el músculo (Hultin, 1976).

Cada músculo está rodeado por una funda de tejido conectivo o conjuntivo que penetra en el mismo llamada epimisium o epimisio. Desde la superficie interna del epimisium parten elementos del tejido conectivo que penetran en el músculo separando los atados de fibras, el perimisio. Este último, divide al músculo a su vez en grupos de fibras denominadas haces o fascículos. Del tejido conjuntivo perimísico salen finas películas que rodean a cada una de las fibras individualmente, denominadas endomisio (Cassens, 1971; Ockerman, 1974).

La disposición del tejido conectivo posibilita el acceso al músculo de vasos y nervios, rodeando también las células adiposas. Como elemento adicional del tejido conectivo, el tendón permite la unión de las fibras musculares a los huesos y otras estructuras.

Cada fibra está constituida por la membrana celular o sarcolema y por el citoplasma denominado sarcoplasma. El sarcolema,

que actúa como una membrana semipermeable, tiene como función mantener la presión osmótica celular y transmitir la acción potencial a lo largo de la fibra. A su vez, el sarcolema está conectado al retículo sarcoplásmico el cual es un sistema membranoso en forma de túbulos y vesículas que atraviesa el interior de la fibra. Este último, tiene la capacidad de unir y liberar iones Ca^{+2} transmitiendo desde el sarcolema los impulsos nerviosos inherentes a los procesos de contracción y relajación muscular (Pearson, 1976; Price y Schweigert, 1971).

El sarcoplasma de cada fibra muscular contiene un gran número de pequeñas fibrillas paralelas (miofibrillas) que constituyen los elementos contráctiles del músculo. Además, el sarcoplasma contiene los núcleos situados en la periferia (característica distintiva del músculo esquelético), mitocondrias (organelas productoras de energía), retículo sarcoplásmico, complejos de Golgi, lisosomas, ribosomas, enzimas glucolíticas, mioglobina, péptidos, aminoácidos, glucógeno, gotitas lipídicas, trifosfato de adenosina (ATP), fosfocreatina y electrolitos inorgánicos (Hultin, 1976).

En la Figura 1 pueden observarse los distintos niveles estructurales del músculo. A nivel microscópico, cada miofibrilla -aproximadamente 1 μm de diámetro- está compuesta por filamentos paralelos alternativamente gruesos y delgados de miosina y actina, respectivamente. Esta disposición de los filamentos es la que le confiere el aspecto estriado a la miofibrilla, quedando delimitadas -por microscopía electrónica- las zonas oscuras (banda A) y las claras (banda I), en forma bien visible. Se

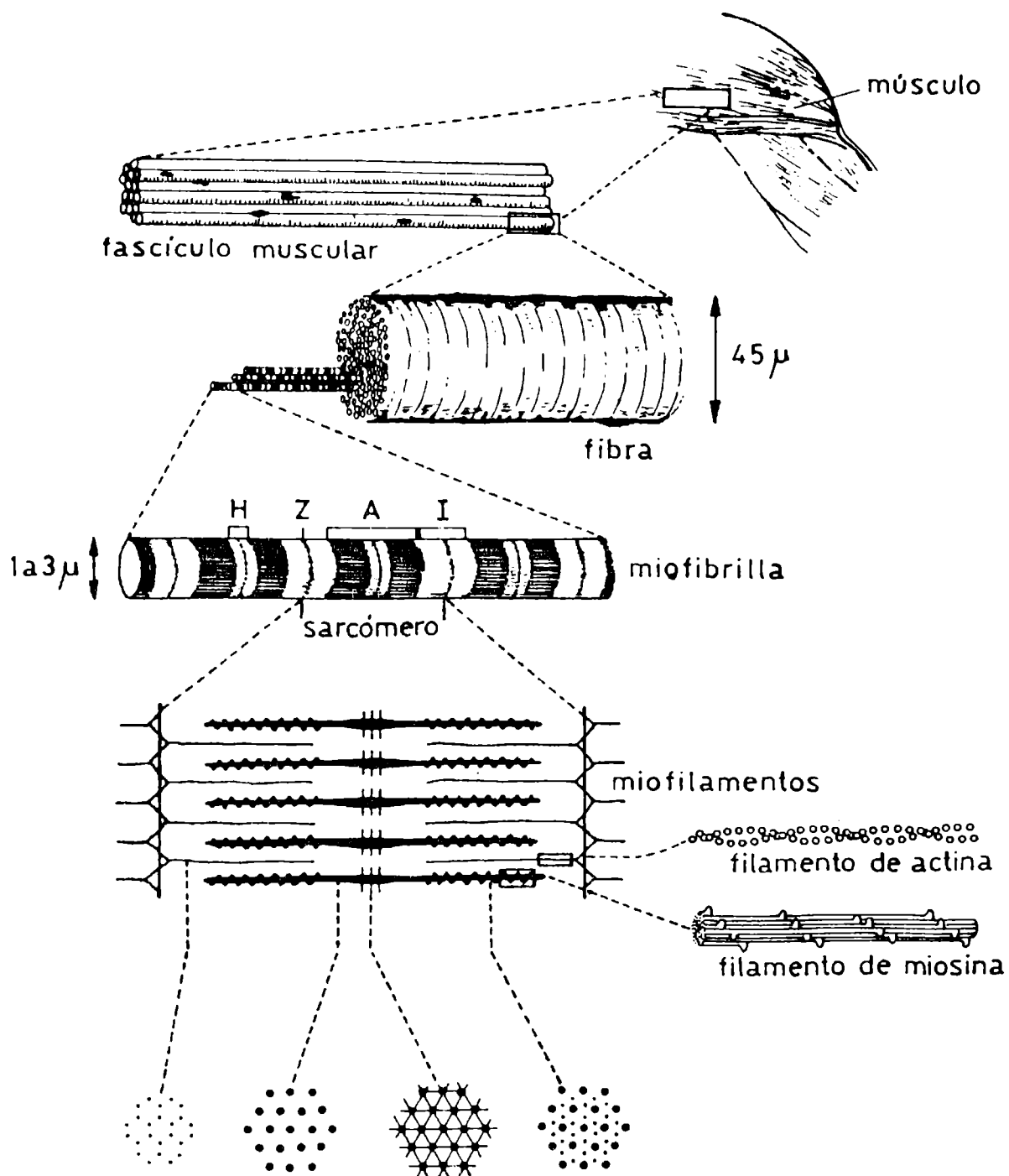


FIGURA 1 - Organización estructural del músculo esquelético desde niveles macroscópicos a niveles microscópicos (Pennema, 1973).

observa también que una línea oscura, llamada línea Z, biseciona la banda I y una zona clara en el centro de la banda A, conocida como zona H.

En la Figura 1 se representa esquemáticamente en sección longitudinal la estructura de un elemento de miofibrilla llamada sarcómero y en sección transversal, la forma en que se interpenetran filamentos delgados y gruesos deducida a partir de espectros de difracción de rayos X, de imágenes logradas con el microscopio electrónico y de solubilización de algunos de los constituyentes proteicos (Fennema y col., 1973). Los filamentos gruesos están constituídos principalmente por miosina y los finos por actina, tropomiosina, troponinas, α y β -actininas.

Si bien dentro del reino animal la función del músculo es similar en cuanto a que provee la locomoción, hay importantes diferencias entre las especies y entre los distintos músculos de un mismo animal en cuanto a su diferente funcionalidad.

Las diferencias observadas entre mamíferos y aves respecto de pescados se deben a las siguientes razones. En primer lugar, por tener su apoyo en el agua el cuerpo del pescado no requiere un tejido conectivo tan extenso y fuerte como para mantener y sostener los músculos. Además, la importancia del colágeno - proteína constituyente del tejido conectivo - difiere entre las diversas especies. En mamíferos y aves, la cantidad y tipo del colágeno tiene gran influencia sobre las propiedades texturales del músculo, en cambio en el pescado no es un factor tan importante en la calidad final del producto. Por último, el arreglo estructural de las fibras musculares de pescado es

marcadamente diferente al de las otras especies comentadas. Esto está relacionado con las características especiales del movimiento de los peces que necesitan flexionar su cuerpo para lograr su propulsión a través del agua (Hultin, 1985).

Las fibras musculares del pescado son cortas (\approx 1 cm de longitud) y están ordenadas en láminas llamadas miotomos. Los miotomos están conectados cada uno con el siguiente por delgadas capas de tejido conectivo llamado miosepta (myocommata) (Mackie, 1983).

En las fibras musculares de pescado, las miofibrillas periféricas se disponen en forma perpendicular al sarcolema pero las interiores, presentan un arreglo normal paralelo al eje de la célula (Bishop y Odense, 1967).

En cuanto a los diferentes tipos de músculos se los ha clasificado de acuerdo a diferencias de pigmentación en blancos y rojos. La diferencia fisiológica básica radica en que los estímulos determinan una respuesta rápida en las fibras blancas mientras que en las rojas, se produce una contracción lenta que se mantiene durante un período relativamente largo.

Además de las citadas precedentemente, diversas diferencias morfológicas y bioquímicas se registran entre ambos tipos de músculos.

Las fibras rojas tienden a ser más cortas, contienen un mayor número de mitocondrias pequeñas, mayores concentraciones de mioglobina y lípidos y reciben un mayor suministro de sangre que las fibras blancas. No obstante, el contenido de glucógeno y de las enzimas relacionadas con la vía glicolítica tiende a

ser menos abundante en las fibras rojas que en las blancas como también las fibras rojas presentan un menor contenido en sarcoplasma, aspecto granular y desarrollo del retículo endoplásmico que las blancas.

Existe otro tipo de fibras denominadas fibras intermedias cuyas propiedades -tamaño, nivel de enzimas- son intermedias entre los dos tipos de fibras citados.

En base a lo expuesto, generalmente se considera que las fibras rojas juegan su papel en torno al metabolismo oxidativo siendo su función sostener la actividad. En contraste, los músculos blancos realizan mejor una intensa actividad por un período de tiempo más corto.

En el pescado también se distinguen músculos blancos y rojos, siendo estos últimos componentes minoritarios asociados al mantenimiento de la actividad natatoria.

1.3. COMPOSICION QUIMICA DEL MUSCULO

La composición química del músculo puede fluctuar por diversos factores, entre ellos: la especie, raza, sexo, edad, localización anatómica y estado nutricional del animal de procedencia (Fennema y col., 1973; Lawrie, 1974). Además, para un mismo animal la función y localización anatómica del músculo también tiene influencia sobre los valores porcentuales de sus componentes.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de un análisis aproximado correspondiente a músculos magros provenientes de distintas especies:

TABLA 1: Composición química aproximada para músculos de distintas especies

Especie	Composición %			
	Agua	Proteínas	Lípidos	Cenizas
Bovino ^a	75	20-21	3	1,5 ^c
Cerdo ^b	68-70	19-20	9-11	1,4
Pollo ^b	73,7	20-23	4,7	1
Pescado ^b	64-84	20-22	13-15	1,3

^a Según los datos aportados por Lawrie (1974).

^b Según los datos aportados por Watt y Merrill (1963).

^c Según los datos aportados por Ockerman (1977).

Si bien la composición es relativamente constante para una amplia diversidad de animales, el contenido de lípidos se presenta como el más variable. Así por ejemplo, se registra un amplio rango de variación en el contenido lipídico en función de las distintas clases de pescado. La composición total de la carne varía entonces dependiendo del contenido graso, huesos y piel, la cual puede incluirse en la muestra (Fennema y col., 1973; Hultin, 1976).

Además, los pescados grasos presentan considerables variaciones estacionales en el contenido lipídico debido en gran parte a su ciclo reproductivo. Por ejemplo, el tenor lipídico de la caballa (*S. scombrus*) puede variar de 5,1 a 22,6% a lo largo de un año. El ajuste en la composición total está regulado por el contenido de agua de manera tal que el porcentaje de lípidos

más el que corresponde al agua permanece prácticamente constante en los pescados grasos (Love, 1980).

Como puede verse en la Tabla 1, el porcentaje correspondiente a la fracción proteica es de alrededor de 20% para las diversas especies mencionadas. Es importante señalar tanto el alto contenido en proteínas del músculo como el alto valor biológico de las mismas, ya que contienen una relación de aminoácidos muy similar a la requerida para el mantenimiento y crecimiento del tejido humano. Del total del contenido de nitrógeno, aproximadamente 95% son proteínas y 5% corresponde a la fracción de nitrógeno no proteico. La fracción de nitrógeno no proteico involucra compuestos tales como péptidos de bajo peso molecular, aminoácidos libres, creatina y nucleótidos (Bodwell y Mc Clain, 1971) y en pescado -entre otros- óxido de trimetilamina, el cual no se encuentra en mamíferos.

Con respecto a los elementos inorgánicos -los que se analizan sobre las cenizas que se obtienen por calcinación- la carne es una buena fuente de Fe y P y es relativamente pobre en Ca. Del total de sales minerales, alrededor del 38% son iones potasio intracelulares y 7% iones sodio extracelulares. Además, el tejido muscular contiene vitaminas del complejo B, especialmente tiamina, riboflavina, niacina, B₆ y B₁₂. En el caso de pescados grasos es alto el contenido de vitaminas A y D.

1.3.1. Proteínas del músculo

Si se excluye el agua, las proteínas en conjunto constituyen la mayor parte del organismo animal. En el músculo vivo son los componentes más importantes por su función fisiológica y en la carne, constituyen la principal fuente nutricional de alta calidad para la dieta humana. De acuerdo a su solubilidad y funcionalidad pueden clasificarse en tres fracciones: 1) proteínas solubles, 2) proteínas insolubles y 3) proteínas contractiles.

1.3.1.1. *Fracción soluble: proteínas sarcoplásmicas*

Esta fracción puede ser extraída del músculo con agua o soluciones salinas diluídas (KCl 0,1 M) y representa un 25-30% del contenido total de nitrógeno. Estas proteínas se encuentran en el fluido que rodea y baña las miofibrillas.

Las proteínas sarcoplásmicas, denominadas miógeno, están compuestas por las siguientes fracciones: 1) sobrenadante citoplásmico constituido por enzimas glucolíticas solubles, 2) nucleoproteínas, 3) fracción microsomal (mioglobina, pigmento del tejido) y proteínas solubles de mitocondrias y proteínas lisosómicas (Ockerman, 1977).

1.3.1.2. *Fracción insoluble: proteínas del tejido conectivo*

Representa un 10-15% y está integrada por proteínas fibrosas las cuales son insolubles en agua y en soluciones salinas diluídas o concentradas a temperatura ambiente. La principal función del tejido conectivo en mamíferos y aves es la de

sostén para los tejidos del cuerpo, cubre y conecta los músculos, órganos y otras estructuras entre sí como con el esqueleto y mantiene unidas las fibras musculares.

Una apreciable parte de la estructura de los organismos animales está relacionada con el tejido conectivo, piel, cartílagos, tendones, ojos, venas y en el interior del músculo (sarcolema, perimisio, epimisio y endomisio) (Novak, 1977; Cheftel y Cheftel, 1976) .

En el pescado, las proteínas de tejido conectivo (3-10%) son importantes también en relación al aspecto de los fillets en cuanto a mantener juntos los miotomos (Mackie, 1983).

Las proteínas involucradas en este tipo de tejido son: colágeno (tejido conectivo blanco) que se solubiliza y convierte en gelatina por calentamiento, 2) elastina (tejido conectivo amarillo) y 3) reticulina. Así, por ejemplo, en pescados el colágeno comienza a gelatinizar entre 30-45°C según la especie pesquera. Estas particularidades explican la relativa blandura y alto valor nutritivo de este tipo de carne.

1.3.1.3. *Proteínas contráctiles o miofibrilares*

A esta fracción corresponden las proteínas miofibrilares insolubles en agua y en soluciones salinas diluídas pero solubles en soluciones salinas más concentradas (KCl 0,6 M).

Representan el 50% del total de proteínas en el músculo bovino y 65-75% en el músculo del pescado.

Las proteínas principales que integran las miofibrillas son miosina (\approx 54%), actina (27%) y en menores proporciones

tropomiosina, troponinas y α y β -actininas.

Estas proteínas son las que brindan al músculo rigidez estructural y transforman la energía química en energía mecánica durante la contracción, siendo responsables de atributos de calidad tales como textura y propiedades funcionales como capacidad de retención de agua del músculo (Fennema y col., 1973; Bodwell y Mc Clain, 1971; Ockerman, 1977).

1.3.1.4. Miosina

La mayor proteína de los filamentos gruesos es la miosina. Se trata de una molécula alargada, de aproximadamente PM \approx 470.000, hexamérica. Contiene 6 cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas (PM \approx 230.000), dos cadenas livianas esenciales (PM \approx 16.000 - 20.000) y dos cadenas livianas regulatorias (PM \approx 16.000 - 20.000). Consta de dos cabezas o regiones globulares que están unidas a una larga cola en forma de varilla. La miosina por lo tanto, es globular (soluble en agua) y fibrosa (insoluble en agua). En función de estas características, esta proteína puede ser extraída del músculo únicamente con soluciones salinas concentradas (KCl 0,5 M) dando soluciones muy viscosas (Briskey y Fukazawa, 1971).

La zona de la cola contiene los sitios de unión responsables del montaje de las moléculas de miosina lo que posibilita la formación de la estructura funcional de los filamentos gruesos.

Las cabezas globulares contienen también varios sitios activos: el enzimático (unión e hidrólisis del ATP), el de unión

a actina para formar el complejo actomiosina y muchos sitios de unión para cationes divalentes. Entre las cabezas y la cola hay una región llamada cuello que es la que le confiere flexibilidad al movimiento de las cabezas durante la contracción (Harrington y Rodgers, 1984).

La acción de algunas enzimas proteolíticas, tales como la tripsina, escinde a la molécula de miosina en dos porciones: meromiosina pesada (HMM) y meromiosina liviana (LMM) (Hamm, 1970). La porción LMM es la 2/3 partes de la cola de miosina, tiene igual que la cola una conformación de α -hélice superenrollada y es soluble solamente a altas fuerzas iónicas (Lowey y col., 1966). La porción HMM está compuesta por la cabeza, el cuello y el 1/3 restante de la cola de miosina. Esta estructura conserva las propiedades enzimáticas de miosina y es soluble a bajas fuerzas iónicas (Hamm, 1970).

1.3.1.5. Actina

La actina es la mayor proteína de los filamentos finos. Está unida a la estructura muscular más firmemente que la miosina. La molécula de actina existe en el músculo como una estructura en doble hélice, llamada actina fibrosa o F-actina. Su monómero es la actina globular o G-actina ($PM \approx 45 \cdot 10^3$), la cual consiste en una cadena polipeptídica con un alto contenido en prolina y un número elevado de residuos laterales no polares (Bendall, 1969). Esto hace que la cadena se pliegue y adquiera una baja densidad de carga superficial, produciendo una molécula con una estructura compacta, un bajo contenido helicoidal y

una forma esférica-globular.

La actina, en su interacción con miosina, forma el complejo actomiosina, el cual exhibe igual que la miosina libre, una alta viscosidad en solución.

Los filamentos finos están compuestos básicamente por F-actina, tropomiosina, troponinas y α - y β -actinina. La columna vertebral de estos filamentos es la estructura enrollada de actina, alrededor de la cual se ubican las proteínas menores (Hamm, 1970).

La tropomiosina (molécula corta y fina, $PM \approx 35 \cdot 10^3$) forma delgados filamentos que se unen a la estructura de actina. Está localizada además en las líneas Z (zonas de mayor densidad, que unen los filamentos finos entre sí).

La troponina es una proteína globular oblonga, que se encuentra en los filamentos finos a razón de una troponina por cada tropomiosina. Cada 7 moléculas de G-actina hay una troponina y una tropomiosina. Estas últimas tienen la propiedad de unir Ca^{+2} , confiriéndole sensibilidad al complejo actomiosina (Murray y Weber, 1974). Las α - y β -actininas son las proteínas menores de más baja concentración en los filamentos finos. La α -actinina interviene en el entrecruzamiento de actina y está localizada también en la línea Z, en tanto que la β -actinina está asociada con la troponina (Briskey y col., 1967).

1.3.2. Lípidos del músculo

La fracción lipídica está asociada con numerosos procesos y características finales del alimento, tales como: aroma,

estabilidad del color, textura, jugosidad, estabilidad de la fracción proteica, características emulsificantes, contenido calórico, etc. (Allen y Allen Foegeding, 1981).

Básicamente, la composición lipídica de las carnes, por ejemplo en mamíferos y aves, puede dividirse en lípidos de tejido muscular y lípidos de tejido adiposo.

La composición de lípidos asociados al tejido muscular varía en cantidad y en composición entre las diferentes especies (aves, mamíferos, peces) de las cuales provienen.

1.3.2.1. *Composición lipídica*

Los lípidos intramusculares están integrados fundamentalmente por los siguientes compuestos: 1) fosfolípidos; 2) triglicéridos o lípidos neutros; 3) ácidos grasos libres y 4) esteroides.

Los fosfolípidos y el colesterol son esenciales para el músculo debido al papel que juegan en la estructura de la célula y sus organelas.

Los lípidos neutros, si bien no son esenciales, brindan una fuente de ácidos grasos que pueden aportar energía a través de reacciones metabólicas y son importantes en las caracteristísticas que le confieren a la carne.

Así como los fosfolípidos y el colesterol están generalmente asociados a membranas celulares, los lípidos neutros se presentan en forma de pequeñas gotitas dentro de la célula muscular o en células grasas llamadas adipocitos localizadas dentro del tejido conectivo perimísico. Cuando los adipocitos son

grandes y numerosos, se hacen visibles en el músculo produciendo lo que se conoce como marbling (marmolado).

El contenido en fosfolípidos del músculo esquelético de las distintas especies oscila entre 0,3 - 1,0 % siendo fosfatidil colina y fosfatidiletanolamina los componentes mayoritarios en aves, mamíferos y pescados.

El contenido de triglicéridos es muy variable entre las especies y generalmente mucho mayor que el de los fosfolípidos.

En cuanto a los ácidos grasos libres, se presentan en bajas cantidades relativamente constantes (0,01 - 0,1 %) y el colesterol varía entre 40 - 140 mg/100 g (Fennema y col., 1973).

La Tabla 2 muestra el contenido y composición de lípidos para distintas especies y diversos tipos de músculos según su funcionalidad.

TABLA 2: Contenido y composición de lípidos para distintas especies y diversos tipos de músculos según su funcionalidad

Especie	Tipo de músculo	Porcentaje de		
		Lípidos totales	Lípidos Neutros	Fosfolípidos
Pollo	claro	1,0	52	48
	oscuro	2,5	79	21
Pescado	claro	1,5	76	24
	oscuro	6,2	93	7
Bovino	Longissimus dorsi	2,6	78	22
Cerdo	L. dorsi	4,6	79	21
	Psoas major	3,1	63	37

Datos aportados por Allen y Allen Foegeding (1981).

Dentro de una misma especie los músculos "rojos u oscuros" contienen más lípidos que los "blancos o claros". De esta manera, la mayor actividad metabólica aeróbica de los primeros ha sido asociada no solamente con una mayor concentración de mioglobina, sino también con un mayor contenido lipídico. Las consecuencias de estas diferencias en el consumidor se traducen en diferencias en el flavor (aroma) y en el contenido calórico (Allen y Allen Foegeding, 1981).

1.3.2.2. *Composición acídica*

Además de las diferencias existentes entre músculos y especies en cuanto al contenido lipídico, la composición de ácidos grasos presenta también diferencias distintivas.

En las distintas especies el contenido en ácidos grasos saturados oscila entre los siguientes valores: músculo bovino 40-70 %, cerdo 40 - 60 %, aves 28 - 33 % y pescado aproximadamente 30 %.

Según datos aportados por algunos investigadores (Allen y Allen Foegeding, 1981) el contenido en ácidos grasos poliinsaturados es mucho mayor en el caso de pescados que en el de músculo de aves y mamíferos. Presumiblemente, esta alta concentración sea necesaria para mantener los lípidos en estado fluido, debido a las bajas temperaturas a las que en ocasiones puede estar expuesto el músculo de pescado (Hultin, 1985). Además, los lípidos provenientes de aves son más insaturados que los de cerdo, el cual a su vez presenta un mayor contenido en ácidos grasos insaturados que el músculo bovino.

Es conveniente tener en cuenta también la importancia del contenido en ácidos grasos de la dieta suministrada a las especies no rumiantes. En los rumiantes, la composición acídica presenta un alto porcentaje de ácidos grasos saturados debido al proceso de hidrogenación realizado por los microorganismos en el rumen (Mc Donald y Scott, 1977).

No obstante, la fracción de ácidos grasos correspondiente a fosfolípidos en músculo bovino contiene un mayor porcentual en ácidos grasos con 4 o más dobles enlaces que en el caso de cerdo aunque menor que en el pollo. Tanto en músculo bovino, pollo como en cerdo, los lípidos neutros contienen alrededor de 40 - 50 % de ácidos grasos monoenoicos y menos del 2 % en ácidos grasos poliinsaturados.

En concordancia con otros investigadores (Christie, 1978) se ha llegado a la conclusión que la composición lipídica en fosfolípidos varía levemente entre especies rumiantes y no rumiantes; sin embargo, es más significativa la diferencia registrada en la composición acídica.

Las diferencias comentadas representan una de las variables más significativas en la determinación del tipo de procesamiento, palatabilidad y características del almacenamiento que deberán adoptarse para las distintas especies y músculos.

1.4. BIOQUIMICA DEL MUSCULO

En presencia de ATP e iones Mg^{+2} -estando los iones Ca^{+2} retenidos en el retículo sarcoplasmático- la miosina no exhibe actividad ATPásica y el músculo está en estado de relajación.

En esas condiciones, los filamentos de actina pueden deslizarse a lo largo de los filamentos de miosina, es decir no hay interacción entre filamentos finos y gruesos estando las dos proteínas bajo la forma de dos complejos: miosina-Mg⁺²-ATP y actina-ADP.

Al liberar iones Ca⁺² el retículo sarcoplasmático -en presencia de ATP y Mg⁺²- es cuando se evidencia la actividad ATPásica de la miosina. Mediante la hidrólisis del ATP se libera energía (≈ 10 Kcal/mol), produciéndose la contracción muscular debido a la interacción actina-miosina. Al desaparecer el impulso nervioso, los iones Ca⁺² son recobrados por el retículo sarcoplásmico, finalizando la contracción con la estricta condición que haya siempre ATP e iones Mg⁺² disponibles. La contracción empieza cuando la concentración de los iones Ca⁺² alcanza un valor de 10^{-7} M y culmina cuando la misma desciende a un valor inferior (Cheftel y Cheftel, 1976).

El contenido de ATP permanece prácticamente constante regenerándose fundamentalmente a través de tres caminos: 1) refosforilación del ADP (adenosin difosfato) a partir de fosfocreatina 2) glucólisis anaerobia del glucógeno muscular y 3) a través del ciclo de Krebs mediante la recuperación aeróbica del músculo en reposo o trabajo moderado (Hultin, 1976).

1.5. CAMBIOS POST-MORTEM DE LA ESTRUCTURA MUSCULAR: CONVERSION DE MUSCULO EN CARNE

Una vez producida la muerte del animal, la interrupción de la circulación sanguínea priva al músculo del aporte de oxígeno:

se paraliza la respiración celular, disminuye el potencial redox y se produce la glucólisis anaerobia.

En virtud de ello, el glucógeno en lugar de degradarse en H_2O y CO_2 , se transforma en ácido láctico. Las cantidades de ATP producidas por la glucólisis anaerobia no alcanzan para mantener su nivel constante, debido a que por acción de las ATPasas sarcoplásmicas y miofibrilar continúa hidrolizándose ATP en el músculo post-mortem. Además, el retículo sarcoplásmico libera todo el Ca^{+2} perdiendo su capacidad para recobrarlo. La presencia de iones Ca^{+2} (concentración $\geq 10^{-7}$ M) activa la ATPasa de la miosina y pese al aporte que pueda brindar la refosforilación de la fosfocreatina el contenido de ATP se agota rápidamente. Además, la liberación de iones H^+ en la hidrólisis de ATP conduce a un descenso de pH (desde 7,2 hasta aproximadamente 5,5) inhibiéndose algunas enzimas. Así la glucólisis se detiene, el contenido de ATP tiende a cero y en esas condiciones, los filamentos de actina y miosina se unen en forma irreversible produciéndose el estado de rigor. La temperatura del músculo post-mortem y el estado nutricional del animal en el momento de su muerte, pueden alterar la velocidad de caída del pH y de esta forma, el momento e intensidad de los fenómenos que acompañan el rigor. En músculo bovino, a temperatura ambiente, este proceso demanda alrededor de 8 hs.

El valor del pH alcanzado tiene gran importancia sobre las características del músculo. Valores de pH final elevado ($\approx 5,8$) producen cortes oscuros de carne bovina, en cambio valores finales bajos de pH están asociados con músculos PSE (pálido, blando,

exudativo) -generalmente en el caso de cerdo- y altas temperaturas post-mortem.

Con el término "resolución del rigor" o "maduración" se describe el pasaje del músculo desde su condición rígida a un estado de flaccidez. La maduración no implica la disociación de enlaces entre actina y miosina sino la acción de enzimas proteolíticas como las catepsinas u otras proteasas sobre las líneas Z y los filamentos g (estructuras fibrosas que rodean y atraviesan las miofibrillas).

En el pescado la rigidez cadavérica y su desaparición ocurren muy rápidamente, en general entre 5 y 30 hs, respectivamente a una temperatura de 0°C. El descenso de pH después de la muerte es mínimo dependiendo -entre otros factores- de las condiciones de pesca, porque el contenido de glucógeno disminuye más o menos según la resistencia que el pescado oponga a su captura. Así, el pH pasa de 7,0 a 6,2-6,5 para subir luego a 6,6 - 6,7. Esto representa un problema en lo que se refiere a la alterabilidad del pescado post-mortem, pues a esos valores de pH no está inhibida la proliferación bacteriana (Cheftel y Cheftel, 1976).

A medida que se resuelve el rigor mejora la textura, aumenta la capacidad de retención de agua, lo que implica una mayor ternura y jugosidad después de la cocción. Sin embargo, si la maduración se extiende por tiempos prolongados a temperaturas superiores a 0°C, pueden registrarse alteraciones organolépticas provocadas por desarrollo microbiano.

El valor de pH alcanzado tiene incidencia sobre el color

del músculo y la proteólisis y metabolismo de nucleótidos pueden generar compuestos que contribuyen a cambios en el aroma y sabor del producto cocido (Lawrie, 1974).

1.6. CONSERVACION DE LA CARNE

Dadas las características perecederas de la carne fresca, en cuanto al alto contenido de agua y nutrientes del tejido, el objetivo de la mayoría de las técnicas de procesamiento se concentra en lograr la disminución o prevención de los cambios que conducen al deterioro del producto. Estas alteraciones son producidas fundamentalmente por el desarrollo de microorganismos contaminantes, por el desarrollo de reacciones químicas y bioquímicas de los componentes naturales del tejido alimenticio y también, por la ocurrencia de fenómenos físicos tales como la deshidratación.

Los procedimientos usados para prevenir dichos cambios son: 1) Remoción de agua (disminución de la actividad acuosa), 2) Re moción de componentes activos (oxígeno, glucosa), 3) Disminución de la temperatura, 4) Aplicación del calor, 5) Empleo de aditivos químicos y 6) Envasado.

Muchos de los tratamientos destinados al procesamiento de alimentos consisten en la combinación de dos o más de los proce dimientos fundamentales enumerados precedentemente. En cuanto a la elección del más adecuado, debe tenerse en cuenta que el logro de efectos deseables no involucre daños colaterales más importantes que aquellos que se pretenden evitar. Además de evaluar la influencia sobre la calidad del producto, la selección

del método más apropiado debe considerar: riesgos sanitarios para operadores y consumidores, fallas del método, problemas relacionados con la distribución y comercialización del producto y factibilidad económica y técnica sobre su aplicación comercial.

Procedimientos basados en la remoción de agua, control de la temperatura, inhibición del desarrollo de microorganismos e inactivación enzimática, permitirían extender la vida útil del producto por tiempos más prolongados.

Varios son los procedimientos utilizados en la conservación de las carnes: a) tratamiento térmico, b) deshidratación, c) salazón, d) uso de conservadores químicos, e) aplicación de radiaciones ionizantes, f) refrigeración y g) congelación.

El salado, la adición de ciertos conservadores químicos y la deshidratación, están basados en la reducción del valor de actividad acuosa (a_w) del sistema por debajo del nivel que permite el crecimiento de la mayoría de los microorganismos. Los tratamientos térmicos, las radiaciones ionizantes y el agregado de sustancias químicas, ejercen su acción a través de la inactivación enzimática y la disminución de la cantidad de microorganismos viables (Urbain, 1976; Hultin, 1985).

Es importante señalar la contribución que brindan los materiales y sistemas de envasado más recientes a la conservación de alimentos.

En la actualidad, la refrigeración y congelación son los métodos más usados para la conservación de la carne. En ambos, por medio de la acción de las bajas temperaturas, se retardan el crecimiento microbiano y las reacciones químicas y enzimáticas

que provocan las diversas alteraciones. A su vez, en el caso de la congelación, además del descenso de la temperatura se agrega el fenómeno de la deshidratación interna del tejido, lo que produce un marcado descenso de la actividad acuosa (a_w). De esta manera, la combinación de los dos efectos asegura un control satisfactorio del desarrollo microbiano que hace innecesario el agregado de preservadores químicos -utilizados en algunas ocasiones en el caso de refrigeración- para prolongar el período de almacenamiento en buenas condiciones higiénico-nutricionales (Lawrie, 1974).

A pesar de las ventajas enunciadas, la refrigeración y congelación de la carne y más aún su almacenamiento refrigerado y congelado, respectivamente traen aparejados -con distinta intensidad, según el proceso- alteraciones indeseables en sus atributos sensoriales, por ejemplo cambios en la textura, en el color superficial y desarrollo de rancidez oxidativa (Fennema, 1973).

Otros factores que influyen en la calidad de las carnes son el estado pre y post-rigor, el pH, el nivel microbiológico.

Durante el almacenamiento de carnes congeladas se producen alteraciones de tipo químico y físico bien definidas. Los cambios físicos que pueden registrarse incluyen a) la recristalización, b) el quemado por frío (freezer burn) y c) la formación de eutécticos.

La recristalización del hielo implica el aumento del tamaño cristalino manteniéndose constante la masa total de agua congelada. La quemadura por frío evidenciada en superficies deshidratadas y opacas, se debe a la sublimación del hielo sobre la

superficie del músculo cuando la presión de vapor del hielo es mayor que la que corresponde a la atmósfera circundante. Puede evitarse envasando la carne con películas plásticas adecuadas para evitar la pérdida de humedad.

La formación de eutécticos se produce a temperaturas inferiores a -20°C , por lo que resulta de poca significación (Fennema y col., 1973).

Los cambios de origen químico se relacionan con: a) oxidación de lípidos, b) cambios indeseables de color (color marrón, pérdida de brillo) debido a la conversión de mioglobina a oxi y metamioglobina y c) cambios texturales (pérdida de jugosidad, capacidad de retención de agua, textura gomosa, dureza) atribuibles a la desnaturalización de proteínas miofibrilares. Además, la deshidratación de las fibras -provocada por la formación de hielo extracelular- afecta el entorno de las proteínas, alterando las interacciones hidrofílicas-hidrofóbicas de las mismas. Esto modifica las estructuras tridimensionales induciendo interacciones proteína-proteína y como consecuencia, su agregación. Por otra parte, durante el almacenamiento congelado otras propiedades funcionales se ven afectadas (viscosidad, solubilidad, etc.).

1.7. OXIDACION DE LIPIDOS

Como ya se ha mencionado, la oxidación de los lípidos es uno de los procesos de deterioro de origen químico más importante de todos aquellos que pueden afectar la calidad de los alimentos. Su importancia radica en que el mismo puede ocurrir en

cualquiera de las distintas etapas que integran la producción y procesamiento de los mismos, ya sea tanto en las materias primas como en el alimento ya preparado para su ingestión. Además, este proceso de oxidación puede ocurrir también en sistemas vivos donde puede dar lugar a una serie de distintos tipos de patologías (Pearson y col., 1983).

Se trata de un proceso deteriorativo pues es el causante de una serie de sabores, olores y colores desagradables con la consecuente disminución de la calidad organoléptica, funcional y nutritiva de los alimentos (Melton, 1983; Gokalp y col., 1983).

1.7.1. Mecanismo de la oxidación de lípidos

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

1. Estrictamente químico, sin intervención de enzima alguna, al cual se suele llamar autoxidación.
2. A través de enzimas llamadas lipooxigenasas.

En este trabajo nos referiremos fundamentalmente a la autoxidación debido a que los procesos de oxidación enzimática son de poca importancia en el deterioro de las carnes. No obstante, algunos investigadores (Slabyj y Hultin, 1984) han demostrado la ocurrencia de procesos oxidativos enzimáticos en la fracción microsomal de músculo de pescado.

La autoxidación de los lípidos involucra principalmente dos componentes

1. Lípidos insaturados
2. Oxígeno.

Entre los factores que ejercen su influencia sobre la oxidación de lípidos, podemos citar: 1) grado de insaturación de los ácidos grasos presentes, ya que a mayor número de dobles enlaces aumenta la susceptibilidad a la oxidación, 2) Procesos a los que fue sometido el alimento (por ejemplo, distintas velocidades de congelación, refrigeración) y luego temperatura y tiempo de almacenamiento, 3) Presencia de oxígeno, 4) Presencia de agentes prooxidantes (por ejemplo, trazas de metales) y de sustancias antioxidantes (α -tocoferol).

La fracción de los lípidos correspondiente a los alimentos incluye una serie de distintas clases de componentes químicos, con la característica común de ser soluble en solventes orgánicos de baja polaridad. Esta fracción lipídica incluye varias clases de compuestos, siendo los triglicéridos y los fosfolípidos las dos clases más importantes. Desde el punto de vista de la oxidación de lípidos, revisten importancia aquellos que incluyen en sus estructuras ácidos grasos insaturados o sea aquellos con dobles enlaces, generalmente no conjugados y en configuración cis. Es necesario también señalar, que otros componentes de naturaleza lipídica pueden influir en la velocidad del proceso de oxidación, tales como tocoferoles, carotenos (Labuza, 1971a y b; Uri, 1961; Lundberg, 1962).

El oxígeno es el otro componente de gran importancia en el proceso oxidativo. Actualmente se considera que el oxígeno singulete es el que interviene en los primeros pasos de la oxidación (Chan, 1977).

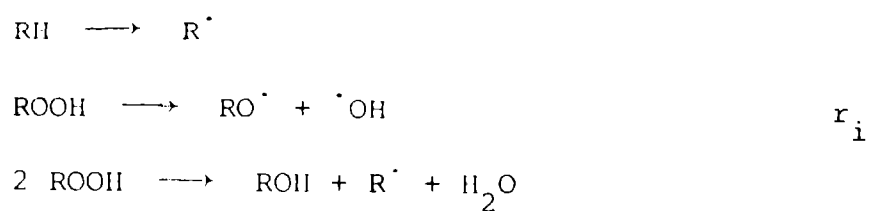
El mecanismo de autooxidación ha sido estudiado y establecido

en sistemas modelo constituidos por lípidos puros. Con ciertas consideraciones, el mismo puede ser aplicable y extrapolable a sistemas más complejos como son los alimentos, los cuales no sólo están compuestos por distintas clases de lípidos y ácidos grasos sino también por otros componentes como proteínas, hidratos de carbono, minerales, agua, distribuidos en distintas fases en la mayoría de los casos (Terao y Matsushita, 1977; Igene y col., 1980).

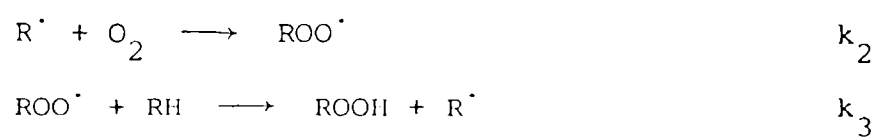
La autoxidación de lípidos se produce a través de sustancias llamadas radicales libres o sea sustancias con un electrón desapareado, característica que las torna sumamente reactivas y lábiles. En la Figura 2 se muestra el mecanismo del proceso de oxidación de lípidos. Se pueden señalar los siguientes hechos:

1. Las reacciones de iniciación son aquellas en donde se forman radicales libres a partir de sustancias de carácter no radicalario, siendo los radicales alcoholes ($RO\cdot$) e hidroperoxilos ($ROO\cdot$), los productos de estas reacciones de iniciación. Es necesario señalar que otros radicales se forman como consecuencia de la oxidación de los productos de descomposición de los hidroperóxidos.
2. Las reacciones de propagación son aquellas que mantienen el pool de radicales libres; a través de ellas un radical incorpora oxígeno en su estructura, reaccionando posteriormente con lípido sin oxidar (RH) dando lugar a la formación de hidroperoxilos ($ROOH$) y otro radical lipídico ($R\cdot$).
3. Finalmente ocurren reacciones de terminación -que implican la consumición de los radicales libres generados en el proceso- donde la combinación de dos radicales libres origina

Iniciación



Propagación



Terminación

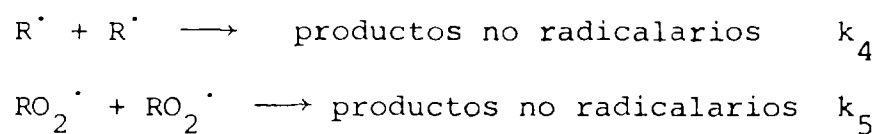


FIGURA 2 - Mecanismo de radicales libres a través del cual procede la oxidación lipídica.

sustancias de naturaleza no radicalaria.

Cada una de estas reacciones está caracterizada por una determinada velocidad de reacción K_i que es el parámetro cinético que señala la posibilidad de poder "observar" o no una determinada reacción ante otras.

Varios estudios (Labuza, 1971b) han demostrado que en sistemas de lípidos puros la velocidad global de reacción está dada por la siguiente expresión:

$$r = r_i^{1/2} k_3 (2 k_6)^{-1/2} [RH] \quad (1)$$

en donde la velocidad de reacción es dependiente de la velocidad de las reacciones de iniciación (r_i), de propagación (k_3), de terminación (k_6) y de la concentración del sustrato a oxidar $[RH]$. La concentración de lípido se mantiene prácticamente constante durante el transcurso de la oxidación por lo que la velocidad global de la reacción queda determinada por la siguiente ecuación:

$$r = K r_i^{1/2} \quad K: \text{cte. de proporcionalidad} \quad (2)$$

En la etapa bimolecular de las reacciones de iniciación se verifica que:

$$r_i = k' [ROOH]^2 \quad (3)$$

por lo que finalmente queda que:

$$r = k [ROOH] \quad (4)$$

esta ecuación nos expresa que la producción de hidroperóxidos lipídicos (o sea la magnitud de la oxidación) depende en forma proporcional de la concentración instantánea de los mismos hidroperóxidos, o sea que a medida que la concentración de hidroperóxidos (productos primarios de la oxidación) aumenta, la velocidad global también aumenta. Esto nos indica el carácter autocatalítico de la reacción; cuanto más autooxidado se encuentre el sistema más fácil se continuará oxidando. A su vez, los hidroperóxidos pueden intervenir en otras reacciones originando productos secundarios de oxidación tales como compuestos carbonílicos, alcoholes, ácidos, hidrocarburos, lactonas, ésteres y polímeros (Gray, 1978; Karel, 1973; Lillard y Day, 1964).

La descomposición de los hidroperóxidos procede a través de un mecanismo de radicales libres (Figura 3) (Fennema, 1985).

Cabe señalar además, que los aldehídos son uno de los compuestos que se producen en mayor medida como consecuencia de la oxidación lipídica. En el caso de los aldehídos saturados, los mismos pueden participar luego, de reacciones de dimerización y condensación. En lo que respecta a los aldehídos insaturados, a través de una posterior autooxidación, pueden obtenerse hidrocarburos de cadena corta, aldehídos y dialdehídos tales como malonaldehído. La formación de malonaldehído es la base sobre la que se ha desarrollado el ensayo del ácido 2-tio-barbitúrico (TBA) para la evaluación de la oxidación de lípidos, el cual se detalla más adelante (Nawar, 1985).

Este resultado fundamenta el hecho que se suele decir que pequeñas alteraciones oxidativas en las primeras etapas de un

proceso, aunque no sean perceptibles organoléptica o analíticamente o no comprometan la calidad del alimento en ese momento, pueden tener importantes consecuencias deteriorativas con el transcurso del tiempo. Es decir que cuanto antes se procese el alimento mayor será su período de guarda (First in, first out). Esta realidad tiene una gran importancia en productos de pesca los cuales son muy susceptibles a los procesos de oxidación dado su alto porcentaje en ácidos grasos poliinsaturados respecto de otras especies.

1.7.2. Interacciones lípidos autooxidados-proteínas

Las interacciones lípidos autooxidados-proteínas pueden ocurrir fundamentalmente a través de dos mecanismos básicos (Karel, 1977) (Figura 4):

1. Reacciones de condensación: son aquellas en las cuales los compuestos carbonílicos derivados de la descomposición de los hidroperóxidos reaccionan con los grupos amino libres de las proteínas y/o péptidos dando lugar a la formación de complejos proteína-lípido de variada complejidad. De tal manera se explica la formación de polímeros proteicos con característica fluorescente.
2. Reacciones de formación de radicales libres de origen proteico: son aquellas en las cuales las proteínas reaccionan con productos de la oxidación lipídica (radicales libres, hidroperóxidos, productos volátiles secundarios de origen lipídico) originando radicales libres de naturaleza proteica, los que pueden sufrir ulteriores reacciones tales como

polimerización y fragmentación, afectando la calidad del alimento (pérdida de solubilidad, de textura, etc.).

1.7.3. Métodos de evaluación de la oxidación lipídica

A fin de seleccionar un método que permita el seguimiento de la oxidación lipídica en carnes, varios factores deben tenerse en cuenta:

- Diferencia en el contenido lipídico entre músculos y especies
- Diferencia en composición de ácidos grasos entre las distintas especies
- Condiciones en las que la carne ha sido procesada y almacenada

En función de estos lineamientos generales, podemos considerar diversos métodos de evaluación:

1. Evaluación organoléptica
2. Métodos físicos y químicos

1.7.3.1. *Evaluación organoléptica*

Los productos secundarios de la oxidación, especialmente los de carácter volátil, hacen variar el aroma, sabor, color del alimento, de manera tal que una evaluación sensorial del mismo es una medida de dichos compuestos. El inconveniente es que con esta técnica es necesario contar con paneles entrenados, resultando los estudios más onerosos y prolongados (Gray, 1978).

En contraste con lo expresado, los métodos químicos y físicos ofrecen mayor reproducibilidad y sensibilidad. Lo deseable

es lograr una buena correlación de estos resultados con los obtenidos por análisis sensoriales (Igene y col., 1979).

Tanto en el caso de los métodos químicos y físicos, es importante conocer "a priori" la siguiente información:

- cuál es la propiedad medida por el método de ensayo elegido
- si esa propiedad puede manifestarse en otras circunstancias que en la oxidación
- si el método elegido es específico para dicha propiedad
- si esa propiedad representa o revela cuantitativamente el fenómeno en estudio y permite una buena correlación con análisis sensoriales

Entre los métodos más utilizados están:

1.7.3.2. Índice de peróxido (PV)

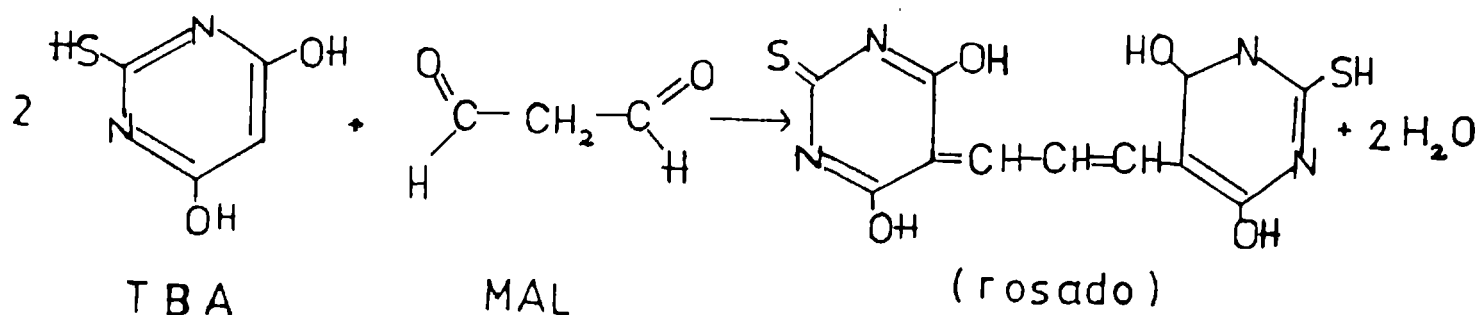
Mide la concentración de hidroperóxidos lipídicos (ROOH) debiendo efectuarse previamente la extracción de lípidos del alimento. Se usan técnicas iodométricas para dosar el iodo producido a partir de yoduro de potasio por los peróxidos presentes. El índice de peróxido se expresa en meq. de I_2 /kg de ácidos grasos. Como fuentes de error pueden citarse: la absorción de iodo por parte de los ácidos grasos insaturados (reacciones de adición) y la liberación de iodo proveniente del reactivo (yoduro de potasio) debido al oxígeno presente en la solución a ser titulada; en ambos casos, se obtendrían altos resultados. Además, influyen otros factores como las variaciones en las condiciones de reacción (temperatura, tiempo, constitución y reactividad de los peróxidos, peso de la muestra), los que

deben ser debidamente ajustados.

La aplicación de este método está restringida a los primeros estadios de la oxidación debido a la naturaleza reactiva de los hidroperóxidos, los cuales originan los productos secundarios de oxidación y provocan una disminución del valor del índice en función del tiempo (Gray, 1978; Melton, 1983).

1.7.3.3. Ensayo de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico)

Es uno de los métodos más usados para la detección de la rancidez oxidativa (Rhee, 1978a). Se basa fundamentalmente en la reacción colorimétrica que involucra la condensación de dos moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) con una molécula de malonaldehído, presentando el complejo un máximo de absorción a 532 nm (Sinnhuber y Yu, 1958a; Dahle y col., 1962).



El malonaldehído es un producto secundario de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Dahle, 1962; Pryor y col., 1976). Este ensayo se expresa a través del número TBA definido como N° TBA = mg de malonaldehído/kg de carne. No obstante, algunos investigadores han encontrado que otros productos de oxidación de lípidos del tipo alca-2,4-dienales también reaccionan con el reactivo TBA dando compuestos coloreados con máximo de absorbancia a 450 y 530 nm (Marcuse y Johansson, 1973; Patton,

1974). Por lo tanto, es más correcto señalar al conjunto de sustancias involucradas como sustancias reactivas al TBA. Análisis estadísticos han indicado que la rancidez oxidativa en carnes se correlaciona mejor con el contenido de sustancias reactivas al TBA que con la determinación de hidroperóxidos (Zipser y col., 1964).

En literatura se indican varias formas de llevar a cabo el ensayo de TBA para el tipo de alimentos en estudio:

1. Directamente sobre el alimento prosiguiendo con la extracción del complejo coloreado (Sinnhuber y Yu, 1958b).
2. Sobre un extracto del alimento (Witte y col., 1970; Vyncke, 1975).
3. Sobre una fracción del destilado por arrastre con vapor del alimento (Tarladgis y col., 1960).

Esta última forma es uno de los procedimientos más usados y pese a algunos inconvenientes, es considerado más sensible que los otros dos. Dichos inconvenientes se refieren al empleo de ácidos y calentamiento, los cuales favorecen la peroxidación durante el análisis originando altos valores en el número de TBA (Melton, 1983; Williams y col., 1983).

Este ensayo ha sido útil para el seguimiento de la oxidación durante procesos como el de cocción de carnes vacunas, porcinas, de aves como también durante el almacenamiento congelado y refrigerado de las mismas (Huang y Greene, 1978; Igene y col., 1979; Keller y Kinsella, 1973; Younathan y col., 1980; Ledward y Mac Farlane, 1971).

Ambos métodos presentan como limitación a considerar, el

hecho que la concentración de hidroperóxidos como la de malonaldehído al principio aumenta y luego disminuye, por lo cual a dos estadios de oxidación podría corresponder un mismo valor de índice de peróxido o de número de TBA. Todo esto indica la importancia de desarrollar y optimizar la aplicación de los métodos sensoriales para evaluar los procesos de oxidación.

Otra alternativa para medir el MAL producido durante la oxidación, es utilizar las técnicas de HPLC (cromatografía líquida de alta presión), la cual brinda rapidez, límites de detección sensiblemente inferiores que la espectrofotometría (1×10^{-11} - 4×10^{-11} nmoles/10 μ l) frente a (1×10^8 moles/5 ml), no siendo afectada esta técnica por la presencia de otras "sustancias reactivas al TBA" (Kakuda y col., 1981).

1.7.3.4. *Determinación de compuestos carbonílicos totales*

La determinación colorimétrica de compuestos carbonílicos totales y de compuestos monocarbonílicos totales o de sus distintas clases -alca-2-onas, alcanales, alca-2-enales y alca-2,4-dienales- también ha sido utilizada como alternativa en el seguimiento de la oxidación lipídica (Gaddis y col., 1961).

Se basa en la formación de derivados como las 2,4-dinitrofenilhidrazonas a partir de los compuestos carbonílicos presentes seguida de extracción y lectura a 340 nm. Puede complementarse esta medición, con el aislamiento de compuestos monocarbonílicos para utilizarlos también como indicadores de la oxidación (por ejemplo, carne vacuna, de cordero, de aves) (Keller y Kinsella, 1973; Kunsman y col., 1978; Mai y Kinsella, 1979).

Además, mediante técnicas de cromatografía gaseosa pueden analizarse aldehídos como hexanal -producto secundario de la oxidación del ácido linoleico- y otros, como 2,4-decadienal, relacionados con el desarrollo del llamado "warmed off-flavor" detectado durante la cocción y almacenamiento de carnes cocidas, correlacionando bien con resultados provenientes de análisis sensoriales (Reineccius, 1979; Buttery y Teranishi, 1963).

1.7.3.5. Determinación de pentano

Algunos investigadores han demostrado la formación de hidrocarburos de cadena corta por la oxidación de lípidos y en forma predominante de pentano a partir de la oxidación del ácido linoleico.

El método ha sido utilizado para seguir la oxidación de lípidos en carnes deshidratadas y congeladas y consiste en el calentamiento de la muestra en un recipiente cerrado durante 30 minutos a $T = 30^{\circ}\text{C}$, tomando luego como muestra un volumen adecuado de la atmósfera gaseosa y efectuando su análisis por cromatografía gaseosa. El pentano, como compuesto hidrocarbodo pasa por la columna, la que retiene los compuestos polares que contienen oxígeno (Seo y Joel, 1980).

Los resultados obtenidos por este método han tenido buena correlación con métodos sensoriales, en la evaluación del desarrollo del "off-flavor" (Bigalli, 1977).

1.7.3.6. Fluorescencia

La aplicación de este método se fundamenta en la

polarográficas y volumetría de Warburg.

Es uno de los métodos más adecuados para el seguimiento de la oxidación, principalmente por su facilidad en los nuevos equipos de monitoreo de oxígeno tanto en atmósfera como en medio acuoso. Uno de los inconvenientes que se suelen citar, es que la absorción de oxígeno puede no estar sólo originada en la oxidación de lípidos sino también en la de otros componentes de los alimentos (por ejemplo, proteínas) (Rhee, 1978b; Seo, 1976).

1.8. PREVENCIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA

Teniendo en cuenta los factores que influyen en el desarrollo de la rancidez oxidativa, su prevención se ha encarado considerando cada uno de los siguientes procedimientos o una combinación de los mismos:

1. Disminución de la temperatura
2. Eliminación de oxígeno
3. Aplicación de antioxidantes

La elección del método de congelación, velocidad de congelación y la temperatura de almacenamiento revisten gran importancia sobre el tiempo en que la calidad del producto registre un nivel aceptable.

La eliminación del oxígeno es otra manera de minimizar el deterioro oxidativo; la misma puede lograrse con el uso de envases en los cuales se ha eliminado el oxígeno y que a su vez sean impermeables al pasaje del mismo durante el almacenamiento.

Esto se ha logrado con el uso de películas plásticas flexibles impermeables al oxígeno y al agua (a fines de prevenir la deshidratación durante el almacenamiento) tales como el Cryovac. Varios estudios ejemplifican el uso de estos envases (Morris y Dawson, 1979).

En cuanto al empleo de antioxidantes, podemos decir que se denominan así los compuestos que retardan los procesos oxidativos. Las características de los mismos son muy variadas, existiendo tanto aquellos de naturaleza lipofílica como hidrofílica, pudiendo clasificarse de acuerdo a su forma de acción. En primer lugar están los antioxidantes preventivos o sea aquellos que interfieren en las reacciones de iniciación, pudiendo ser de naturaleza enzimática (catalasa, peroxidasa) o bien complejantes de iones metálicos (EDTA, ácido cítrico) (recordemos que los iones metálicos catalizan las reacciones de iniciación) de forma tal que se tornan menos activos en su acción catalizante.

En segundo lugar se encuentran aquellos antioxidantes que interfieren en las reacciones de propagación. Su acción se basa en que los mismos reaccionan con los radicales lipídicos originando radicales libres provenientes de los antioxidantes, los cuales resultan ser mucho más estables debido a los sistemas electrónicos de alta resonancia que presentan estos mismos antioxidantes (aminas y fenoles aromáticos tales como BHT, BHA, tocoferoles).

En tercer lugar, pueden citarse los llamados antioxidantes naturales cuyo uso en el futuro es muy promisorio. Actualmente,

se cuestionan los antioxidantes sintéticos tales como BHA y BHT por su posible toxicidad, por lo que existe una tendencia mundial a la búsqueda de nuevos antioxidantes. Varios estudios han demostrado la posibilidad del uso de proteínas e hidrolizados proteicos como antioxidantes con resultados altamente positivos (Laakso y Lilius, 1982; Kawashima y col., 1979, 1981; Yee y col., 1980).

Otro factor muy importante a tener en cuenta es el que resulta de la organización nativa de las membranas celulares. Estudios recientes (Vladimirov y col., 1980) han demostrado que las membranas celulares intactas (o sea aquellas que conservan el orden topológico de sus componentes, proteínas y fosfolípidos principalmente) presentan mayor estabilidad a la oxidación que aquellas que han sido alteradas, caotizadas o perdido su orden nativo. Trabajando con membranas de eritrocito humano se observó que las membranas intactas presentaban menores índices de oxidación que aquellas en que la estructura nativa había sido destruída. Esta diferencia de susceptibilidad a la oxidación se vio reflejada también en la fracción proteica (Funes y Karel, 1984). Es por todo ello que se habla actualmente del factor antioxidante estructural o nativo, con consecuencias no sólo en la ciencia de los alimentos sino también en la biología de los seres vivos.

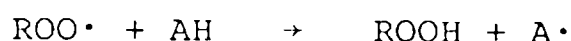
Uno de los aspectos más importantes en el uso de los antioxidantes es en cuanto a la técnica de aplicación al alimento. Es claro ver que el agregado de un antioxidante a un aceite vegetal es mucho más simple que la aplicación del mismo a un

sistema cárnico en donde coexisten varias fases. De allí que uno de los puntos críticos en el éxito del uso de antioxidantes es la aplicación del mismo al alimento. En productos de pesca se suele sumergir los pescados en soluciones de antioxidantes antes de proceder a su congelación; varios estudios ejemplifican este hecho (Deng y col., 1977; Morris y Dawson, 1979).

Los estudios cinéticos del proceso de oxidación de lípidos puros en presencia de un antioxidante fenólico del tipo de BHA o BHT han conducido a la siguiente expresión de la velocidad global de la reacción en esas condiciones:

$$r = \frac{k_3 r_i}{2 k_A} \frac{[\text{ROOH}]}{[\text{AH}]} \quad (5)$$

en donde: $[\text{AH}]$: concentración de antioxidante; k_A : velocidad de la reacción;



Esta expresión indica que esa velocidad depende fundamentalmente de la relación $[\text{ROOH}]/[\text{AH}]$. Este hecho nos conduce al importante concepto que el agregado del antioxidante se debe realizar antes que la oxidación tenga lugar o adquiriera cierta magnitud. Es decir que si la concentración de hidroperóxidos lipídicos es elevada en el momento del agregado del antioxidante, el mismo será incapaz de detener el proceso oxidativo. Por lo tanto, nuevamente se enfatiza el hecho que es necesario prevenir pues una vez establecido el deterioro de rancidez, el

mismo es irreversible.

Otra forma en que se han usado los antioxidantes es durante la aplicación del glaccado a pescado, con agua pura o bien con el agregado de sustancias antioxidantes. El glaccado consiste en producir capas de hielo alrededor del pescado de manera tal de impedir la difusión del oxígeno al mismo y minimizar la deshidratación. Con esta técnica se ha logrado prolongar el tiempo de guarda de sardinas y caballas.

1.9. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de tesis es el estudio del efecto de la refrigeración y almacenamiento refrigerado así como también el de la congelación y almacenamiento congelado sobre la rancidez oxidativa en carnes de diversas especies.

El desarrollo del mismo involucra:

- Optimización de un método que permita la evaluación de la oxidación lipídica durante el almacenamiento refrigerado y congelado de carnes.
- Análisis de la influencia que ejercen sobre dicho proceso la velocidad de congelación, el tiempo y la temperatura de almacenamiento.
- Estudio de la interacción lípidos autooxidados-proteínas, como consecuencia del deterioro producido, a través de su comportamiento electroforético.
- Propuesta de un método combinado de preservación aplicable a un alimento de alto contenido graso.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1. MUESTRAS UTILIZADAS

En las distintas experiencias llevadas a cabo se utilizaron las siguientes especies y músculos:

- carne vacuna (Músculo semitendinoso bovino, 48 hs post-mortem) en estado fresco;
- carne de pescado (salmón de mar) en estado fresco;
- carne de pollo (pechuga) en estado fresco.

En el caso de la carne de pollo se utilizaron las pechugas previa eliminación de la grasa exterior visible, la cual también fue separada al trabajar con carne vacuna. En el caso de pescado, se empleó la totalidad de los músculos eliminándose con antelación las vísceras y el tejido adiposo.

Además se utilizaron:

- muestras de tocino dorsal sin salar (secciones de 5x5x3 cm) las que fueron envasadas individualmente en las siguientes películas plásticas flexibles:
 - a) polietileno de baja densidad de 60 μm de espesor. Permeabilidad al vapor de agua: 12 g vapor/ m^2 día a 30°C y HR: 78%; Permeabilidad al oxígeno: 6500 cm^3/m^2 atm día a 23°C.
 - b) EVA/SARAN/EVA (nombre comercial Super Cryovac, DAREX SAIC) de 60 μm de espesor. Permeabilidad al vapor de agua: 7,2 g/ m^2 día a 30°C y HR: 78%; Permeabilidad al oxígeno: 37,5 cm^3/m^2 atm día a 25°C y HR: 75%.

El envasado al vacío se realizó en el equipo Minidual (Schcolnik) de campana simple a 4,5 mm Hg y termosellado.

El desarrollo del trabajo experimental involucró el procesamiento de muestras en estado fresco, refrigerado, congelado a

distintas velocidades de congelación y muestras almacenadas congeladas a distintas temperaturas ($T = -5, -10$ y -20°C , respectivamente).

2.2. REFRIGERACION Y ALMACENAMIENTO REFRIGERADO

Con el propósito de estudiar la influencia del proceso de refrigeración sobre la oxidación lipídica, se diseñaron experiencias en tal sentido.

A partir de un mismo músculo semitendinoso se cortaron trozos -de aproximadamente 10 y 30 g, respectivamente- los que fueron envasados en películas de polietileno. Las muestras fueron tratadas con azida sódica en una concentración de 0,02% a fin de impedir el desarrollo bacteriano.

El almacenamiento se realizó en cámara a $T = 4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por el término de 20 días colocando las muestras en un desecador provisto con agua en su parte inferior para evitar la deshidratación de las mismas.

El muestreo se realizó extrayendo muestras al azar cada 3 días por el término de alrededor de 20 días.

2.3. CONGELACION Y ALMACENAMIENTO CONGELADO

2.3.1. Método de Congelación

Muestras de músculo semitendinoso bovino -de aproximadamente 30 g- recubiertas por una película de polietileno se congelaron en un intercambiador de placas paralelas lo que permitió simular

lo que ocurre en los procesos industriales. Se utilizaron dos criostatos Lauda UK 50 DW que suministraron el líquido refrigerante (metanol), el cual circulaba por las placas del intercambiador. El sistema estaba provisto de aislación lateral constituido por poliestireno expandido de 5 cm de espesor.

Una serie de termocuplas de cobre-constantan (Cu-Cn) -calibradas a 0 y 100°C con una mezcla de agua-hielo y agua en ebullición, respectivamente- fueron ubicadas en distintas muestras, sobre las placas metálicas y en el baño de metanol, conectándolas seguidamente a un sistema de adquisición de datos Datalogger Fluke modelo 2240 C. Esto permitió registrar las temperaturas (en °C) de cada termocupla en función del tiempo (en minutos) para obtener así, la historia térmica del proceso de congelación.

Una vez que las muestras de carne alcanzaron uniformidad a la temperatura final deseada ($T = -35^{\circ}\text{C}$) -temperatura próxima a la de los baños criostáticos-, las mismas fueron trasladadas a cámaras de almacenamiento (marca Longhi Hns.) con control de temperatura de $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

La congelación de muestras de carne de pollo, pescado y tocino (sin salar) se realizó en forma similar a la descrita para carne vacuna.

2.3.2. Congelación de músculos de diversas especies a distintas velocidades de congelación

De acuerdo al método de congelación detallado en el punto anterior, se llevaron a cabo procesos de congelación de carnes de diversas especies empleando distintas velocidades de congela-

ción: rápida y lenta, respectivamente.

La velocidad de enfriamiento se reguló interponiendo distintos espesores entre las placas metálicas.

Se adoptó como medida de la velocidad de congelación el tiempo característico t_c , es decir el tiempo necesario para que la temperatura del centro de la muestra varíe desde $-1,1^{\circ}\text{C}$ (temperatura de congelación del agua del tejido muscular) a -7°C (temperatura a la cual se ha congelado el 80% del agua tisular) (Riedel, 1957; Mascheroni, 1977; Bevilacqua y col., 1979; Añón y Calvelo, 1980).

Velocidades de congelación rápidas en músculos de pescado y pollo se lograron colocando las muestras en contacto directo con las placas metálicas. En cambio, velocidades lentas se obtuvieron colocando dos placas de aglomerado de 2 cm de espesor entre las placas del intercambiador.

2.3.3. Almacenamiento congelado

Las muestras de carne -de las diversas especies- congeladas según el método descrito en las secciones 2.3.1. y 2.3.2., fueron almacenadas en congeladores para luego ser procesadas a través de las técnicas que se detallarán oportunamente.

En el caso de carne vacuna y de pollo, el almacenamiento se realizó a $T = -5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por un período de 4 meses. La carne de pescado se almacenó a $T = -5$ y $-20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por el término de 4 y 6 meses, respectivamente. En lo que se refiere al tocino (sin salar), el almacenamiento se prolongó aproximadamente 6 meses a $T = -10$ y -20°C , respectivamente.

Las tomas de muestra se realizaron periódicamente -cada 10 ó 15 días- extrayendo muestras al azar de cada una de las especies a fin de ser debidamente estudiadas.

2.4. DESCONGELACION

Con el objeto de realizar posteriores determinaciones, las muestras de carne congelada de las distintas especies fueron descongeladas a tiempos preestablecidos en una cámara con aire estanco y temperatura controlada ($T = 65 \pm 2^\circ\text{C}$, $t = 15-20$ min).

2.5. OBTENCION DE MIOFIBRILLAS

Las miofibrillas se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Goll y Robson (1967) modificado por Wagner y Añón (1985), según el Esquema 1. Se trabajó a $T = 2-4^\circ\text{C}$ durante todos los pasos involucrados en la extracción a fin de evitar alteraciones de las proteínas por efecto térmico. Se utilizaron las siguientes soluciones para la aislación y purificación de las miofibrillas.

Aislación de miofibrillas y solubilización de proteínas sarcoplasmáticas

Solución A: 0,25 M Sacarosa, 1 mM EDTA, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6

Resuspensión de miofibrillas y separación del tejido conectivo

Solución B: 1 mM EDTA, 0,05 M Tris-HCl pH 7,6

Purificación de miofibrillas aisladas

Solución 1: 0,15 M KCl, 0,03 M Tris-HCl pH 7,6

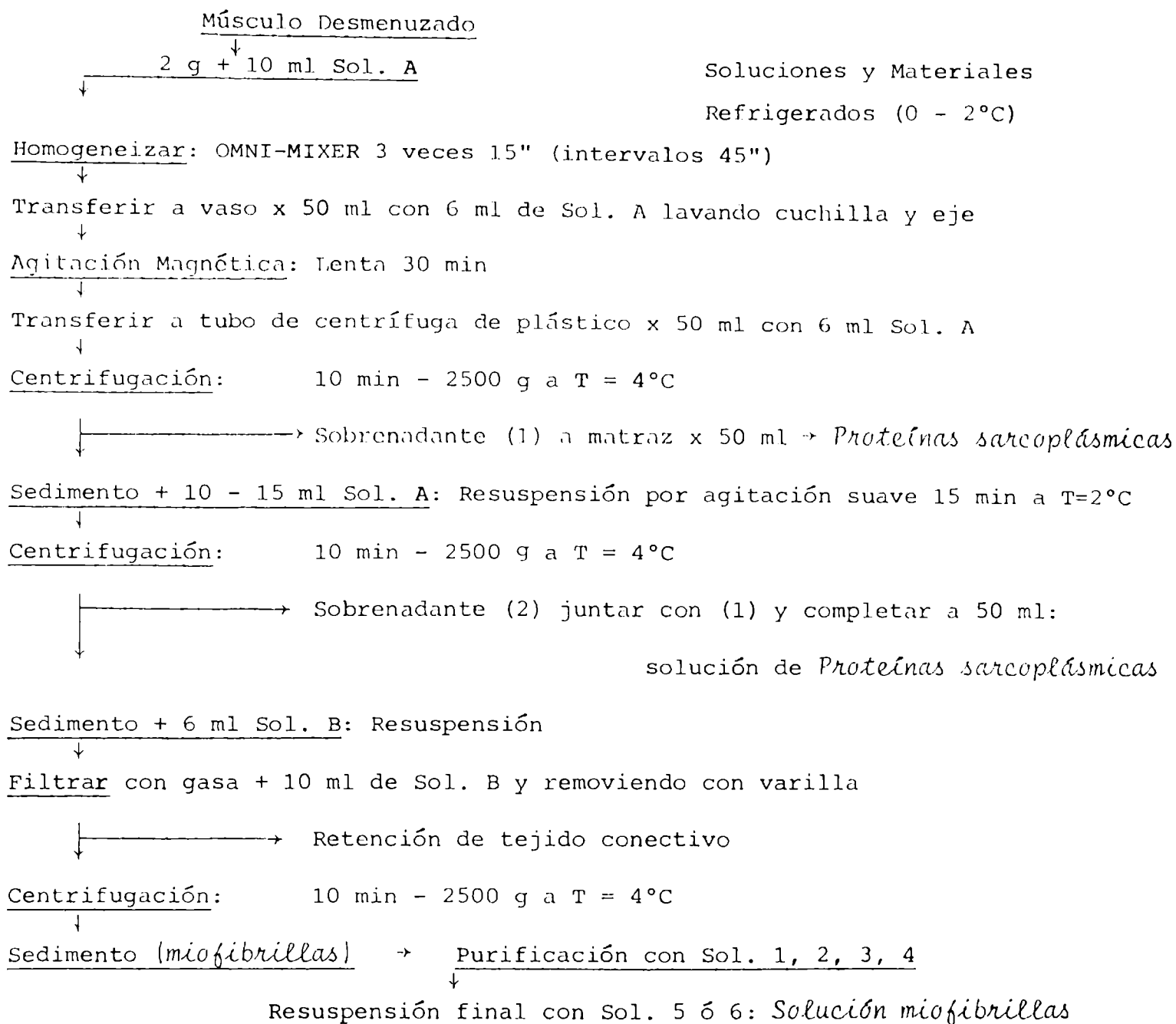
Solución 2: 1 mM EDTA, pH 7,6

Solución 3: Agua bidestilada

Solución 4: 0,6 M KCl, 0,03 M Tris-HCl pH 7,6

ESQUEMA 1

PREPARACION DE MIOFIBRILLAS



Se tomaron aproximadamente 2 g de músculo finamente desmenuzado, se pesaron en papel de aluminio con una precisión de ±0.2 mg, transfiriéndose a un homogeneizador OMNI MIXER con 10 ml de solución A (5 Vol). Las muestras se homogeneizaron en 3 períodos de 15 seg de duración y 45 seg de intervalo a 2°C. El extracto obtenido fue trasladado a un vaso de precipitado y se agitó lentamente con un agitador magnético durante 30 minutos a 2°C. La suspensión

resultante fue seguidamente centrifugada a 2500 x g durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall - RC 5 B Refrigerated Superspeed de Du Pont Inst.

El sobrenadante obtenido, que contiene la mayoría de las proteínas sarcoplásmicas, se transfirió a un matraz de 50 ml. El sedimento, constituido principalmente por miofibrillas, fue resuspendido con 10 ml de solución A, se agitó suavemente con agitador magnético durante 15 minutos a 2°C y se centrifugó nuevamente a 2500 x g por 10 minutos a 4°C. El nuevo sobrenadante, reunido con el anterior y completado a 50 ml con agua destilada contiene la totalidad de las proteínas sarcoplásmicas del músculo. Las miofibrillas sedimentadas se resuspendieron con solución B y filtraron a través de una gasa doble, a efectos de separar el tejido conectivo. Luego del proceso de aislamiento se practicó el de purificación de las miofibrillas por sucesivas resuspensiones con agitación magnética en soluciones 1, 2, 3, 1 y 1, seguidas por centrifugación.

Finalmente, las miofibrillas purificadas se suspendieron en solución 1 o se solubilizaron parcialmente en solución 4 (volumen final 25 ml) según su posterior utilización.

Tanto a la fracción de miofibrillas como a la de proteínas sarcoplásmicas, se les agregó azida sódica a una concentración 1 mM, para asegurar su preservación en cámara de 4°C, inhibiendo el desarrollo fúngico y bacteriano.

2.6. EXTRACCION DE LIPIDOS

La extracción de lípidos se realizó sobre muestras de tocino (sin salar) congelado - almacenadas a T = -5°C- descongelándolas previamente de acuerdo al método de Bligh and Dyer (1959) modificado por Hanson and Olley (1963) según el esquema presentado por deKoning y col. (1985).

Dichos lípidos fueron destinados a la determinación del índice de peróxido (PV).

Análogamente, se practicó la extracción de lípidos de músculo semitendinoso bovino 48 hs post-mortem a fin de contar con este material para la formulación de los distintos sistemas LIPIDO-PROTEINAS.

En todos los casos, los lípidos fueron disueltos en hexano y almacenados en balones -efectuándose un burbujeo previo con nitrógeno (N_2) en un congelador a $T = -60^\circ C$ para evitar su oxidación.

2.7. OBTENCION DEL EXUDADO

Muestras de carne vacuna refrigerada y congelada llevadas a temperatura ambiente, fueron transferidas a tubos de centrifuga provistos en su interior de una criba de acrílico. Se realizaron tres centrifugaciones a 2000 g durante 10 minutos a $10^\circ C$ en una centrifuga Sorvall-RC 5B Refrigerated Superspeed de Du Pont Inst. De esta manera, se colectaron las fracciones provenientes de cada una de las centrifugaciones cuyo conjunto constituye el exudado, calculándose posteriormente el rendimiento porcentual con respecto a la masa de carne empleada.

La utilización de cribas de acrílico permitió un mejor drenaje del exudado durante la etapa de centrifugación y una adecuada separación de la masa de carne.

El exudado así obtenido, de coloración rojiza, fue tratado con ácido tricloroacético (TCA) en una concentración final de 7,5 %v/v, agitando con varilla de vidrio para lograr una buena

homogeneización y acción del reactivo. Se empleó esta metodología a fin de lograr una buena precipitación de las proteínas, evitándose de esta manera la aparición de turbidez en el exudado desproteinizado.

El precipitado obtenido se separó del resto del exudado por centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos a 10°C. El sobrenadante incoloro se separó tratando de no tomar partículas del residuo sólido y se obtuvo así el exudado desproteinizado.

Procedimientos similares se siguieron con carne congelada de pollo y pescado previamente descongeladas.

2.8. DESTILACION

A fin de posibilitar el posterior estudio de la oxidación de lípidos en carnes refrigeradas y congeladas, se utilizó el método de destilación descrito por Tarladgis y col. (1960). El mismo consiste en la destilación por arrastre con vapor en medio ácido (97,5 ml H₂O + 2,5 ml HCl (4 N) de muestras de carne - de distintas especies- (aprox. 10 g), recogiénose en cada caso un volumen de destilado de 50 ml sobre el que se practicó el ensayo de TBA.

2.9. ENSAYO DEL ACIDO 2-TIOBARBITURICO (TBA)

Con el objeto de realizar el seguimiento de la oxidación lipídica durante el almacenamiento congelado y refrigerado de las carnes utilizadas, se practicó el Ensayo de TBA.

Se determinó el contenido de sustancias reactivas al TBA, constituidas principalmente por malonaldehído (MAL), presente en el exudado desproteinizado y en el destilado según las técnicas

de Matsushita (Asakawa y Matsushita, 1980) modificada por nosotros, y la de Tarladgis y col. (1960).

2.9.1. Técnica de Matsushita modificada

A 0,3 ml de muestra (exudado desproteínizado o destilado) se agregaron 1,5 ml de solución de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (0,5 g de TBA y 0,3 g de dodecil sulfato de sodio (SDS) en 100 ml de agua) más 1,5 ml de buffer glicina 0,2 M/HCl (pH = 3,6) (Dawson y col., 1969). La mezcla se calentó a 100°C durante 15 minutos en baño hirviente, cubriendo los tubos con bolitas de vidrio. Seguidamente, se enfrió en baño de hielo fundente y se procedió a la lectura espectrofotométrica a 532 nm. En todos los casos, se realizó un blanco utilizando para ello agua destilada. El volumen de 0,3 ml de muestra fue determinado a través de una serie de ensayos previos a fin de aumentar la sensibilidad del método.

Este ensayo de TBA fue además llevado a cabo para determinar el contenido de sustancias reactivas al TBA presentes en la suspensión de lípidos de los distintos sistemas formulados para el estudio de la interacción lípidos autoxidados-proteínas.

En este caso, se agregó a cada uno de los tubos 1,0 ml de ácido acético más 2,0 ml de cloroformo seguido de centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos a 10°C en una centrífuga marca Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed de Du Pont Inst.

Este procedimiento permitió la extracción de lípidos presentes en el medio de reacción los cuales producirían turbidez y serían una interferencia en la posterior lectura espectrofotométrica.

trica a 532 nm.

2.9.2. Técnica de Tarladgis

A 1,5 ml de muestra (exudado desproteínizado o destilado) se agregaron 1,5 ml de reactivo de TBA (solución 0,02 M de TBA en ácido acético 90 %v/v). La mezcla se calentó en baño hirviente durante 35 minutos a 100°C, procediendo luego a su enfriado en baño de hielo fundente. Se leyó entonces por espectrofotometría a 532 nm. En todos los casos, se realizó un blanco utilizando para ello agua destilada (Tarladgis y col., 1960).

Todas las lecturas espectrofotométricas fueron realizadas en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-150-02.

El nivel de oxidación lipídica se expresó a través del número de TBA (mg MAL/kg carne), el cual fue calculado en base a la siguiente expresión:

$$n^{\circ} \text{ TBA} = \frac{A \cdot V \cdot D \cdot 100 \cdot PM}{V_A \cdot W \cdot \epsilon_M} \quad (6)$$

donde

A = absorbancia

V = volumen total de exudado

D = factor de dilución

V_A = volumen de exudado que interviene en la reacción de TBA

W = peso de la muestra

PM = peso molecular del MAL

ϵ_M = coeficiente de absorción molar aparente

2.10. BARRIDOS ESPECTROFOTOMETRICOS

A efectos de estudiar la sensibilidad y especificidad de las distintas técnicas empleadas para el ensayo de TBA, se realizaron barridos espectrofotométricos sobre las soluciones resultantes de las reacciones de TBA obtenidas tanto a través de la técnica modificada de Matsushita como la de Tarladgis, determinándose los máximos de absorción respectivos. El análisis se realizó en la región espectral comprendida entre 420 y 560 nm, registrando la absorbancia cada 2 nm en la zona de los máximos o cada 10 nm en el resto. La calibración de las mediciones se realizó con un ensayo en blanco usando como muestra agua destilada.

2.11. ENSAYOS DE RECUPERACION

Con el propósito de determinar el porcentaje de recuperación de MAL en el exudado desproteínizado y en la destilación, se procedió a realizar una serie de experiencias agregando MAL tanto a sistemas simples (agua y exudado) como también inyectándolo a trozos de músculo semitendinoso vacuno fresco.

2.11.1. Exudados

Sistemas simples H₂O-TCA-MAL y Exudado-MAL

En experiencias independientes, se agregaron cantidades crecientes de MAL (0-0,8 ml de solución acuosa de MAL (30 µg/ml)) a 5,0 ml de agua (con TCA 7,5 %v/v) y a 5,0 ml de exudado de manera tal que la concentración final de MAL en la cubeta de lectura

varió entre 0 y 5×10^{-6} M.

En el caso del exudado, luego del agregado de MAL se procedió a la desproteínización con TCA (7,5 %v/v) de la forma explicada anteriormente.

Carne inyectada con MAL

En el caso de carne vacuna, se inyectaron cantidades crecientes de MAL (0-0,8 ml de solución acuosa de MAL (30 μ g/ml)) a trozos de carne de aproximadamente 30 g. La inyección de la solución fue hecha en distintos puntos del trozo de carne a fin de lograr mayor homogeneidad en el agregado. La solución acuosa de MAL fue obtenida a partir de la hidrólisis de 10 μ l de 1,1,3,3 tetractoxipropano (TEP) marca Fluka en 10 ml de HCl 0,1 N y posterior calentamiento en baño de agua hirviente durante 5 minutos, efectuándose las diluciones adecuadas con agua destilada. Se obtuvieron posteriormente los respectivos exudados desproteínizados de los trozos de carne inyectados con cantidades crecientes de MAL a los tiempos 0, 1, 2, 3 y 4 días a partir de la incorporación del aldehído. El tiempo 0 día fue procesado aproximadamente una hora después de su inyección, tiempo que demandó el posterior trabajo experimental.

Sobre los sistemas simples (agua y exudado) y sobre el exudado desproteínizado proveniente de carne inyectada con MAL se procedió a realizar la reacción de TBA, de acuerdo a las técnicas de Tarladgis y col. (1960) y de Matsushita modificada.

2.11.2. Destilados

Sistemas simples H₂O - MAL

Se realizaron los ensayos de TBA directamente sobre agua agregando cantidades crecientes de MAL (0-0,8 ml de MAL (solución acuosa 30 µg/ml)) a 5,0 ml de agua destilada.

Carne - MAL agregado al balón

En balón tipo Kjeldahl de 500 ml se introdujeron muestras de aproximadamente 10 g de carne vacuna con 97,5 ml de agua y 2,5 ml de HCl 4 N. Se agregaron entonces de 0-1,0 ml de MAL (30 µg/ml). Se procedió luego a su destilación de acuerdo a la técnica de Tarladgis y col. (1960) y sobre el destilado se realizó la reacción de TBA.

Carne inyectada - MAL

En forma similar al caso de obtención del exudado, se procedió a inyectar de 0 a 0,25 ml de solución acuosa de MAL (120 µg/ml) a trozos de carne de aproximadamente 10 g. Debido al menor tamaño de la muestra de carne se debió aumentar la concentración de la solución de MAL inyectada. Posteriormente, se llevó a cabo la destilación de dichos trozos de carne a los tiempos 0, 1, 2, 3 y 4 días a partir de la incorporación de MAL, de acuerdo a la técnica descripta por Tarladgis y col. (1960). Se practicaron luego, sobre los respectivos destilados, ambas reacciones de TBA (Tarladgis y Matsushita modificada).

El MAL agregado fue obtenido según la técnica descripta en la

sección 2.11.1.

En todos los ensayos de recuperación, se procedió a graficar la absorbancia leída en función de la concentración molar de MAL en la cubeta de lectura, considerando que la totalidad de MAL hubiese sido recuperada. A partir de las pendientes de dichas rectas se obtuvieron los coeficientes de absorción molar aparentes y a partir de ellos, los respectivos factores de recuperación. Se consideró como 100% el coeficiente de absorción molar obtenido para el sistema agua destilada más MAL. En este caso no hubo diferencia alguna cuando el coeficiente de absorción molar fue obtenido por la técnica de Tarladgis o la de Matsushita modificada.

2.12. PEROXIDACION DE LIPIDOS

La peroxidación de lípidos se llevó a cabo agregando a 20,0 ml de una solución 0,6 M KCl 0,03 M Tris pH = 7,6, 2,0 ml de lípidos disueltos en hexano. Este sistema y otro tomado como "control" -es decir en ausencia de lípidos- fueron incubados en un baño de agua con agitación marca Hetofrig a $T = 30 \pm 2^\circ\text{C}$. Ambos sistemas fueron tratados con azida sódica en una concentración final de 0,02% para impedir el desarrollo fúngico y bacteriano.

A fin de poder seguir el curso de la oxidación de lípidos en los mismos, se practicó diariamente el ensayo de TBA según la técnica de Matsushita modificada por nosotros.

2.13. INDICE DE PEROXIDO

El contenido de hidroperóxidos -productos primarios de la oxidación- presentes en lípidos provenientes de muestras de tocino (sin salar) congelado fue determinado mediante el índice de peróxido (PV).

Para ello se procedió a la disolución de los lípidos mediante el agregado de 10 ml de una mezcla de ácido acético-cloroformo (3:2). Luego se adicionó un volumen de 0,5 ml de una solución saturada de ioduro de potasio, se esperaron exactamente 2 minutos y después se agregaron 15,0 ml de agua destilada y 0,8 ml de una solución de almidón (1%) hasta la aparición de una coloración púrpura-azulada. Seguidamente, se prosiguió realizando una titulación de la solución con tiosulfato de sodio 0,001 N hasta la desaparición completa de la coloración mencionada. En caso de no producirse coloración alguna luego del agregado del almidón (indicador), se consideró cero el valor de este índice.

El índice de peróxido (PV) se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$PV = \frac{\text{meq } O_2}{\text{kg lípidos}} = \frac{1000 \cdot V \cdot N}{m} \quad (7)$$

donde

V = volumen $Na_2S_2O_3$ (ml)

N = normalidad de $Na_2S_2O_3$

m = masa de lípidos (g)

2.14. INDICE DE ACIDEZ

Este índice da una medida de los ácidos libres presentes en las muestras.

Una alícuota obtenida a partir del procedimiento de extracción de lípidos detallado en la sección 2.6., se disolvió en un volumen de 60 ml de solución Etanol-Eter etílico (1:1) neutralizado a la fenolftaleína. Luego se efectuó una titulación con NaOH 0,1 N hasta un color de fenolftaleína débilmente rosa que persista durante 30 seg.

Los resultados se expresaron como:

$$\text{mg KOH/g grasa} = \frac{V \cdot N \cdot 56}{m \text{ grasa}} \quad (8)$$

donde

V = volumen de solución de NaOH utilizado

N = normalidad de la solución NaOH

m = masa de lípidos extraída

siendo 56 el PM del KOH.

2.15. DETERMINACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas se determinó por los siguientes métodos: a) Lowry y col. (1951) y b) Gornall y col. (1949) modificado por Robson y col. (1968). Para la aplicación de ambos métodos se obtuvieron las respectivas curvas de calibración a partir de una solución 10 mg/ml de albúmina bovina.

2.16. INTERACCION LIPIDOS AUTOXIDADOS-PROTEINAS

Para poder analizar la interacción lípidos autoxidados-proteínas, se diseñaron experiencias que involucraron la conformación de distintos sistemas de trabajo, los cuales se detallan a continuación:

1. Sistema constituido por miofibrillas almacenadas a $T = 4 \pm 1^\circ\text{C}$ (CONTROL a 4°C): (M_4) a 10,0 ml de miofibrillas (10 mg/ml) se agregó igual volumen de una solución 0,6 M KCl 0,03 M Tris pH = 7,6.
2. Sistema similar al anterior constituido por miofibrillas que fue incubado en un baño de agua con agitación a $T = 25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante el tiempo de duración de las experiencias ($t = 28$ hs) (CONTROL 25°C): (M_{25}).
3. Sistema formado por proteínas miofibrilares y lípidos de músculo semitendinoso bovino: (M+L).

Análogamente, se trabajó con un sistema de composición similar al sistema (M+L) con la particularidad de haber sido incubado en atmósfera de nitrógeno: $(M+L)_{N_2}$.

A 10,0 ml de proteínas miofibrilares de músculo bovino (10 mg/ml) se adicionó 1,0 ml de lípidos (100 mg/ml) más 15,0 ml de solución 0,6 M KCl 0,03 M Tris pH = 7,6. Se utilizó un homogeneizador OMNI-MIXER durante el agregado de los lípidos a fin de lograr una mayor eficiencia en la emulsificación del sistema, es decir una mejor dispersión de los lípidos en el medio de incubación.

4. Sistema constituido por miofibrillas y productos provenientes de la peroxidación lipídica de músculo semitendinoso bovino: (M+Per).

A 10,0 ml de miofibrillas (10 mg/ml) se agregaron 10,0 ml de productos provenientes de la peroxidación lipídica más 5,0 ml de solución 0,6 M KCl 0,03 M Tris pH = 7,6.

Todos los sistemas fueron tratados con azida sódica en una concentración final del 0,02% a fin de impedir tanto el desarrollo fúngico como el bacteriano. Los sistemas M+L y M+Per al igual que M₂₅ fueron incubados en un baño de agua con agitación a T = 25±2°C durante aproximadamente 28 hs.

A distintos tiempos de incubación, se practicaron las correspondientes tomas de muestra de los respectivos sistemas de trabajo.

Sistemas M₄ y M₂₅: a 0,1 ml de muestra se le adicionó igual volumen de buffer Urea 8 M SDS 0,3% pH = 9, azul de bromofenol 0,001% (Buffer de Muestra). Paralelamente, otra alícuota fue tratada con 0,1 ml de buffer Urea 8 M SDS 0,3%, mercaptoetanol 20 mM, azul de bromofenol 0,001% (Buffer de Muestra con M.E.). Sobre dichas muestras -así tratadas- se practicó electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Sistemas (M+L) y (M+Per): a 0,1 ml de muestra se le adicionó 0,1 ml de Buffer de Muestra. Análogamente, se tomó otra alícuota sobre la que se efectuó el mismo tratamiento con mercaptoetanol (M.E.). Sobre estas muestras se realizaron corridas electroforéticas (SDS-PAGE).

2.17. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO DE SODIO (SDS-PAGE)

Las especies proteicas presentes en cada uno de los sistemas

miofibrillas-lípidos descritos previamente fueron determinadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Para ello se prepararon placas de gel de poliacrilamida 10% con agregado de SDS, de acuerdo al sistema de buffer discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970; Laemmli y Favre, 1973). Las corridas electroforéticas se realizaron en un equipo para electroforesis en gel de la Marca Pharmacia GE - 214 utilizando las siguientes soluciones:

- a) Solución madre de acrilamida-bisacrilamida: acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8% en agua destilada (bisacrilamida = N, N', metilen-bis-acrilamida).
- b) Solución buffer para el gel apilador ("Stacking"): Tris 0,5 M, SDS 0,4%, TEMED 0,4%, HCl 1 N hasta pH 6,8 (Tris = Tris (hidroximetil) aminometano, TEMED = N, N, N', N', tetrametil etilendiamina).
- c) Solución buffer para el gel separador: Tris 1,5 M, SDS 0,4%, TEMED 0,4%, HCl 1 N hasta pH 8,8.
- d) Solución buffer de corrida 3,5X: Tris 0,05 M, glicina 0,384 M, SDS 0,35%, HCl 1 N hasta pH 8,3.
- e) Solución buffer para preparación de la muestra: Urea 8 M, SDS 0,3% (con o sin ME 5%) glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001%, pH 9 (ME = mercaptoetanol).
- f) Solución fijadora: isopropanol 25%, ácido acético 10% en agua destilada.
- g) Solución colorante (para coloración por difusión en el gel): Coomassie Brilliant Blue R-250 0,02% en solución acuosa de ácido acético 7,5%.

h) Solución decolorante: Metanol 25%, ácido acético 10% en agua destilada.

2.17.1. Preparación de placas de gel de poliacrilamida

Las placas de gel de poliacrilamida se prepararon de acuerdo a la siguiente formulación:

- Gel separador (acrilamida 10%, bisacrilamida 0,27%): 1 volumen de solución (a) + 1 volumen de solución (c) + 1 volumen de persulfato de amonio 0,1%.

- Gel de "Stacking" (apilador) (acrilamida 4%, bisacrilamida 0,1%): un volumen de solución (a) + 2 volúmenes de solución (b) + 1 volumen de Glicerol + 3,5 volúmenes de persulfato de amonio 0,1%.

2.17.2. Preparación de las muestras de proteínas miofibrilares y patrones de peso molecular conocido

A alícuotas provenientes de cada uno de los sistemas se les agregó buffer de muestra con o sin mercaptoetanol (Relación 2:1) y se incubaron a 100°C durante 5 minutos. De estas preparaciones se sembraron entre 25 y 30 μ l en cada carril del gel, lo cual corresponde a una siembra de 75-120 μ g de proteína.

Como proteínas patrones se utilizó un kit de Pharmacia de la siguiente composición:

Proteína	PM	μ g/vial
fosforilasa b	94000	64
sero albúmina bovina	67000	83

ovoalbúmina	43000	147
anhidrasa carbónica	30000	83
inhibidor de tripsina (soja)	20100	80
lactoalbúmina	14400	121
		578 γ totales de proteína/vial

Al vial se le agregaron 100 μ l de solución (e) con ME 5% y se incubó a 100°C durante 5 minutos. De esta preparación se sembraron 10 μ l (58 γ de proteína) en el carril central de cada placa, para poder estimar los PM de las bandas obtenidas en los distintos sistemas constituidos por lípidos-proteínas miofibrilares.

2.17.3. Condiciones de corrida

Como buffer de corrida se utilizó la solución (d) diluída con agua, 3,5 veces (1x). El equipo para electroforesis se conectó a una fuente y se reguló la tensión para que circulen 25 mA de intensidad por placa. El tiempo total de corrida fue aproximadamente de 24 horas.

2.17.4. Coloración de bandas

Una vez concluídas las corridas, se trataron los geles por inmersión sucesiva en:

- i) solución fijadora (f), 2 horas
- ii) solución colorante (g), 24 horas
- y iii) solución decolorante (h), el tiempo suficiente para deco-

lorar las zonas desprovistas de proteínas. Finalmente se las lavó y conservó en agua destilada a $T = 4^{\circ}\text{C}$ para evitar el desarrollo fúngico.

2.18. DENSITOMETRIA DE GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

El análisis densitométrico se llevó a cabo en un densitómetro marca Shimadzu "dual Wave length TLC Scanner CS-910" acoplado a un registrador C-RIA Chromatopac Shimadzu Integrator. Las lecturas se efectuaron por transmisión, doble longitud de onda y barrido lineal. λ muestra = 570 nm y λ referencia = 395 nm.

2.19. METODOS ESTADISTICOS

El análisis estadístico en cada caso fue procesado con el paquete Multivariate General Linear Hypothesis (MGLH) del Software SYSTAT en una computadora Personal IBM - XT.

RESULTADOS

Y

DISCUSION

CAPITULO 3

OXIDACION LIPIDICA EN CARNES:
EFECTO DE LA REFRIGERACION Y EL
ALMACENAMIENTO REFRIGERADO

3.1. CONSIDERACIONES GENERALES

De acuerdo con lo expresado anteriormente en la sección 1.7, la oxidación de lípidos es un proceso de deterioro de origen químico sumamente complejo que involucra alteraciones tanto en la fracción lipídica como en otros componentes de los alimentos (proteínas, vitaminas, etc.). Durante dicho proceso se producen hidroperóxidos lipídicos, los que a su vez pueden intervenir en otras reacciones originando productos secundarios de oxidación tales como: compuestos carbonílicos, alcoholes, ácidos, hidrocarburos, lactonas, ésteres y polímeros. Dichos compuestos no sólo permanecen en la fracción lipídica sino que también se distribuyen en la fase acuosa como en la gaseosa inmediata al alimento (Karel, 1973; Gray, 1978; Seo y Joel, 1980).

Debido a estas características, el proceso de rancidez puede seguirse a través de mediciones aplicadas a varios componentes del alimento (malonaldehído, ácidos grasos, pentano, oxígeno, etc.) (Melton, 1983).

Con el objeto de estudiar el efecto de la refrigeración sobre la oxidación de lípidos, se investigó la existencia de parámetros de rancidez oxidativa en el exudado proveniente de carnes refrigeradas almacenadas a 4°C.

La elección del exudado como sistema de estudio se basó en lo siguiente:

1. El mismo constituye una parte natural de la carne que contiene la mayoría de los componentes hidrosolubles de la misma y por lo tanto, los productos de descomposición hidrosolubles de la oxidación lipídica.

2. La obtención del exudado no involucra procesos deteriorativos o traumáticos para la carne, agregado de reactivos químicos ni aplicación de altas temperaturas, de manera tal que se podría asegurar que las propiedades químicas y bioquímicas del exudado obtenido son las mismas que las del exudado dentro de la carne.
3. El exudado de la carne constituye una parte de la misma pero mucho más simple, ya que su estudio se simplifica enormemente, sin tener la simplicidad de un sistema modelo.

3.2. DETERMINACION DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL TBA

En el exudado de carnes refrigeradas se investigó la presencia de malonaldehído -producto secundario de la oxidación lipídica- o más precisamente de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), aplicando para ello los métodos de Matsushita (Asakawa y Matsushita, 1980) con algunas modificaciones y de Tarladgis y col. (1960) con la posterior comparación crítica de ambas metodologías. A efectos prácticos, denominamos MAL al conjunto de sustancias reactivas al TBA (alcanales, 2-alquenes, 2,4-alcadienales, etc.) incluyendo principalmente al malonaldehído propiamente dicho (Marcuse y Johansson, 1973; Patton, 1974; Almandós y col., 1986; Kosugi y Kikugawa, 1985, 1986).

La parte experimental básica consistió en la determinación del número de TBA, expresado como $N^{\circ} \text{TBA} = \text{mg de MAL/kg carne refrigerada}$, en función del tiempo de almacenamiento. Dicho número de TBA fue calculado tal como se especificó en la sección 2.9., habiendo sido el primer paso la obtención del exudado,

según lo descrito en la Sección 2.7. Posteriormente, se procedió a la desproteínización mediante la acción de ácido tricloroacético a fin de eliminar el color rojizo propio del exudado debido a la presencia de mioglobina que interferiría en la reacción de TBA.

A partir del exudado desproteínizado, se practicaron las reacciones de TBA de acuerdo al método de Matsushita modificado y al de Tarladgis ya mencionados.

Además, se realizaron destilaciones de acuerdo con la técnica descrita por Tarladgis y col. (1960), a fines de comparación con la metodología del exudado.

3.2.1. Comparación de los métodos de Matsushita modificado y de Tarladgis

Con el objeto de elegir el método más adecuado para la evaluación de la oxidación lipídica en el exudado desproteínizado, se analizaron en profundidad los métodos arriba citados.

En lo que respecta al método de Matsushita se han introducido algunas modificaciones para adaptarlo al sistema de trabajo empleado. Así, se incrementó el volumen de muestra de 0,1 a 0,3 ml y se eliminó el agregado de EDTA (antioxidante), con lo que se logró un sensible incremento en los valores de absorbancia leídos sin mayores alteraciones (Figura 5).

En cambio, cuando se ensayaron cantidades superiores a 0,3 ml se produjo un enturbiamiento del medio de reacción debido posiblemente a la precipitación del resto de sustancias de carácter proteico remanentes aún en el exudado desproteínizado.

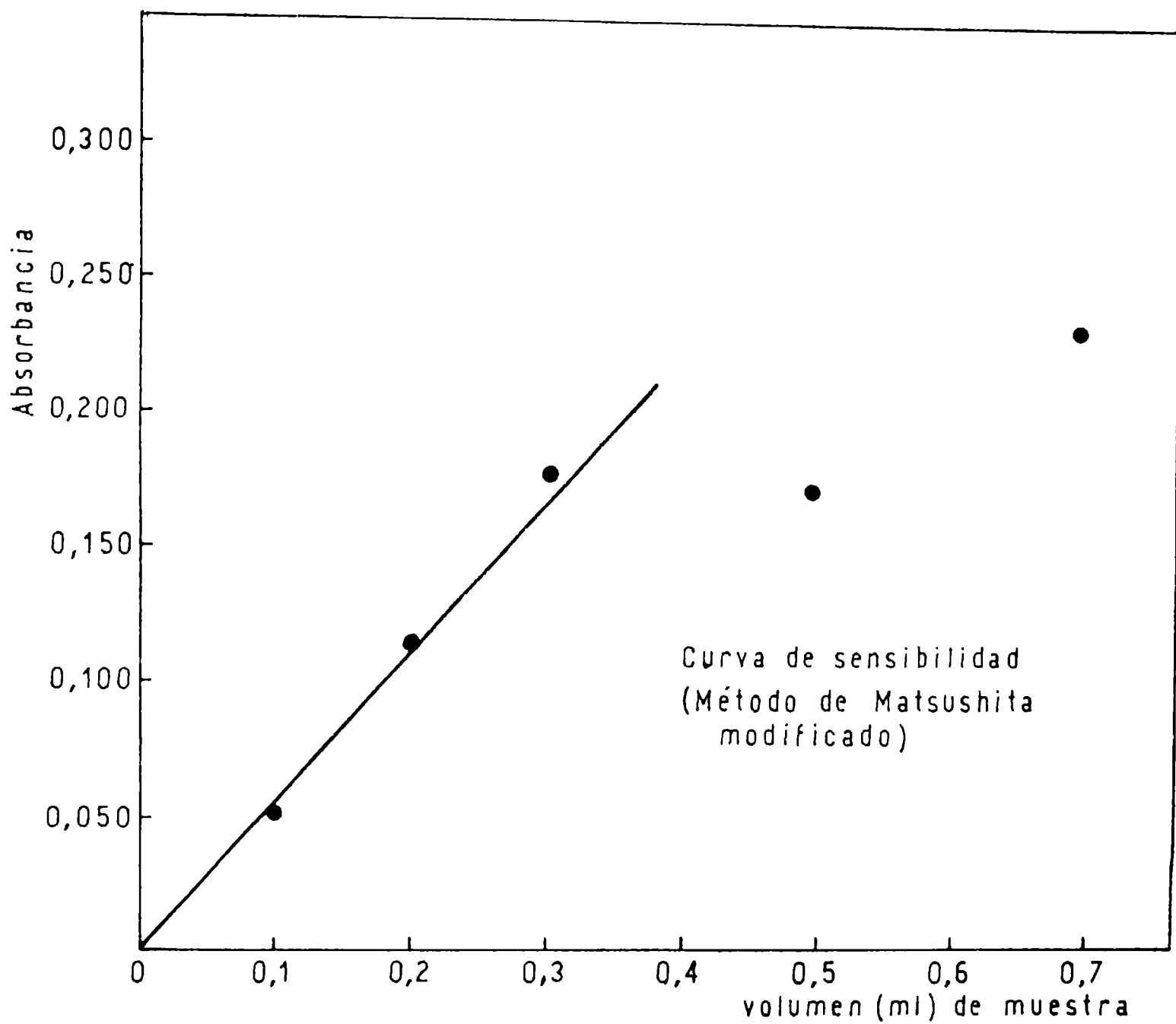


FIGURA 5 - Curva de sensibilidad del método de Matsushita modificado para el ensayo de TBA.

La etapa de desproteínización fue necesaria ya que cuando se intentó aplicar este método al exudado obviando la misma, se produjo un precipitado rosado de proteínas durante la etapa de calentamiento en la determinación de TBA, quedando la solución sobrenadante prácticamente incolora. En este caso muy probablemente, la precipitación de sustancias de naturaleza proteica indujo la adsorción del producto coloreado (rosado) de la reacción entre el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) y MAL, con la consiguiente pérdida de sensibilidad del método.

Por otra parte, en cuanto a la especificidad de ambos métodos muchos investigadores han señalado la importancia del valor del pH de la solución en la cual el ensayo de TBA tiene lugar (Tarladgis y col., 1962; Ohkawa y col., 1978, 1979; Uchiyama y Mihara, 1978).

En nuestro caso, el método de Matsushita se ha caracterizado por una mayor especificidad hacia el MAL que el método de Tarladgis. Esta mayor especificidad se ha logrado al realizar la reacción en un medio regulado a $\text{pH} = 3,6$, valor al cual se produce el máximo de reacción para dicho dialdehído (Asakawa y Matsushita, 1980). En cambio, el método de Tarladgis se aplica en medio ácido 90% tal como está descripto en literatura (Tarladgis y col., 1960).

En la Figura 6 se muestran los números de TBA en función del tiempo para carne vacuna refrigerada obtenidos a partir de los dos métodos ensayados. Puede visualizarse que a través del método de Tarladgis se obtienen valores significativamente más altos que por el método de Matsushita modificado durante los

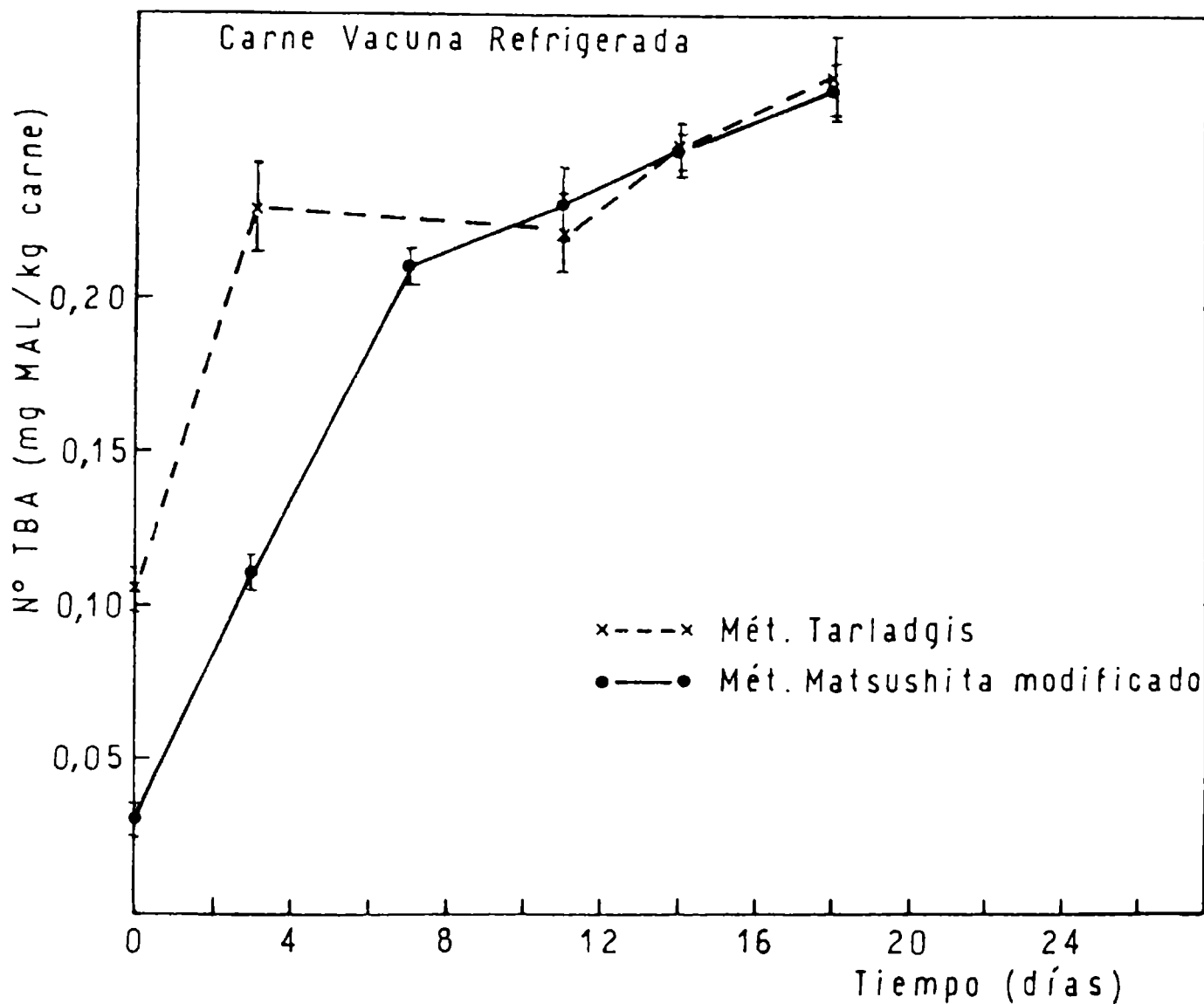


FIGURA 6 - Evaluación de la oxidación lipídica en función del tiempo de almacenamiento para exudados desproteinizados de carne vacuna refrigerada a través del ensayo del ácido-2-tiobarbitúrico (TBA): (x---x) Método de Tarladgis; (•—•) Método de Matsushita modificado. Cada valor surge del promedio de 4 determinaciones.

primeros días de almacenamiento, tendiendo a un acercamiento mutuo a medida que transcurre el tiempo.

Esta diferencia puede deberse posiblemente a la menor especificidad del método de Tarladgis, de forma tal que el mismo valoraría un mayor número de sustancias reactivas al TBA que el método de Matsushita. Probablemente, esos compuestos no provengan de los procesos oxidativos per se. A medida que el tiempo transcurre, la concentración de MAL proveniente de la oxidación de los lípidos aumenta y por lo tanto, la incidencia relativa de las sustancias interferentes disminuiría con el consiguiente acercamiento en los valores de ambos métodos.

3.2.2. Barridos espectrofotométricos

En las Figuras 7 y 8 se exhiben los barridos espectrofotométricos de las soluciones resultantes de aplicar los métodos de Tarladgis y de Matsushita modificado a exudados desproteinizados de carnes refrigeradas. Se observa que el método de Tarladgis origina dos máximos de absorción (448 nm y 532 nm). El máximo a 448 nm ha sido observado por varios autores (Pokorny y col., 1985; Melton, 1983), aunque todavía no existe una opinión unánime acerca de la exacta naturaleza del mismo (Marcuse y Johansson, 1973; Patton, 1974; Kosugi y Kikugawa, 1985; 1986); posiblemente provenga de sustancias aldehídicas no originadas en los procesos oxidativos que reaccionarían con TBA dando dicho máximo. En cambio, el máximo a 532 nm -que es el que se usa para determinar el número de TBA- va aumentando paulatinamente a medida que transcurre el tiempo. La Tabla 3 refleja cómo la relación de

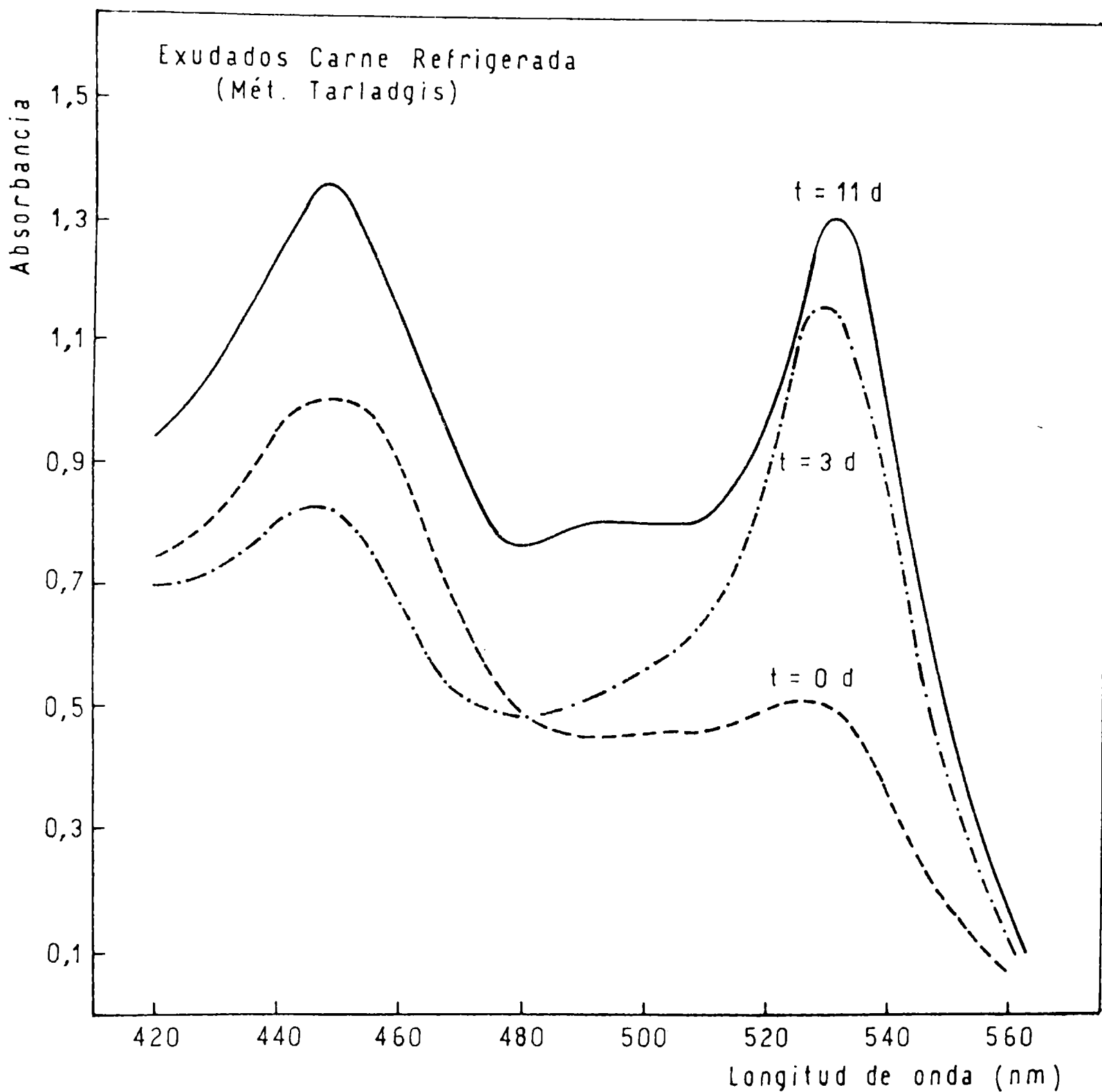


FIGURA 7 - Barridos espectrofotométricos de las soluciones resultantes del ensayo de TBA (método de Tarladgis) realizado sobre exudados desproteinizados de carne vacuna refrigerada con distintos tiempos de almacenamiento: (----) t = 0 d; (-.-.-.) t = 3 d; (—) t = 11 d.

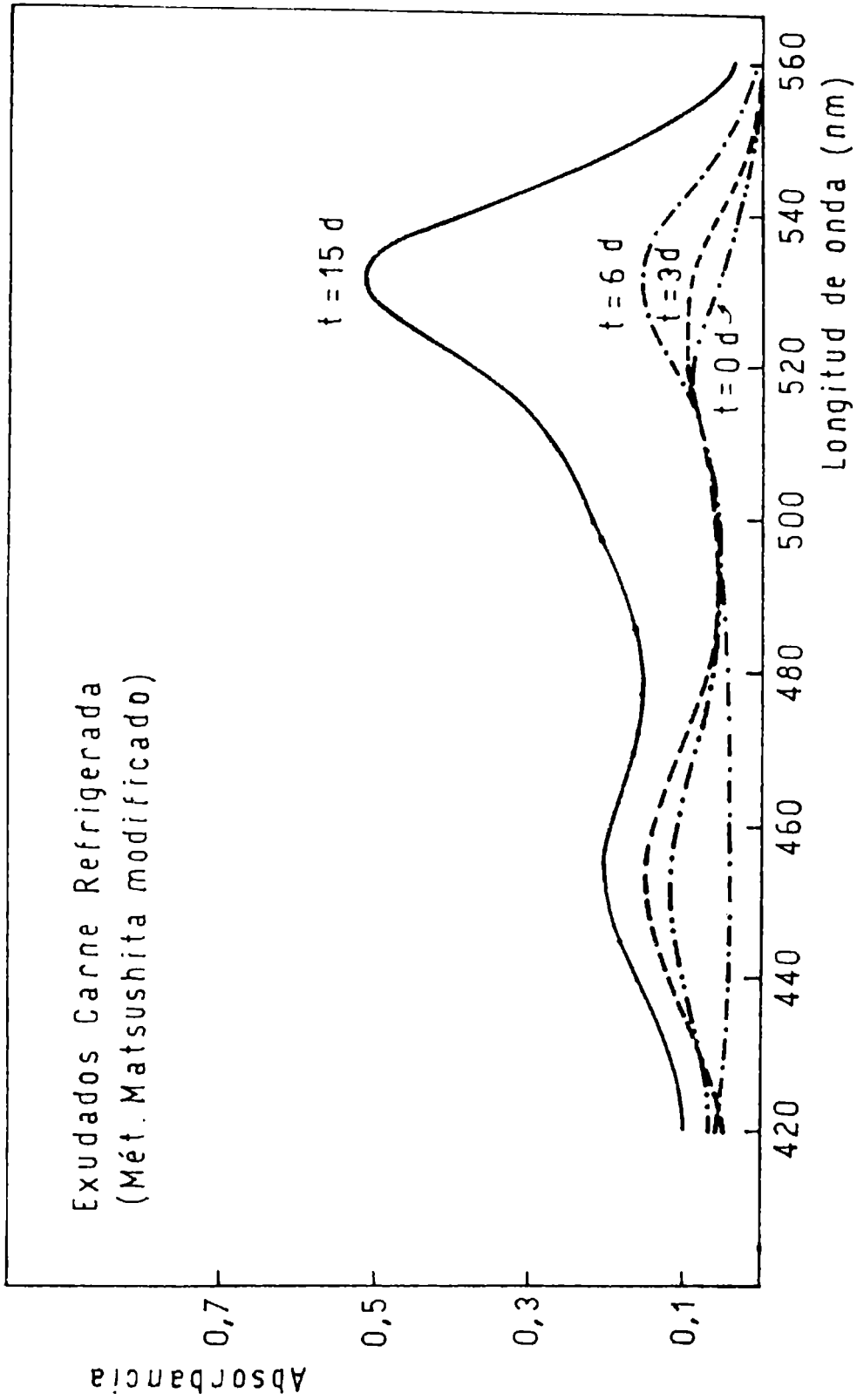


FIGURA 8 - Barridos espectrofotométricos de las soluciones resultantes del ensayo de TBA (método de Matsushita modificado) realizado sobre exudados desproteinizados de carne vacuna refrigerada con distintos tiempos de almacenamiento: (.....) t = 0 d; (----) t = 3 d; (-.-.-.-) t = 6 d; (—) t = 15 d.

Abs. 532 nm/Abs. 448 nm aumenta con el transcurso del tiempo. Esta es una de las razones por las cuales afirmamos la menor especificidad del método de Tarladgis. En cambio, en el caso del método de Matsushita se observa que el máximo ocurre a 532 nm, siendo la contribución a 448 nm muy pequeña. La comparación de ambos métodos señala también, la mayor sensibilidad del método de Tarladgis con respecto al de Matsushita para el mismo rango de tiempo.

TABLA 3: Relación $\frac{\text{Abs. 532 nm}}{\text{Abs. 448 nm}}$ para soluciones resultantes de la aplicación del método de Tarladgis (exudados desproteinizados provenientes de carnes vacunas refrigeradas, 4°C).

t (días)	$\frac{\text{Abs. 532 nm}}{\text{Abs. 448 nm}}$
0	0,47
3	0,84
7	0,89
11	1,58
15	1,64
20	1,88

Las Figuras 9 y 10 muestran barridos espectrofotométricos similares pero realizados con el destilado de trozos de carne de acuerdo al método de Matsushita modificado y al original de Tarladgis, respectivamente. Aplicando esta última metodología, se observa un solo máximo a 532 nm de manera tal que

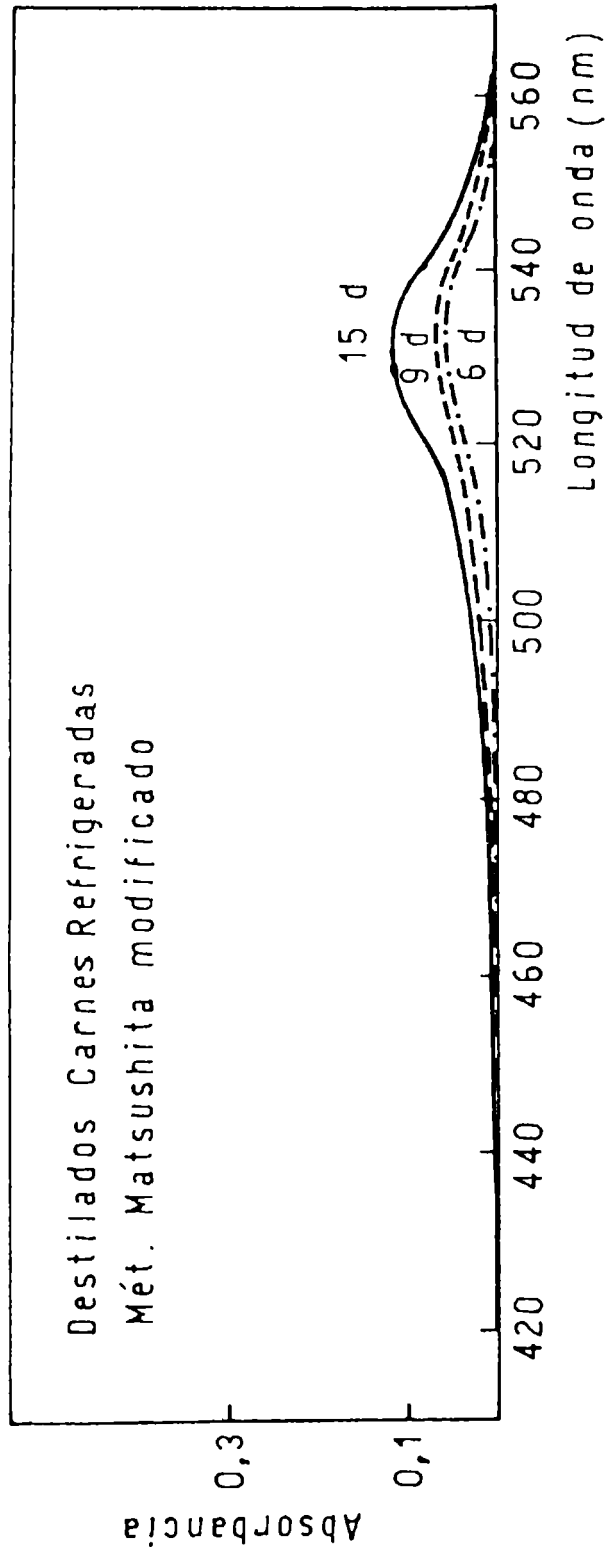


FIGURA 9 - Barridos espectrofotométricos de las soluciones resultantes del ensayo de TBA (método de Matsushita modificado) realizado sobre destilados de carne vacuna refrigerada con distintos tiempos de almacenamiento: (.-.-) t = 6 d; (---) t = 9 d; (—) t = 15 d.

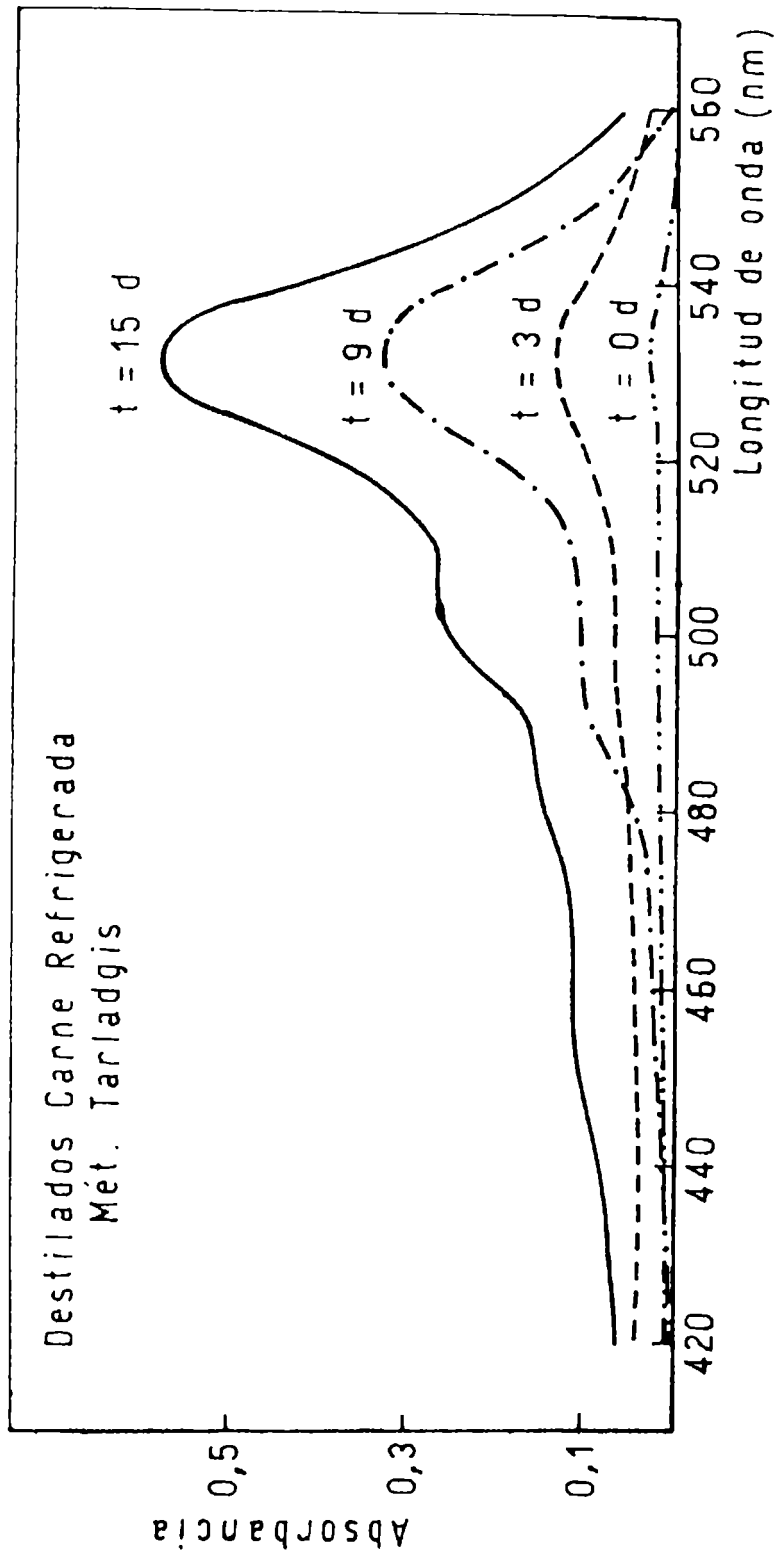


FIGURA 10 - Barridos espectrofotométricos de las soluciones resultantes del ensayo de TBA (método de Tarladgis) realizado sobre destilados de carne vacuna refrigerada con distintos tiempos de almacenamiento: (·-·-·-·-) $t = 0$ d; (- - - -) $t = 3$ d; (·-·-·-·-) $t = 9$ d; (—) $t = 15$ d.

se han eliminado a través de la destilación los productos responsables de la absorción a 448 nm. Es dable indicar que la aplicación del método de Matsushita modificado al exudado desproteínizado produce resultados similares que los obtenidos aplicando el método de Tarladgis al destilado, con la ventaja de no haber calentado durante la obtención de la muestra. Debemos recordar que uno de los inconvenientes del método original de destilación es que el agregado de ácido y la aplicación de calor pueden llegar a producir una alteración en la concentración real de MAL, por ejemplo catalizando los procesos de oxidación durante la misma destilación y falseando por lo tanto, los verdaderos resultados (Witte y col., 1970; Rhee, 1978a).

La aplicación del método de Matsushita al destilado no es adecuada debido a que el mismo no es lo suficientemente sensible como para determinar en forma precisa las bajas concentraciones de MAL presentes en el destilado. Los valores de absorbancia que se obtuvieron en tales condiciones fueron sumamente erráticos.

En virtud del análisis realizado, se consideró al método de Matsushita modificado como herramienta analítica más idónea para su aplicación al ensayo de TBA sobre exudados desproteinizados y al método de Tarladgis más adecuado para su aplicación a destilados.

3.3. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO REFRIGERADO SOBRE LA OXIDACION DE LIPIDOS

En la Figura 11 se observan todos los valores del número de TBA obtenidos en las distintas experiencias a través del método de Matsushita modificado, resultando así una representación gráfica de la tendencia a la oxidación lipídica en función del tiempo de almacenamiento en carne vacuna refrigerada. Se visualiza un claro aumento del número de TBA a medida que transcurren los días tendiendo hacia un valor más constante hacia los 20 días.

El empleo de azida sódica como agente antimicrobiano, permitió que las experiencias de almacenamiento se desarrollaran por períodos de aproximadamente 20 días sin contaminación bacteriana importante ya que a partir de los 25 días las muestras comenzaron a mostrar un importante deterioro y los valores de TBA se tornaron sumamente erráticos. Este último comportamiento posiblemente se deba a la interferencia de la microflora tanto en la obtención del exudado como en la producción de MAL.

Experiencias realizadas sin azida sódica dieron resultados similares pero el muestreo sólo pudo ser efectuado durante el lapso de una semana (Tabla 4).

En la Figura 12 se muestran los valores de número de TBA para una misma experiencia, o sea realizada con un mismo músculo a través del tiempo. Se indica con barras verticales la variación o amplitud de los valores obtenidos para un mismo día, observándose que a medida que transcurre el tiempo esa amplitud tiende a aumentar debido posiblemente, entre otras, a dos razones: 1) alteraciones en la carne con la consiguiente influencia

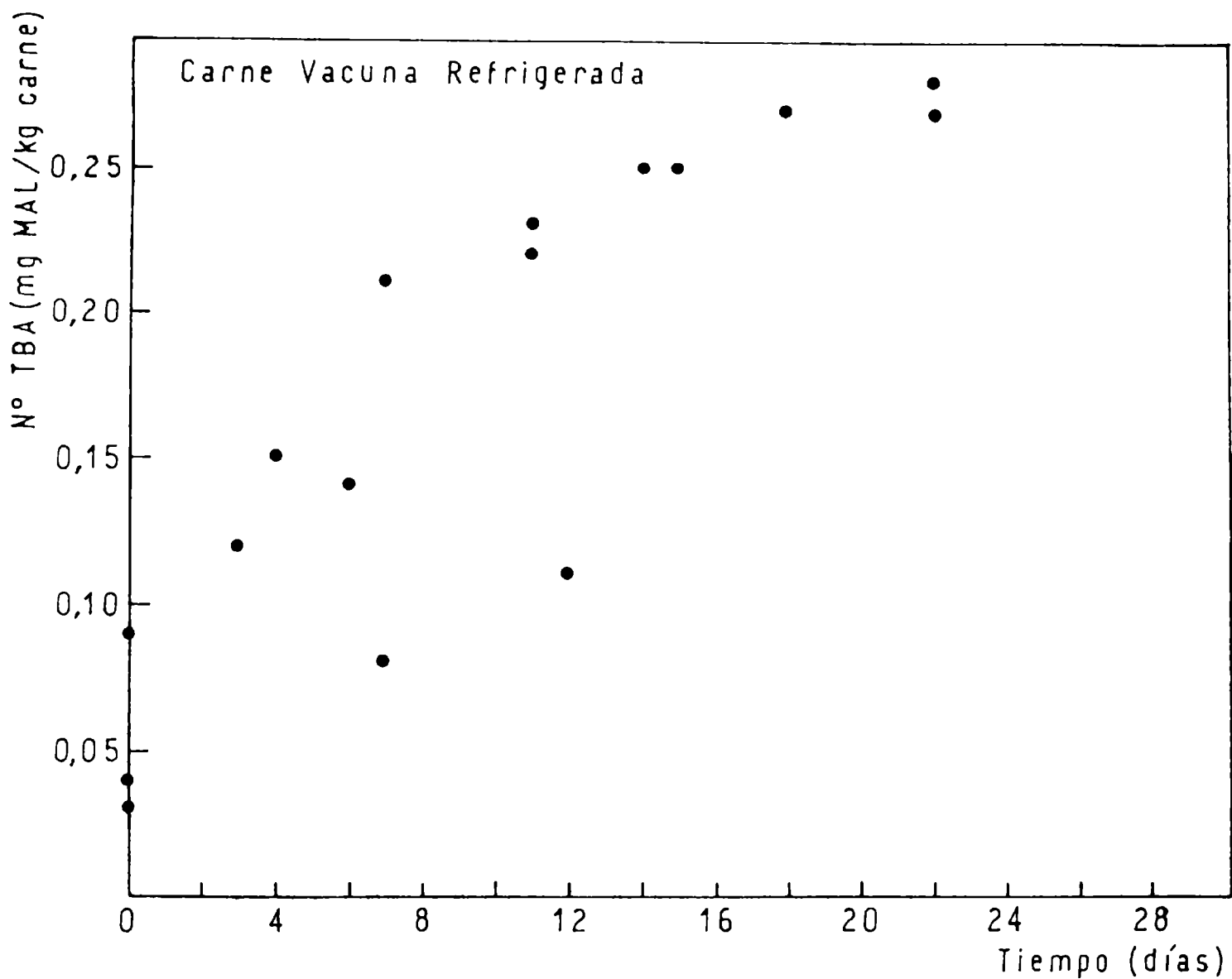


FIGURA 11 - Efecto del tiempo de almacenamiento refrigerado sobre la oxidación lipídica en carne vacuna almacenada a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.
Cada valor surge del promedio de cuatro determinaciones.
 $S = s/\sqrt{n}$ desviación estándar = 0,02.

en los rendimientos de exudado, 2) influencia de la flora microbiana en la concentración de sustancias reactivas al TBA.

TABLA 4: Números de TBA correspondientes a carne vacuna, sin azida sódica, refrigerada a $T = 4^{\circ}\text{C}$.

Tiempo de almacenamiento (días)	N° de TBA (mg MAL/kg carne)	S ¹
0	0,03	0,003
1	0,04	0,004
2	0,05	0,003
3	0,03	0,002
4	0,04	0,003
7	0,04	0,003

- Ensayo de TBA efectuado según la técnica de Matsushita modificada.

- Cada valor surge del promedio de doce (12) determinaciones.

¹ $S = s/\sqrt{n}$ desviación estándar

La Tabla 5 detalla los valores promedio del volumen total de exudado obtenido y su correspondiente número de TBA para carnes almacenadas en refrigeración con sus respectivos errores.

Estos resultados muestran que un número de tres centrifugaciones consecutivas sería aceptable para obtener un alto porcentaje del exudado disponible sin introducir errores significativos en el cálculo del número de TBA, salvo en el caso que este valor sea muy pequeño.

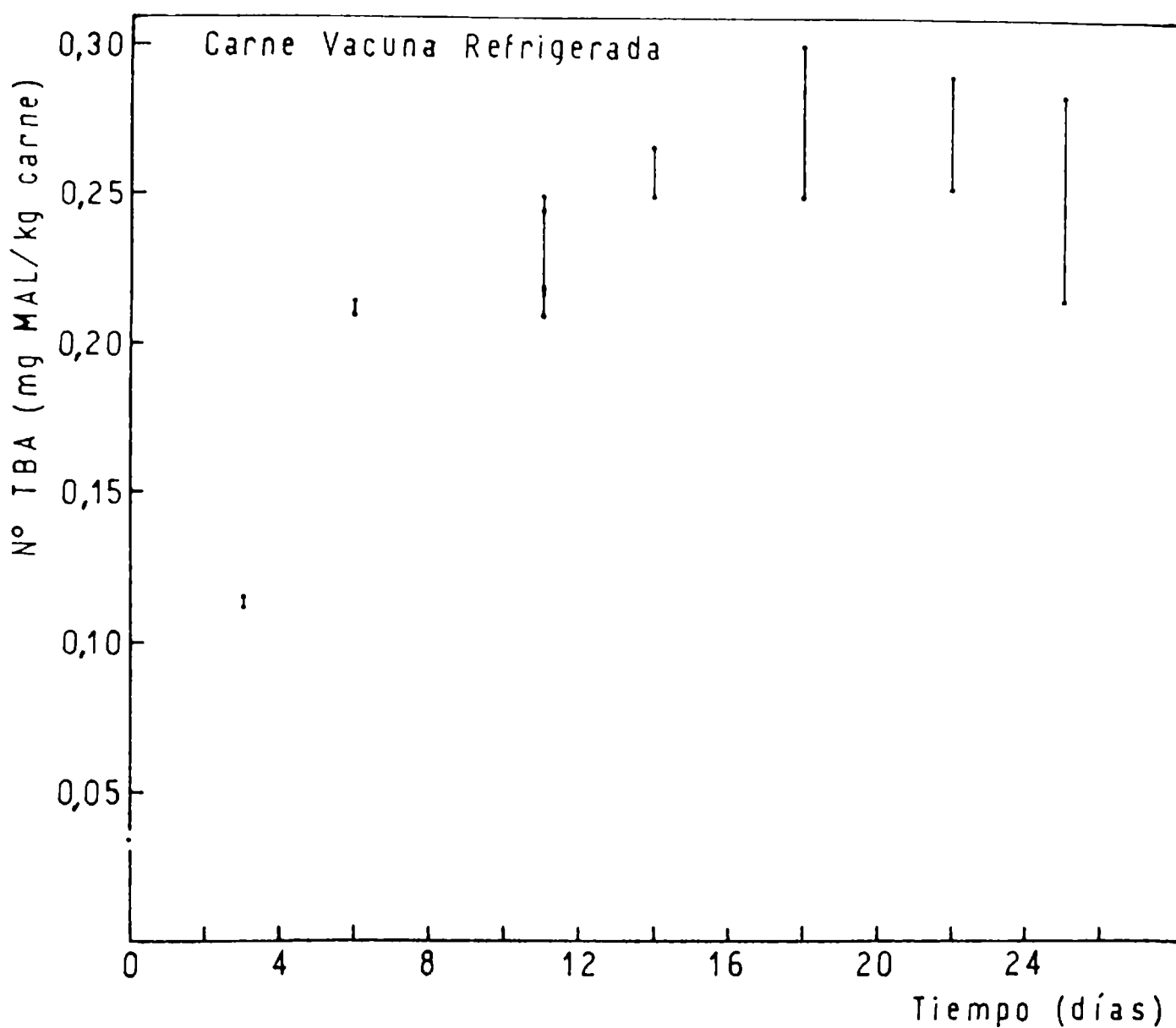


FIGURA 12 - Seguimiento de la oxidación lipídica en función del tiempo de almacenamiento para un mismo músculo de carne vacuna refrigerada. Cada valor surge del promedio de cuatro determinaciones. Se indica con barras verticales la variación o amplitud de los valores obtenidos para el número de TBA para un mismo período de almacenamiento.

TABLA 5: Volumen total de exudado y su relación con el número de TBA

Muestra	Volumen total de exudado	S ¹	Número de TBA ²	S ¹
Carne vacuna refrigerada (1 día) (n = 6)	18,60	0,64	0,05	0,02
Carne vacuna refrigerada (15 días) (n = 6)	14,10	0,29	0,25	0,02

¹ $S = s/\sqrt{n}$ desviación estándar

² Número de TBA (mg MAL/kg carne) determinado por el método de Matsushita modificado.

La Tabla 6 muestra los valores del número de TBA obtenidos por el método de Matsushita modificado para distintos músculos semitendinosos bovinos almacenados a 4°C. En esta tabla se visualiza cómo este parámetro fue aumentando paulatinamente aunque siempre arrojó valores sensiblemente más bajos que los encontrados en literatura (Rhee, 1978a; Pikul y col., 1983; Chen y col. 1984). La corrección de los mismos por los factores de recuperación, cuya determinación se detalla más adelante, dio como resultado valores del número de TBA similares a los informados en bibliografía.

TABLA 6: Números de TBA para músculos semitendinosos vacunos refrigerados
(4°C)

Días	Músculo 1	Músculo 2	Músculo 3
0	0,09	0,04	0,03
3			0,11
4	0,15 ^a		
6	0,14 ^a		
7		0,08	0,21 ^a
11	0,22 ^b		0,23 ^{a,b}
12		0,11	
14			0,25 ^{b,c}
15	0,25 ^{b,c}		
18			0,27 ^{c,d}
19	0,25 ^{b,c}	0,18 ^a	
22	0,28 ^c	0,20 ^a	0,27 ^{d,e}
25			0,25 ^e
27		0,32 ^b	

Supraíndices idénticos indican valores no significativamente diferentes a $P < 0,05$.

Las diferencias en el número de TBA registradas al comienzo de cada experiencia ($t = 0$) y durante su evolución, pueden deberse fundamentalmente a la variabilidad biológica de los distintos músculos empleados, como también a las distintas condiciones de manipuleo (historia previa) que pudo haber tenido cada uno de ellos.

El análisis estadístico efectuado muestra que hacia los últimos días de la experiencia los valores no son significativamente diferentes tendiendo a niveles constantes ($P < 0,05$).

3.4. ENSAYOS DE RECUPERACION. CALCULOS DE LOS FACTORES RESPECTIVOS

A fin de evaluar cuantitativamente el porcentaje de MAL libre determinado en el exudado y en el destilado con respecto al total del mismo, se llevaron a cabo experiencias de recuperación inyectando directamente MAL a trozos de carne vacuna. Nos referimos a MAL libre, pues una parte del mismo se encuentra unido a otros componentes tales como proteínas.

Teniendo en cuenta que el MAL inyectado no se recuperaría en su totalidad, debido tanto a problemas inherentes a la recuperación propiamente dicha como también a que una parte del mismo reaccionaría con distintos componentes de la carne, se practicaron las determinaciones a los 0, 1, 2, 3 y 4 días a partir del momento de la inyección (el tiempo 0 día no resultó absolutamente estricto pues fue necesario un lapso de alrededor de una hora para el procesamiento de la muestra). Los trozos de carne inyectados de esa manera, luego de los períodos mencionados, fueron analizados de acuerdo a la metodología descrita para el exudado y el destilado.

Así se obtuvieron las rectas de recuperación indicadas en las Figuras 13 y 14. Se graficó la absorción leída en función de la concentración teórica de MAL en cubeta de lectura suponiendo que todo el MAL inyectado se hubiese recuperado, tanto

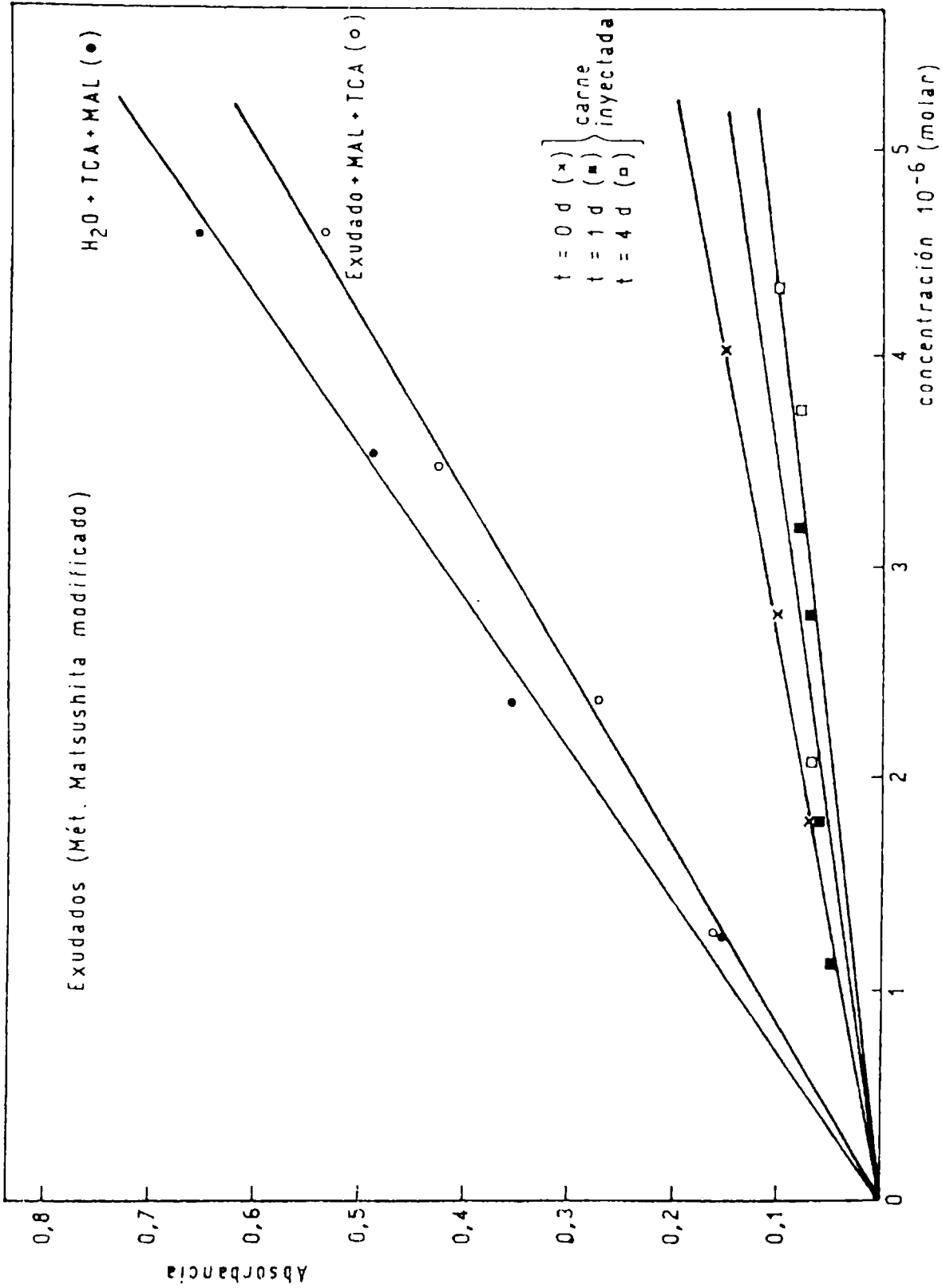


FIGURA 13 - Ensayos de recuperación. Rectas de recuperación de malonaldehído obtenidas mediante la aplicación del ensayo de TBA (método de Matsushita modificado) a distintos sistemas: (●) $H_2O + TCA + MAL$; (○) Exudado + MAL + TCA; (x) Exudado de carne inyectada $t = 0 d$; (■) Exudado de carne inyectada $t = 1 d$; (□) carne inyectada $t = 4 d$.

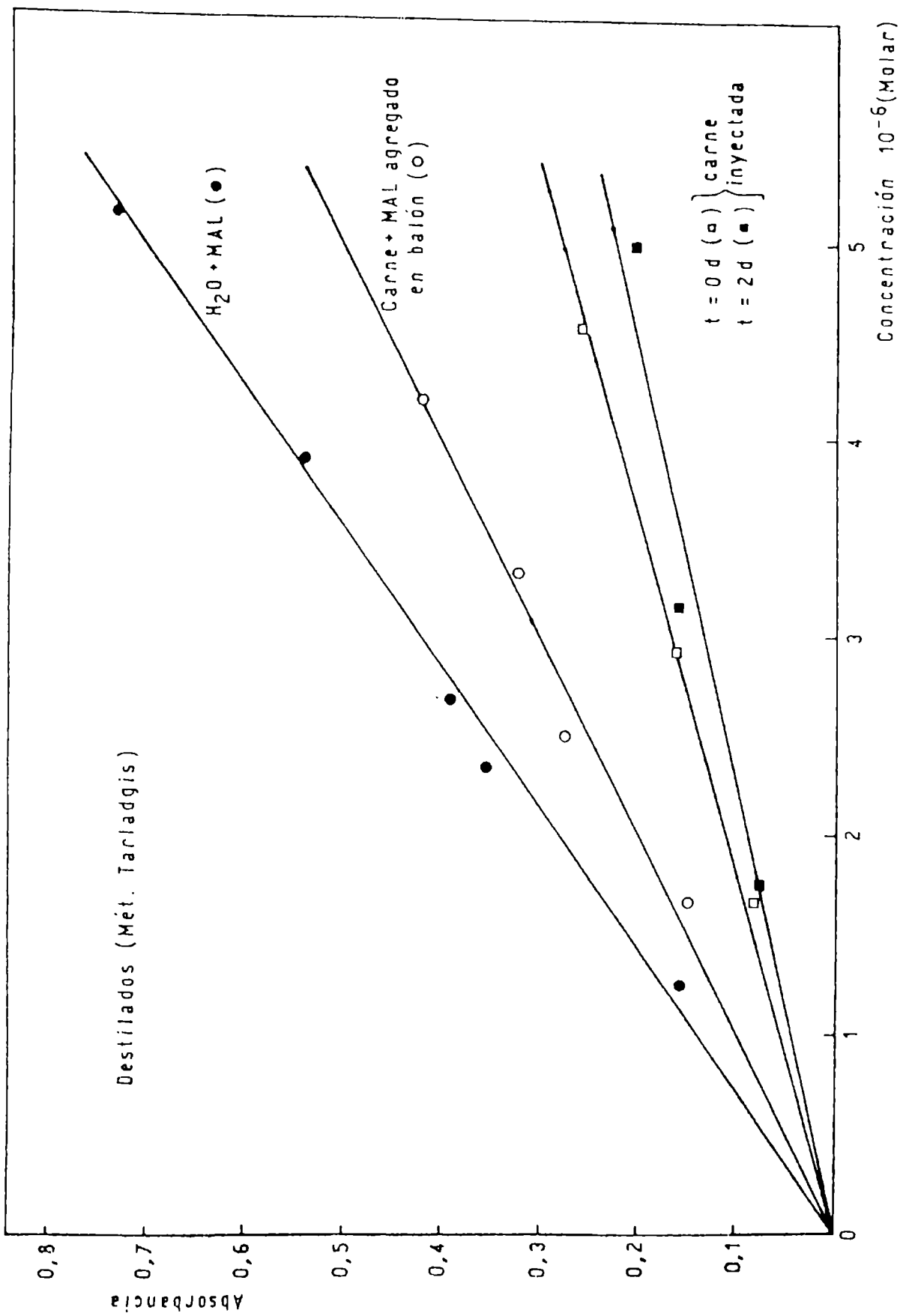


FIGURA 14 - Ensayos de recuperación de malonaldehído obtenidas mediante la aplicación del ensayo de TBA (método de Tarladgis) a distintos sistemas: (●) $H_2O + MAL$; (○) Carne + MAL agregado al balón; (□) carne inyectada, posteriormente destilada $t = 0$ d; (■) carne inyectada, posteriormente destilada $t = 2$ d.

en el caso del exudado como en el caso del destilado. Como la recuperación no fue total, las rectas correspondientes a los días 0 y 1 resultaron distintas (de acuerdo al análisis de covarianza para una $P < 0,05$); en cambio para los siguientes días, resultaron estadísticamente no diferentes. A partir de las pendientes de dichas rectas se obtuvieron los coeficientes molares de absorción (ϵ_M) aparentes; decimos que son aparentes pues los mismos resultan de concentraciones molares no reales.

Se realizaron también experiencias similares pero con sistemas mucho más simples. En primera instancia, se determinó el ϵ_M para MAL agregado a agua (en este caso no existe ningún tipo de retención por procedimiento alguno ni ninguna clase de interacción con otros componentes) por lo que se tomó este valor como el correspondiente al 100% de recuperación.

Seguidamente, a fin de determinar el grado de interacción del MAL con otros componentes del exudado, se determinó el ϵ_M para el caso de MAL agregado al exudado.

En la Tabla 7 aparecen los valores de absorción molar para los sistemas ya descritos, tanto por el método de Tarladgis como el de Matsushita modificado. Se observa que el ϵ_M para el caso de agua destilada es de $1,45 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ siendo este valor similar al que figura en literatura (Tarladgis y col., 1960) lo cual se correlacionó con un valor de 100% como factor de recuperación.

TABLA 7: Factores de recuperación de malonaldehído para exudados y destilados

EXUDADOS	Tiempo de almacenamiento (días)	Coefficientes de Extinción Molar aparente (ϵ_M) (105 M ⁻¹ cm ⁻¹) Método de Matsushita modificado	r ²	Coefficientes de Extinción Molar aparente (ϵ_M) (105 M ⁻¹ cm ⁻¹) Método de Tarladgis	r ²	Factor de recuperación (%)
Agua+TCA+MAL ³		1,45	0,99			100,0
Exudado+MAL	0	1,17	0,99			80,7
	1	0,79	0,99			54,5
Carnes inyectadas con MAL	0	0,26	0,98	0,27	0,94	18,2
	1	0,12a	0,95			8,3
	2			0,15	0,99	10,3
	3	0,12a	0,99	0,12a	0,90	8,3
	4	0,13a	0,95	0,12a	0,90	8,3
DESTILADOS						
Agua + MAL				1,48	0,99	100,0
Carne + MAL agregado al balón				0,79	0,96	53,4
Carne inyectada con MAL	0			0,56	0,98	37,8
	1			0,37a	0,91	25,0
	2			0,37a	0,98	25,0
	3			0,34b	0,98	23,0
	4			0,34b	0,99	23,0

1 Valores con iguales supraíndices (a,b) indican que los mismos no son significativamente diferentes a P<0,05

2 r = coeficiente de correlación estadístico

3 MAL = malonaldehído

En el caso de MAL agregado a exudado los valores de ϵ_M aparentes son menores, disminuyendo de $1,17 \times 10^5$ a $0,79 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ de 0 a 1 día. Evidentemente, el MAL agregado reaccionó con las proteínas del exudado disminuyendo por lo tanto el MAL libre determinable.

En el caso de carnes inyectadas, los porcentajes de recuperación variaron de 18,2 a 8,3% entre el día 0 y 1 permaneciendo prácticamente constantes a partir del día 2. El análisis estadístico aplicado a estos últimos valores no arrojó diferencias significativas por análisis de covarianza a nivel $P < 0,05$. Otra conclusión interesante es que los ϵ_M aparentes obtenidos tanto por el método de Tarladgis como por el de Matsushita son semejantes, es decir se obtienen los mismos resultados independientemente de la técnica analítica empleada.

Ahora bien, como factor final de recuperación para la técnica del exudado se tomó el valor de 8,3 que es el correspondiente al sistema cuando se ha estabilizado. Ese valor es la fracción del MAL total (tanto libre como combinado que se puede determinar a través de la obtención del exudado y luego a través de las técnicas de Tarladgis y Matsushita). Afectando los números de TBA determinados por ese factor de recuperación, se obtienen los números de TBA corregidos que indicarían la verdadera concentración de MAL en la muestra.

El mismo estudio se aplicó para la destilación empleando sólo la técnica de Tarladgis, ya que el método de Matsushita modificado no es aplicable en este caso, como ya se ha discutido previamente. En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos.

Además de las carnes inyectadas y sometidas a destilación se analizaron otros dos sistemas: 1) agregando MAL al agua y aplicando la técnica de Tarladgis, y 2) agregando MAL al balón de destilación en donde también se encontraba el respectivo trozo de carne. Con esta última metodología, Tarladgis y col. (1960) y Ke y col. (1984) obtuvieron su factor de recuperación.

La diferencia más notable en nuestro trabajo es que hemos inyectado MAL a la carne, procediendo luego a su destilación. Es notorio que en este caso, la recuperación del dialdehído es menor al caso de MAL agregado al balón pues ha tenido un contacto más íntimo con los otros componentes de la carne, es decir mayores posibilidades de interacción.

Los resultados se muestran en la Tabla 7 en donde se observa que el factor de recuperación para el caso de MAL agregado al balón es semejante al obtenido por Tarladgis y col. (1960); en cambio para las carnes inyectadas los factores de recuperación son sensiblemente menores (37,8% para $t = 0$ día y 25% para $t = 1$ día). Se ha tomado el valor de 24% como factor de recuperación para el caso de la destilación.

Todo este estudio ha mostrado que el MAL determinado tanto por el método de Tarladgis como por el de Matsushita es sólo una fracción del MAL total presente, puesto que una parte es retenida por limitaciones propias de los métodos empleados (exudado o destilación) y otra parte se encuentra comprometida químicamente con otros componentes de la carne.

3.5. EVALUACION DE LA OXIDACION LIPIDICA SOBRE DISTINTOS SISTEMAS: EXUDADO VS. DESTILADO

Una vez determinados dichos factores de recuperación, se realizaron experiencias a fin de comparar los resultados obtenidos a través del exudado y la destilación. Para ello, a partir de un mismo músculo semitendinoso vacuno mantenido en refrigeración a 4°C, se efectuaron determinaciones del número de TBA por destilación (técnica de Tarladgis) y por el exudado (técnicas de Tarladgis y Matsushita modificado), afectando posteriormente esos valores por los correspondientes factores de recuperación ya citados.

Los resultados de una de esas experiencias se muestran en la Figura 15, donde se encuentran graficados los números de TBA corregidos en función del tiempo de almacenamiento en refrigeración. Puede verse, que los valores determinados a partir del exudado aplicando la técnica de Matsushita modificada resultan inferiores sistemáticamente a los valores determinados para el destilado aplicando la técnica de Tarladgis. Además, el estudio estadístico de análisis de varianza señala que ambas metodologías difieren significativamente a una $P < 0,05$.

Estos hechos pueden explicarse sobre la base de una mayor probabilidad que ocurran procesos oxidativos "in situ" en el caso de la destilación -dado el empleo de medio ácido 90% y calor, ambos factores prooxidantes- que en el caso del exudado.

Como contraste, la aplicación de la técnica de Tarladgis tanto al exudado como al destilado muestran diferencias mayores

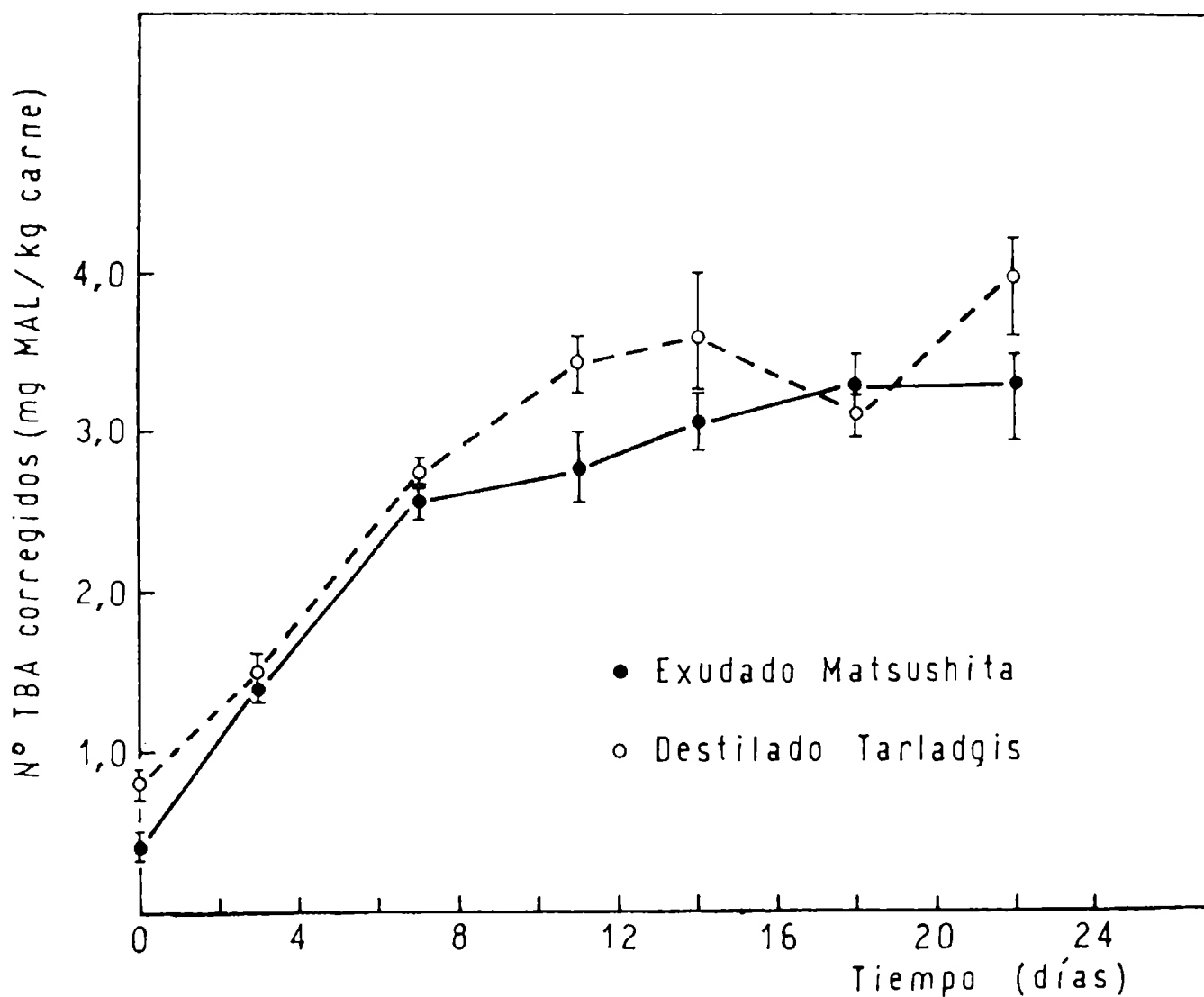


FIGURA 15 - Evaluación de la oxidación lipídica sobre distintos sistemas a través del ensayo de TBA considerando los respectivos factores de recuperación: (●) exudado aplicando el método de Matsushita modificado; (○) destilado a través del método de Tarladgis. En ordenadas se registran los valores del número de TBA corregido por dichos factores. Cada valor surge del promedio de 4 determinaciones.

y erráticas, debido posiblemente a los errores provenientes de la aplicación de la técnica de Tarladgis -menos específica- a un sistema como el exudado, el cual presenta una mayor complejidad que el destilado (Figura 16).

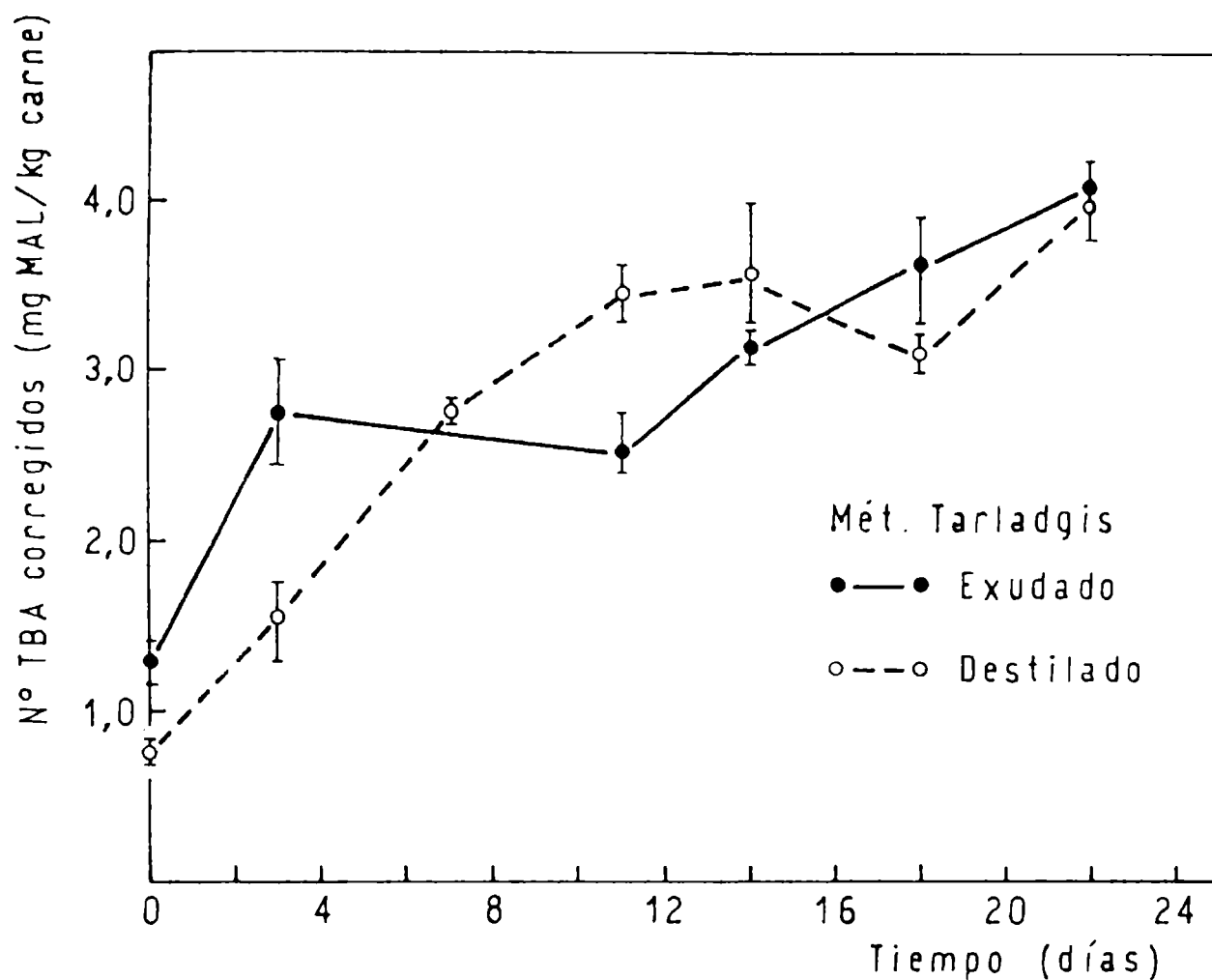


FIGURA 16 - Aplicación del ensayo de TBA (método de Tarladgis) para la evaluación de la oxidación de lípidos sobre distintos sistemas considerando los respectivos factores de recuperación: (●-●) exudado; (○--○) destilado. En ordenadas se registran los valores del número de TBA corregido por dichos factores. Cada valor surge del promedio de 4 determinaciones.

CAPITULO 4

OXIDACION LIPIDICA EN CARNES:
EFECTO DE LA CONGELACION Y EL
ALMACENAMIENTO CONGELADO

4.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Si bien la conservación de las carnes a temperaturas superiores a las de congelación no conduce a procesos de oxidación importantes, ya que las alteraciones de origen microbiano son las que predominan en este caso, la rancidez oxidativa comienza a incidir en la disminución de la calidad de las mismas cuando se las somete al proceso de congelación y almacenamiento al estado congelado (Fennema y col., 1973).

Otras alteraciones de origen químico que pueden tener lugar durante el almacenamiento congelado son la hidrólisis enzimática de lípidos, con la consecuente liberación de ácidos grasos libres (pescados, aves, músculos de mamíferos) (Awad y col., 1968; Davidkova y Khan, 1967) y la desnaturalización de proteínas (desnaturalización de la cabeza y cola fibrosa de miosina) y formación de agregados, los cuales conducen a la disminución de la solubilidad, viscosidad, capacidad de absorción de agua de las proteínas miofibrilares y a la alteración de sus propiedades reológicas (Wagner, 1986).

Ahora bien, en lo que se refiere al proceso de autooxidación lipídica, su desarrollo en carnes almacenadas al estado congelado -evidenciado en la producción de olores, sabores y colores desagradables- está asociado principalmente a la acumulación de aldehídos volátiles, cetonas, ácidos, etc. (Fennema y col., 1973; Frankel, 1983). Estos compuestos son originados por reacciones de descomposición de los hidroperóxidos -productos primarios de oxidación-, debiéndose la formación de estos últimos a la interacción entre los ácidos grasos mono y poliinsatu-

rados de la especie involucrada y el oxígeno (Awad y col., 1968 y 1969; Lea, 1961 y 1962; Banks y Hardy, 1965).

La extensión y velocidad de la oxidación lipídica en carnes durante el almacenamiento congelado depende de varios factores: 1) clase de lípidos y grado de insaturación de los ácidos grasos componentes del sistema, 2) historia previa a que haya sido sometido el músculo (por ej. preenfriamiento y duración del mismo), 3) temperatura de congelación, 4) temperatura y tiempo que involucre el almacenamiento congelado, 5) contenido de oxígeno presente en el ambiente, 6) presencia de agentes prooxidantes y antioxidantes.

4.2. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO CONGELADO PARA DIVERSAS ESPECIES

En forma análoga al análisis efectuado en el capítulo 3 con relación a los métodos más apropiados para el seguimiento de la oxidación de lípidos en carnes, se aplicaron los métodos de Matsushita modificado y de Tarladgis a exudados desproteinizados de pescado congelado almacenado a $T = -5^{\circ}\text{C}$.

En lo que se refiere a la importancia de la temperatura de congelación y las condiciones de almacenamiento, puede señalarse que entre 0 y 12°C la oxidación lipídica y la hidrólisis de fosfolípidos ocurre rápidamente, teniendo el máximo de velocidad aproximadamente a -4°C (Awad y col., 1968). Por debajo de los -18°C la velocidad de este proceso disminuye rápidamente, incrementándose la vida útil del alimento cuando el almacenamiento se realiza a temperaturas menores (alrededor de -30°C) (Slavin,

(1968). En base a ello, se eligió en primer lugar $T = -5^{\circ}\text{C}$ como temperatura de almacenamiento congelado a fin de lograr una mayor detección del proceso de deterioro que nos ocupa.

La Figura 17 muestra la comparación de ambas metodologías para salmón congelado obteniéndose, al igual que para carne vacuna refrigerada, valores significativamente más altos con el método de Tarladgis que a través del método de Matsushita modificado, en los primeros tramos del almacenamiento tendiendo a valores similares hacia el máximo de oxidación. Esta diferencia, como en el caso anterior, podría deberse a una menor especificidad del método de Tarladgis, el cual daría cuenta de un mayor número de sustancias reactivas al TBA que el método de Matsushita modificado. En función del tiempo, al aumentar la concentración de MAL respecto de las otras sustancias, esta inespecificidad incidiría por consiguiente en menor medida, lo que explica el acercamiento de los valores en ambos métodos. Luego, cuando comienzan a predominar las reacciones de consumo de MAL, se visualiza una situación similar a la detectada previo al máximo de oxidación.

La Figura 18 muestra los valores del número de TBA (mg MAL/kg de carne) en función del tiempo de almacenamiento congelado ($T = -5^{\circ}\text{C}$) para carnes provenientes de pescado, pollo y músculo semitendinoso bovino, respectivamente, a fin de poder determinar también la aplicabilidad de la metodología adoptada a diversas especies.

En primer lugar, se ha registrado una tendencia similar a la observada por otros autores en cuanto al aumento de los valores del número de TBA en función del tiempo de almacenamiento

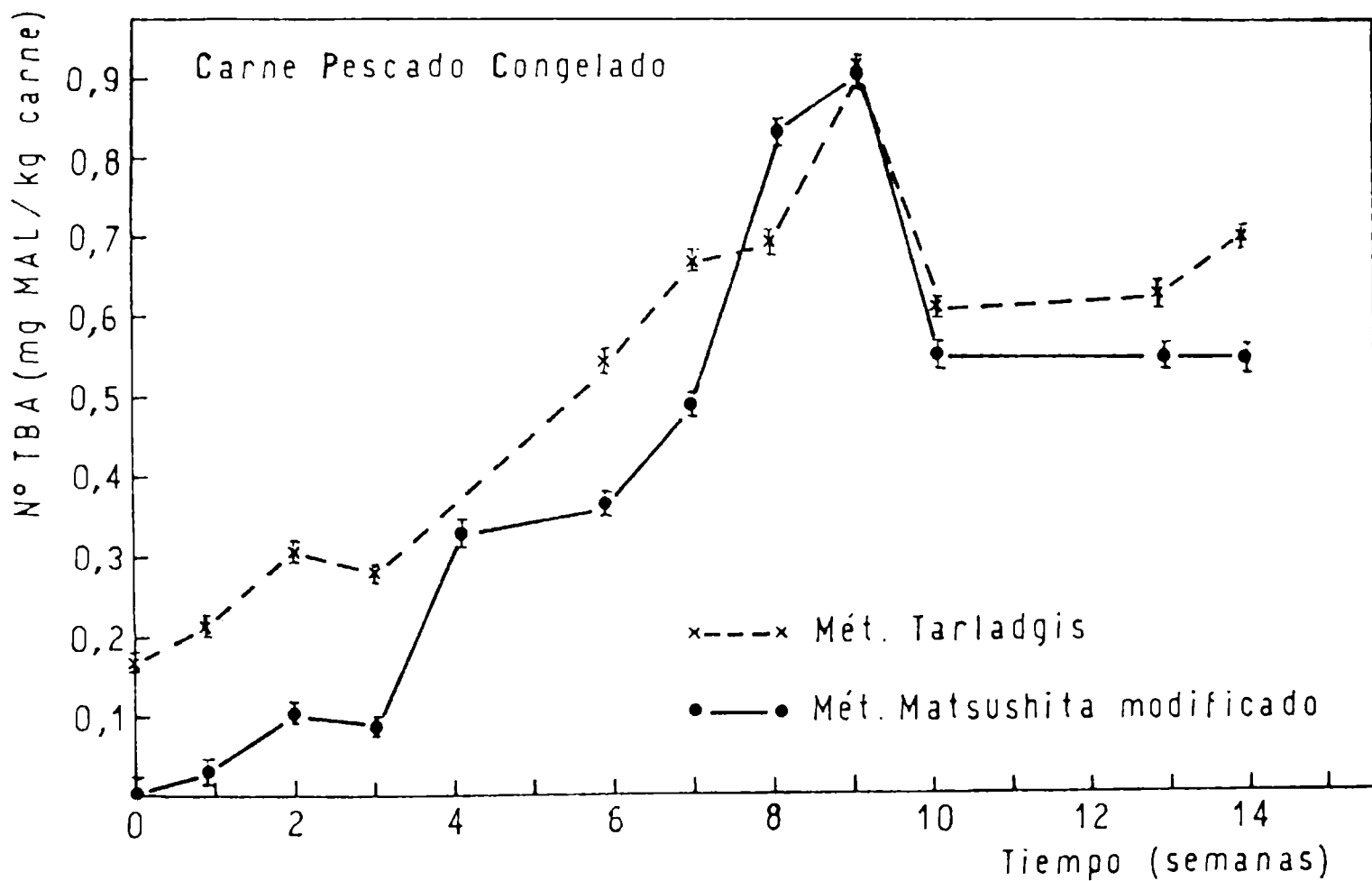


FIGURA 17 - Oxidación lipídica en exudados desproteinizados provenientes de carne de pescado congelado almacenado a $T = -5 \pm 1^\circ\text{C}$. Comparación de metodologías: (x---x) método de Tarladgis; (•-•) método de Matsushita modificado. Cada valor surge del promedio de 4 determinaciones.

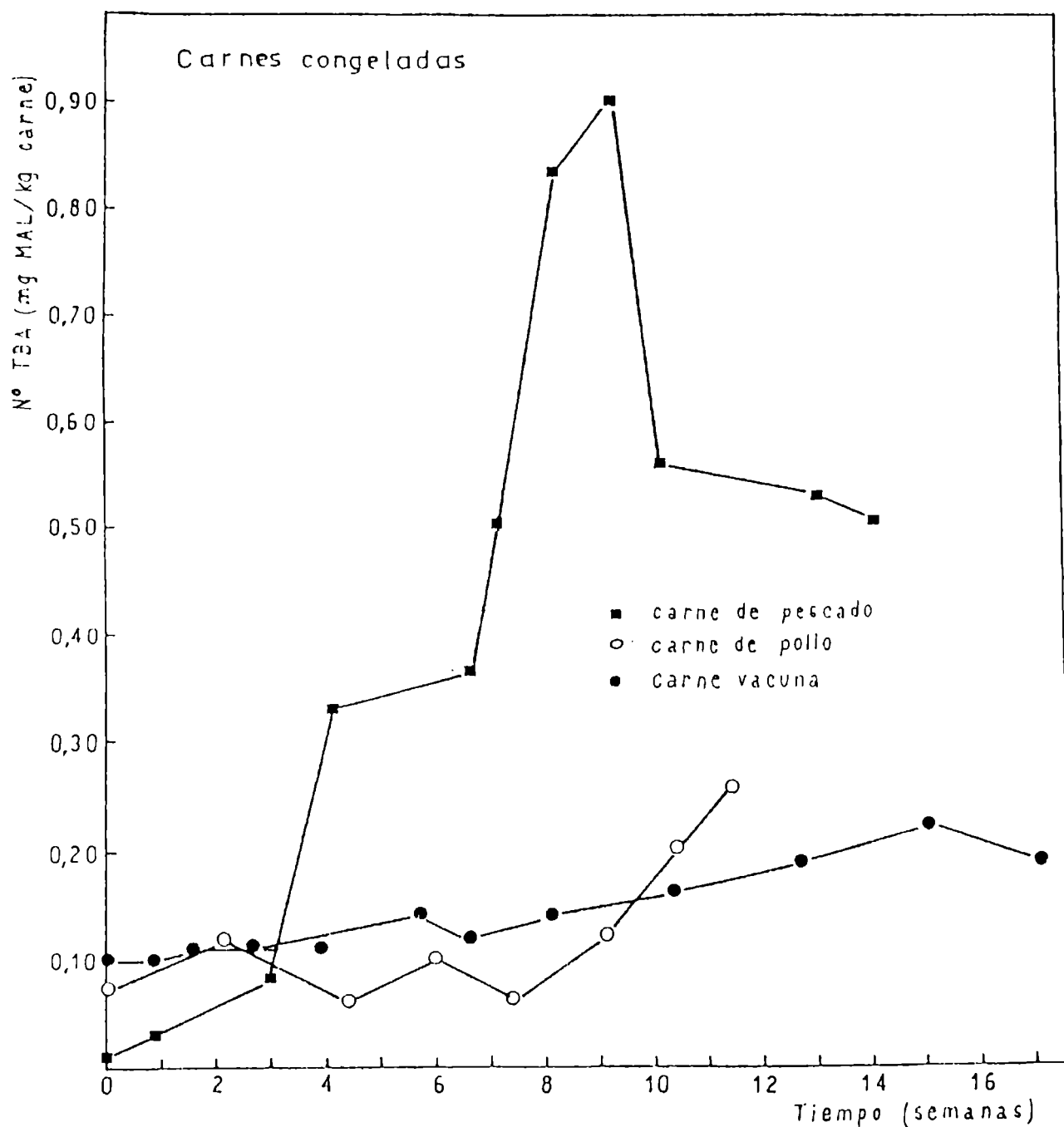


FIGURA 18 - Efecto del tiempo de almacenamiento congelado a $T = (-5 \pm 1)^\circ\text{C}$ sobre la oxidación de lípidos en exudados desproteinizados provenientes de carnes de diversas especies: (■) pescado; (○) pollo; (●) vacuna.

Cada valor surge del promedio de 4 determinaciones.

$s = \Delta/\sqrt{n} = 0,02$ desviación estándar

congelado (Awad y col., 1968 y 1969; Pawar y Magar, 1966).

En el caso de carne vacuna se observó que los valores de TBA no aumentan sensiblemente durante el transcurso de la experiencia de almacenamiento a -5°C . Estos resultados coinciden con datos de literatura (Awad y col., 1968; Witte y col., 1970) en los que se indica una escasa rancidez oxidativa para estas carnes congeladas.

En pechuga de pollo congelada se observó una mayor susceptibilidad a la oxidación que en el caso de músculo bovino, aunque tampoco fue demasiado importante. Puede verse que recién hacia la octava semana de almacenamiento a -5°C comienzan a elevarse los valores del número de TBA.

En el caso de la carne de salmón congelada se registró una marcada oxidación lipídica; a partir de la tercera semana se visualizó un importante incremento en los valores del número de TBA para llegar al máximo alrededor de las 9 semanas de almacenamiento a -5°C seguido de una disminución de los valores de TBA. Esta disminución ha sido observada por otros investigadores en varios sistemas modelo y reales (Tarladgis y Watts, 1960; Deng y col., 1977). La misma se explica en base a que las reacciones que consumen MAL -principalmente reacciones de condensación con grupos amino libres de proteínas (Funes y col., 1982; Kwon y col., 1965)- comienzan a ser más importantes que aquellas que lo producen (Labuza, 1971b).

Estos resultados reflejan la distinta susceptibilidad de carnes de diversas especies a los procesos de oxidación lipídica, lo cual está determinado principalmente por las diferentes

composiciones acídicas de los lípidos en cada especie, entre otros factores (concentración de mioglobina, α -tocoferol, sustancias prooxidantes, etc.).

En la Tabla 8 pueden observarse las diferencias en la composición acídica de distintos alimentos resaltando el alto contenido de ácido linoleico (18:2) en el salmón, el cual es comparable al existente en el aceite de soja.

TABLA 8: Composición acídica de distintos alimentos (Porcentajes de ácidos grasos totales)

	Carne	Salmón	Papa	Aceite de soja
Mirístico (14:0)	3,1	5,4	0,3	0,1
Palmítico (16:0)	29,1	26,2	19,3	10,5
Estéarico (18:0)	18,9	6,3	5,4	3,2
Oleico (18:1)	<u>44,0</u>	2,7	<u>53,0</u>	22,3
Linoleico (18:2)	0,3	<u>52,1</u>	19,7	<u>54,5</u>
Linolénico (18:3)	trazas	1,8	1,2	8,3
Araquídico (20:0)	trazas	6,5		0,2

Según datos aportados por Funes, J. (1984)

La Tabla 9 muestra la composición en ácidos grasos insaturados de diversos tipos de carnes, observándose que la correspondiente a pescado es una de las que presenta un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados y por lo tanto, es la más susceptible de sufrir rancidez oxidativa (Lundberg, 1962). Este hecho se correlaciona con lo observado en la Figura 18. Le siguen

en importancia pollo y bovino, respectivamente.

TABLA 9

Acido graso	Bovinos ^a	Cerdo ^b	Pollo ^c	Pescado ^d
C18:1	33,44	12,78	20,25	19,59
C18:2	10,52	35,08	14,20	5,88
C18:3	1,66	0,33	0,90	8,07
C20:2	0,69	---	---	0,20
C20:3	2,77	1,31	1,30	0,36
C20:4	8,51	9,51	11,60	3,75
C20:5	0,76	1,31	1,55	7,16
C22:4	0,88	0,98	2,10	0,65
C22:5	0,92	2,30	5,75	2,39
C22:6	---	2,30	5,75	2,39

a Datos obtenidos por Igene y col. (1980)

b De Yamauchi y col. (1980)

c De Moerck y Ball (1974)

d De Mai y Kinsella (1979)

La Tabla 10 proporciona una clasificación de los pescados con respecto a su contenido en lípidos totales y fosfolípidos. Se observa una amplia variación en el contenido de los mismos desde 0,5 - 25%.

Además, las variaciones en el contenido de lípidos no sólo se deben a razones de especie sino también a factores como sexo, habitat, alimentación, época del año, estado biológico, edad,

TABLA 10: Clasificación de pescado de acuerdo a su contenido en lípidos

	Lípidos totales (%)	Fosfolípidos (%L.T.)
Pescado magro (bacalao, merluza)	0,5 - 1,1	65
Pescado semigraso (lenguado, hipogloso)	2,0 - 5,0	25
Pescado graso (arenque, caballa, atún, salmón)	5 - 25	10

L.T.: Lípidos totales

Según datos aportados por Funes, J. (1984)

etc. La Tabla 11 muestra las variaciones de esa naturaleza en el caso de la caballa.

TABLA 11: Distribución de lípidos de acuerdo al tipo de músculo, época y especie en Caballa

	<i>S.scombrus</i>		<i>S.scombrus</i>		<i>S.japonicus</i>	
	Epoca		Músculo		Epoca	
	Diciembre	Junio	Blanco	Oscuro	Agosto	Enero
Lípidos totales (%)	24,1	9,1	10,2	14,4	10,8	15,5
Fosfolípidos (%)	0,8	0,9	0,5	1,6	1,1	1,0

Según datos aportados por Funes, J. (1984)

Por otra parte, dentro de un mismo pescado existen variaciones en el contenido y calidad de lípidos de acuerdo a la distribución anatómica en el mismo. Así por ejemplo, en merluza argentina existe la siguiente distribución:

Filet de frente externo (sin piel)	27,3 %
Filet de frente interno (sin espinazo)	0,6 %
Parte caudal	7,8 %
Parte post-cefálica	0,7 %

También se producen variaciones en el contenido de lípidos de acuerdo al tipo de músculo. Así en general, el músculo oscuro es más autoxidable que el músculo blanco (el músculo oscuro presenta mayor contenido de lípidos, mayor concentración de componentes con el grupo Hemo, menor contenido en agua). En nuestro caso, con el objeto de minimizar los problemas que incorporaría la variabilidad biológica en los resultados de la determinación de sustancias reactivas al TBA, se trabajó con la totalidad de la parte muscular del salmón eliminando previamente las vísceras y el tejido adiposo. En todas estas operaciones, se mantuvo el pescado a 0°C a fin de evitar alteraciones por efecto térmico.

El contenido de fosfolípidos es otra característica que es necesario tener en cuenta para estudiar la susceptibilidad del pescado a los procesos de autoxidación. La Tabla 12 muestra el contenido de lípidos totales y de fosfolípidos para distintos pescados. Se observa que el contenido de lípidos totales varía ampliamente, mientras que el correspondiente a fosfolípidos se mantiene por debajo del 1 %. Es decir que la diferencia está dada por el contenido de triglicéridos.

La Tabla 13 indica las composiciones acídicas correspondientes a las fracciones de fosfolípidos y triglicéridos de distintos pescados. Se observa que la fracción de fosfolípidos presenta un mayor contenido de ácidos grasos altamente insaturados (especial-

TABLA 12: Distribución de lípidos en pescados

	Lípidos totales (%)	Fosfolípidos (%)	Fosfolípidos/lípidos totales (%)
BACALAO (músculo blanco)	0,59	0,52	88
MERLUZA (músculo)	1,55	0,46	30
TRUCHA (músculo)	5,30	0,63	12
SARDINA (entera)	5,00	0,91	18

Según datos aportados por Funes, J. (1984)

mente el contenido en 22:6). Esta característica explica el hecho que la fracción de fosfolípidos sea altamente autooxidable como lo han demostrado estudios recientes. Pearson y col. (1977); Igene y col. (1980) han observado que en la oxidación de lípidos en carnes bovinas, la fracción de fosfolípidos es la más susceptible a la misma. Debemos recordar que los fosfolípidos son constituyentes importantes de las membranas celulares, de allí que la oxidación de los mismos tenga consecuencias importantes en la estructura del pescado y por ende en la calidad funcional, textural y organoléptica del mismo.

Además de todas estas diferencias debido al contenido y calidad de los lípidos, existen otros factores difíciles de determinar con precisión de forma tal que distintos sistemas presentan distintas facilidades a oxidarse. Así por ejemplo Nair y col. (1976); Ke y col. (1977), observaron que en sardina y caballa respectivamente, los lípidos de la cola son más oxidables que los correspondientes a músculo. Esta diferencia no se explica en base a la composición de los lípidos pues ambas fracciones presentan

composiciones acídicas similares sino que los autores lo atribuyen a interacciones entre proteínas y lípidos que pueden afectar la cinética de los procesos oxidativos.

TABLA 13: Distribución de ácidos grasos en pescados

	SABALO		ANCHOITA		BACALAO	
	PL.(%)	TG (%)	PL.(%)	TG (%)	PL.(%)	TG (%)
Saturados	35,6	37,8	35,4	38,4	22,0	21,2
Monoenoicos	22,8	28,2	26,6	25,2	20,8	57,9
Dienoicos	1,5	1,7	3,2	3,3	0,9	0,9
Trienoicos	0,7	2,3	0,9	0,9	0,3	0,2
Polienoicos	34,2	23,2	24,8	22,8	56,0	16,8
(22:6)	(23,2)	(8,3)	(15,0)	(9,2)	(35,8)	(7,4)

PL: Fosfolípidos

TG: Triglicéridos

Según datos aportados por Funes, J. (1984)

Es conveniente remarcar que la congelación como método de preservación involucra una combinación de al menos dos efectos: 1) deshidratación interna del tejido y 2) descenso de la temperatura. El primero está dado tanto por la formación de cristales de hielo como por el aumento de la concentración salina en la porción de agua no congelada (Fennema y col., 1973), provocando una disminución de la actividad acuosa (a_w). Ambos efectos sumados al de la baja temperatura, permiten controlar satisfactoriamente el crecimiento bacteriano sin necesidad de recurrir al

agregado de preservadores químicos -como ocurre en el caso de la refrigeración- (Zamora y Zaritzky, 1987) permitiendo conservar la carne desde el punto de vista higiénico y nutricional durante períodos más prolongados.

No obstante y de acuerdo a lo expresado anteriormente, la congelación de la carne y su posterior almacenamiento congelado pueden causar cambios indeseables en sus características sensoriales como: desarrollo de rancidez, cambios en la textura, pérdida de la capacidad de retención de agua.

En lo que se refiere a la actividad acuosa (a_w), es importante destacar que es uno de los principales factores que gobierna la velocidad de oxidación de lípidos en alimentos (Karel, 1979). En la Figura 19 se ejemplifica la relación entre ambas (Labuza, 1971a). Se observa que tanto a muy bajos niveles de actividad acuosa como a partir de valores $a_w = 0,6$, la velocidad de enranciamiento presenta un máximo y alrededor de valores de $a_w = (0,3 - 0,4)$ un mínimo. Esto se debe a lo siguiente:

- a a_w bajos el agua actúa como antioxidante debido a que: 1) decrece la actividad catalítica de los metales (prooxidantes) debido a su hidratación; 2) se favorece la recombinación de radicales libres y 3) al formar uniones por puente hidrógeno con los hidroperóxidos también modifica el mecanismo de descomposición de los mismos, disminuyendo en última instancia la velocidad de formación de radicales libres (Karel, 1979; Fennema, 1976). 4) Se incrementan las reacciones de browning no enzimático (produciéndose sustancias de carácter antioxidante).
- a altos valores de a_w la autooxidación se acelera por: un aumen-

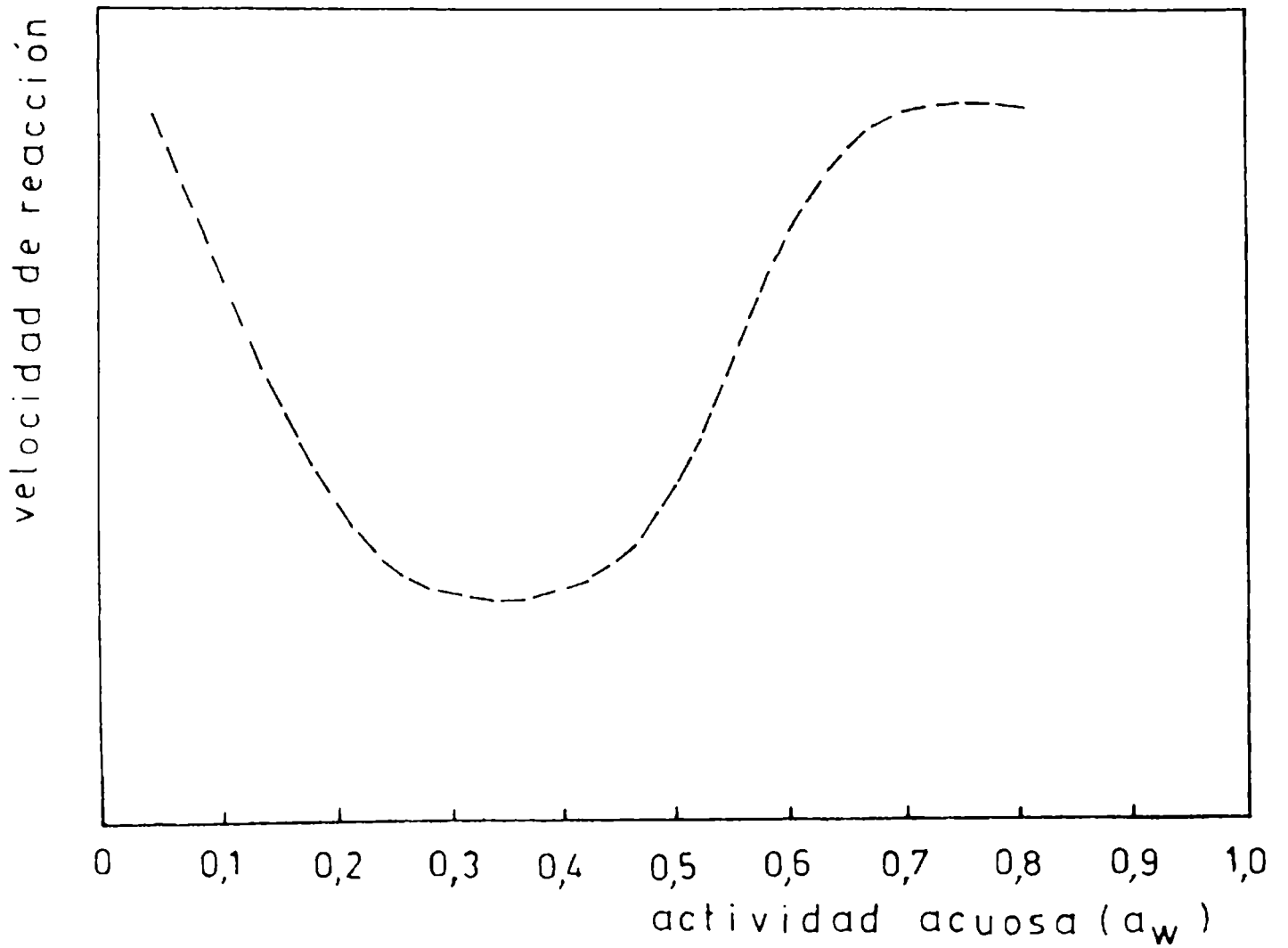


FIGURA 19 - Velocidad de reacción (oxidación de lípidos) en función de la actividad acuosa (a_w) (Labuza, 1971a).

to en la movilización de los reactantes hacia los lugares de oxidación o bien porque se inducen cambios en macromoléculas tales como proteínas de forma que sitios catalíticos adicionales se ponen en juego (Chou y col., 1973; Heidelbaugh y Karel, 1970; Fennema, 1976).

Además, los niveles de actividad acuosa afectan en forma importante el entrecruzamiento de proteínas, la inactivación enzimática, la escisión de proteínas, la producción de radicales proteicos y la destrucción de aminoácidos (Frankel, 1983).

En síntesis, el proceso de congelación tiene sobre la autooxidación las siguientes consecuencias: 1) Disminución de las constantes de velocidad k como consecuencia de la disminución de la temperatura, 2) concentración de los reactantes con el consiguiente aumento de las velocidades de reacción debido a la remoción del agua libre y 3) aumento de la velocidad de reacción por disminución de la actividad acuosa del sistema a niveles intermedios.

Por ejemplo en nuestro caso, el pescado congelado entraría en la categoría de alimentos de humedad intermedia.

Debido a todo lo expuesto, reviste gran importancia el estudio del mayor número de variables que afectan este proceso de deterioro a fin de restringirlo y posibilitar la fundamentación científica de las diversas técnicas que integran el procesamiento moderno de alimentos en tal sentido.

Otro de los problemas relacionado con el congelado es el llamado "rusting", que se manifiesta con un pardeo en la superficie de especies marinas grasas. Se suele explicar como consecuen-

cia de un pardeamiento no enzimático o sea reacciones de condensación entre compuestos carbonílicos y grupos amino. Las aminas se producirían por acción bacteriana y los compuestos carbonílicos a partir de la oxidación de lípidos (Cheftel y Cheftel, 1976).

4.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO CONGELADO

Además de las experiencias llevadas a cabo a $T = -5^{\circ}\text{C}$, se registró la evolución de la oxidación de lípidos en pescado congelado en función del tiempo de almacenamiento a $T = -20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, siendo éste un valor usualmente empleado para la conservación de productos cárneos (Calvelo, A., 1981). En la Figura 20 se observan los valores del número de TBA vs. tiempo de almacenamiento (semanas) para pescado congelado correspondiente a las experiencias de almacenamiento desarrolladas a -5°C y -20°C , respectivamente. De la misma surge claramente la importancia de las condiciones de almacenamiento, principalmente la temperatura, para un sustrato tan susceptible de presentar este tipo de deterioro. Así, a -5°C puede seguirse la clásica curva de oxidación con un máximo alrededor de las 9 semanas de almacenamiento mientras que a -20°C , luego de 18 semanas, sólo se registró un pequeño aumento en los niveles de oxidación originales. Este efecto ha sido observado también por otros autores (Ke y col., 1977). Cabe consignar que las experiencias de almacenamiento a $T = -5^{\circ}\text{C}$ alcanzaron una duración de alrededor de 4 meses, ya que a partir de ese período las muestras presentaron importantes alteraciones organolépticas.

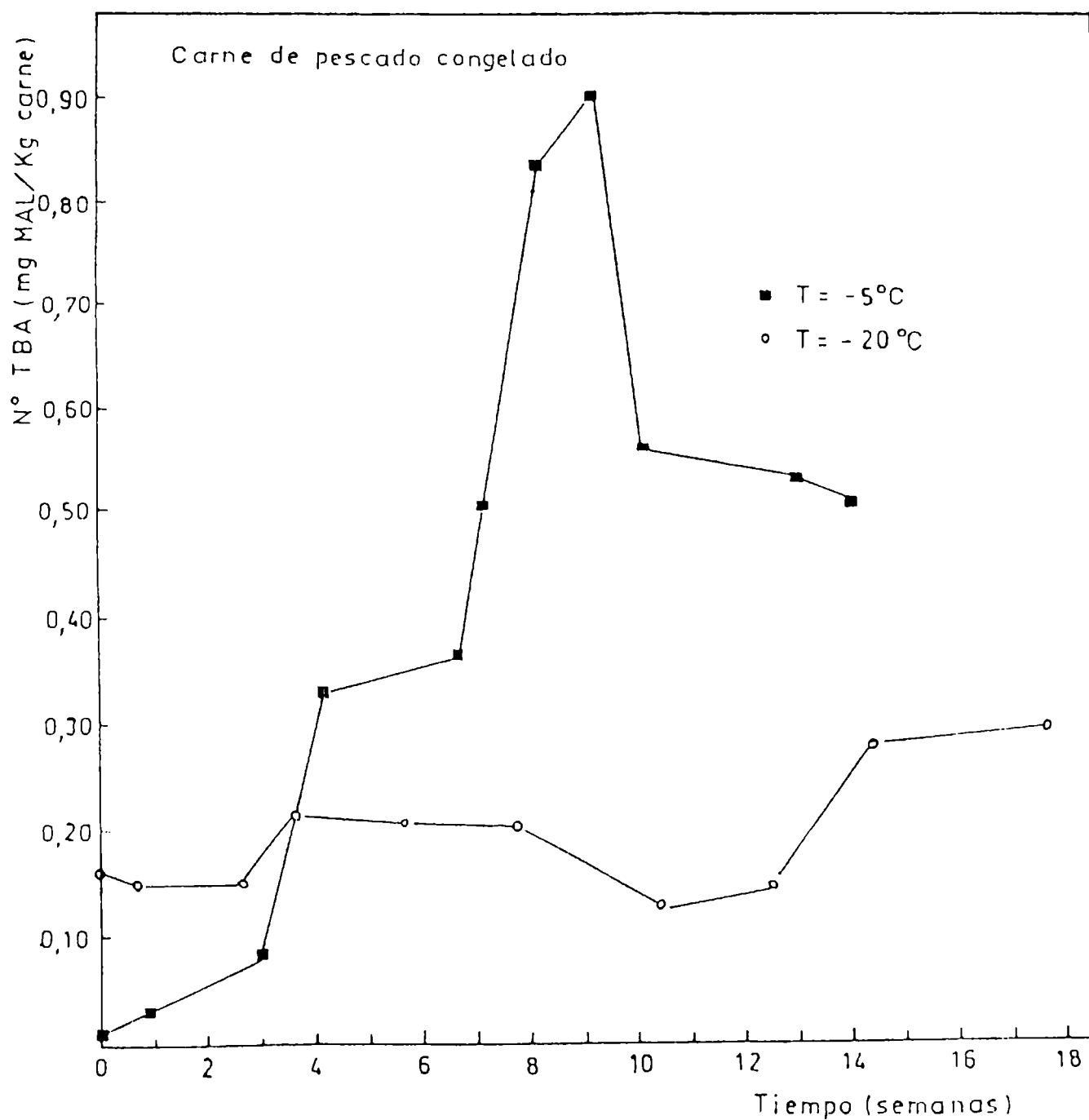


FIGURA 20 - Efecto de la temperatura de almacenamiento congelado sobre la oxidación lipídica de carne de pescado congelado en función del tiempo de almacenamiento: (■) T = -5°C; (○) T = -20°C. Cada valor surge del promedio de 4 determinaciones.

$s = \Delta/\sqrt{n} = 0,02$ desviación estándar.

Complementando esta información y a fines de comparación, pudo observarse que para músculo semitendinoso bovino el número de TBA luego de 4 meses de almacenamiento a $T = -5^{\circ}\text{C}$ es equivalente al registrado al cabo de 10 días a $T = 4^{\circ}\text{C}$ (Figs. 18 y 11), reafirmando nuevamente la importancia de la temperatura sobre los procesos de oxidación.

4.4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE CONGELACION SOBRE LA OXIDACION DE LIPIDOS. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Este estudio se inició sobre muestras de pescado (salmón de mar), las que fueron congeladas a distintas velocidades: rápida y lenta. La velocidad de congelación queda determinada por la rapidez con que desciende la temperatura en el músculo congelado, en tanto que la cantidad de agua tisular congelada depende de la temperatura alcanzada en la congelación.

Ahora bien, se eligió salmón de mar como especie de estudio debido a su mayor susceptibilidad a la oxidación lipídica, de manera tal que la detección de posibles diferencias pudieran ser evidenciadas más fácilmente.

De acuerdo con lo expresado en la Sección 2.3.2., se adoptó como medida de la velocidad de congelación el tiempo característico de congelación t_c (Bevilacqua y col., 1979; Añón y Calvelo, 1980), es decir el tiempo que tarda la muestra en pasar desde $-1,1^{\circ}\text{C}$ (temperatura a la que se inicia la congelación del agua del tejido muscular) a -7°C (temperatura a la que se ha congelado el 80% del agua tisular (Riedel, 1957; Mascheroni, 1977)).

A temperaturas más bajas continúa la formación de hielo a partir del agua disponible que está presente en el tejido. No obstante, hay un porcentaje de agua unida fuertemente a proteínas que no congela aún cuando se alcancen temperaturas del orden de -70°C . Esta porción de agua denominada agua ligada representa aproximadamente el 10% del agua total (Fennema y col., 1973).

En músculo semitendinoso bovino se han observado $t_c < 5$ minutos para velocidades de congelación rápidas; $t_c = 20-25$ minutos en el caso de velocidades intermedias y $t_c > 60$ minutos para velocidades lentas de congelación.

La morfología adoptada por el hielo en el tejido, el tamaño de los cristales formados y su distribución en el espacio intra o extracelular dependen de la velocidad de congelación, adquiriendo particular relevancia sobre una serie de cambios de atributos sensoriales que pueden sufrir las carnes congeladas.

Estudios histológicos realizados en músculo semitendinoso bovino, indicaron que altas velocidades de congelación inducen la formación de un gran número de pequeños cristales de hielo intracelulares. Al aumentar el t_c , es decir al ir disminuyendo la velocidad de congelación, en la etapa de velocidades intermedias se produce la disminución del número de cristales como consecuencia del aumento de su tamaño llegando a la cantidad de uno o dos cristales por fibra. Por último, en el caso de trabajar con una velocidad lenta de congelación, los estudios evidencian que la cristalización de hielo es exclusivamente extracelular provocando este fenómeno la deshidratación y deformación de las fibras (Bevilacqua y Zaritzky, 1980; Jul, 1984).

Resultados análogos han sido informados por otros autores congelando músculo de pescado (bacalao) a distintas velocidades (Love, 1966).

En virtud de datos de literatura (Considine y Considine, 1982) sobre el contenido de agua correspondiente a salmónidos (77%), el cual no difiere sustancialmente del correspondiente al músculo semitendinoso bovino (75%), se asimiló el comportamiento del músculo de pescado al de este último, en lo que se refiere a tiempos característicos de congelación.

En base a lo señalado anteriormente, muestras de pescado congeladas a distintas velocidades fueron descongeladas a $t = 0$, obteniéndose los respectivos exudados desproteinizados de acuerdo con las técnicas descriptas. Sobre dichos exudados se practicó la determinación de sustancias reactivas al TBA a través del método de Matsushita modificado.

Los resultados obtenidos del análisis estadístico practicado sobre un número total de datos (aproximadamente 150), no arrojaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los números TBA correspondientes a muestras provenientes de congelación rápida o lenta.

Estas experiencias se complementaron con otras que a su vez involucraron el almacenamiento a $T = -5^{\circ}\text{C}$ de muestras de pescado congeladas también a distintas velocidades: lenta y rápida, respectivamente.

Sobre estas muestras se obtuvieron por separado los exudados desproteinizados y los destilados. Seguidamente, se determinaron los números de TBA en función del tiempo de almacenamiento por

las técnicas de Matsushita modificada y de Tarladgis, respectivamente.

Los resultados obtenidos permitieron la detección de diferencias significativas entre los números de TBA en función del tiempo de almacenamiento, pero no acusaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los números de TBA promedio correspondientes a muestras provenientes de congelación rápida o congelación lenta (Tabla 14).

TABLA 14: Números de TBA correspondientes a destilados de músculo de pescado congelado (T° de almac. = -5°C)

Tiempo de almacenamiento (ds.)	n° TBA Cong. Rápida	S ¹	n° TBA Cong. Lenta	S ¹
0	0,38	0,03	0,24	0,03
5	0,38	0,05	0,39	0,10
11	0,66	0,20	0,47	0,07
19	0,84	0,10	0,61	0,03
29	1,07	0,30	0,84	0,07
32	1,38	0,18	0,96	0,30
39	0,89	0,06	1,02	0,20
47	1,00	0,28	0,82	0,07

- n°TBA = mg MAL/kg carne - Ensayo de TBA efectuado según la técnica de Tarladgis

- Cada valor surge del promedio de cuatro (4) determinaciones

$$1 S = \frac{s}{\sqrt{n}} \text{ Desviación estándar}$$

Estos resultados podrían estar relacionados con el hecho que

durante el almacenamiento congelado el hielo formado se ve afectado por el fenómeno conocido como recristalización (Love, 1966). Así, se produce el crecimiento de grandes cristales a expensas de los más pequeños en un sistema policristalino, lo que conduce a la reducción en el número de cristales y al incremento del tamaño medio cristalino sin modificaciones en la masa total de agua congelada (Brook, 1976; Bevilacqua y Zaritzky, 1982).

Dicho fenómeno a su vez es dependiente de la temperatura de almacenamiento congelado, por lo que por ejemplo a $T = -5^{\circ}\text{C}$ se registra con mayor rapidez que a temperaturas inferiores. Así para la temperatura ensayada (-5°C), el efecto de la velocidad de congelación es prácticamente indistinguible hacia los 30 días de almacenamiento congelado (Martino, 1987). De esta manera, en función del tiempo y temperatura de almacenamiento congelado empleadas y considerando el fenómeno de recristalización una congelación rápida podría comportarse en forma prácticamente equivalente a una congelación realizada con velocidad lenta por lo que, las posibles diferencias existentes en el momento inicial ($t=0$) podrían resultar enmascaradas a lo largo del almacenamiento.

No obstante, de acuerdo a lo informado precedentemente tampoco se han detectado diferencias en los niveles de oxidación lipídica a $t = 0$, es decir sin proceder al almacenamiento, en el caso de muestras congeladas con distintos tiempos característicos de congelación.

Paralelamente a la labor comentada, se realizaron experiencias en torno al tema con otra especie, músculo de pollo (pechuga).

Las muestras respectivas fueron también congeladas a dos velocidades de congelación: rápida y lenta y luego almacenadas en un congelador a $T = -5 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, se prosiguió evaluando la oxidación de lípidos sobre exudados desproteinizados y destilados a través de las técnicas descriptas anteriormente.

Los resultados obtenidos presentaron tendencias similares a los registrados para músculo de pescado almacenado a la misma temperatura, es decir se evidenciaron diferencias significativas a nivel $P < 0,05$ en función del tiempo de almacenamiento pero no entre los números de TBA promedio correspondientes a muestras provenientes de congelación rápida y lenta, tanto para los exudados como para los destilados (Fig. 21 y Tabla 15, respectivamente).

TABLA 15: Números de TBA correspondientes a destilados de músculo de pollo (pechuga) congelado (T° de almac. = -5°C)

Tiempo de almacenamiento (ds.)	n° TBA Cong. Rápida	S ¹	n° TBA Cong. Lenta	S ¹
0	0,25	0,06	0,16	0,03
11	0,26	0,01	0,41	0,06
21	0,44	0,12	0,45	0,12
38	0,44	0,13	0,46	0,20
52	1,03	0,07	0,35	0,07
62	1,27	0,34	0,75	0,06
74	0,73	0,11	0,78	0,07
83	0,83	0,08	0,69	0,10

- n°TBA = mg MAL/kg carne - Ensayo de TBA efectuado según la técnica de Tarladgis

- Cada valor surge del promedio de cuatro (4) determinaciones

$$s = \frac{\Delta}{\sqrt{n}} \quad \text{Desviación estándar}$$

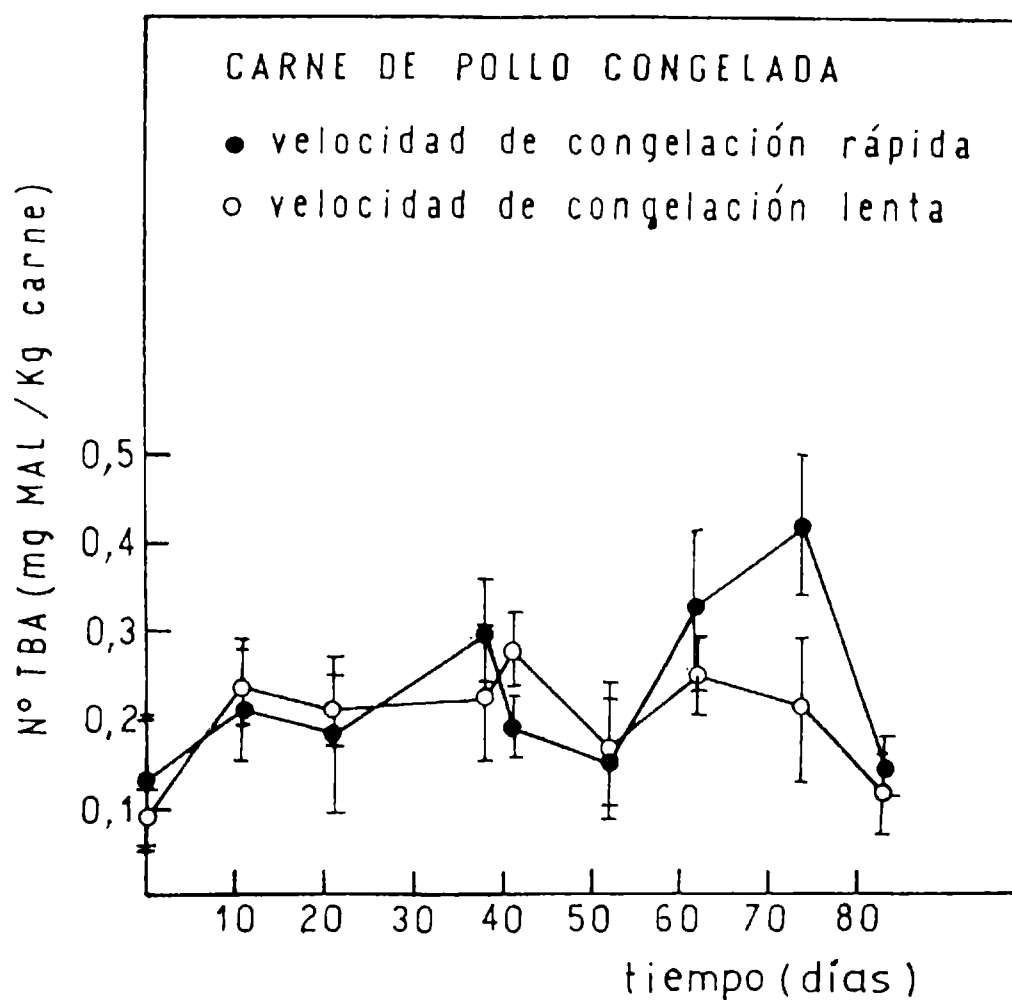


FIGURA 21 - Evolución de la oxidación lipídica correspondiente a exudados provenientes de carne de pollo congelada a distintas velocidades: (●) velocidad de congelación rápida; (○) velocidad de congelación lenta. Cada valor surge del promedio de 6 determinaciones. Se indica con barras verticales la variación o amplitud de los valores obtenidos para el número de TBA para un mismo período de almacenamiento.

En el caso de destilados de muestras de pollo, a pesar de registrarse rancidez oxidativa en función del tiempo de almacenamiento, el nivel alcanzado por esta especie fue inferior al registrado para destilados de pescado congelado. Este hecho está relacionado con la menor susceptibilidad a la oxidación lipídica por parte del pollo como consecuencia de las diferencias en la composición acídica entre las especies, según se ha discutido previamente.

Es interesante señalar que si bien -en el caso de las especies estudiadas- la velocidad de congelación no tendría influencia sobre un mayor desarrollo de la oxidación de lípidos, en base a estudios histológicos y de desnaturalización proteica (Love, 1966; Wagner, 1986; Wagner y Añón, 1985; 1986 a y b ; Shenouda, 1980) sería más aconsejable congelar carnes con velocidades rápidas de congelación a fin de lograr su preservación resguardando además, parámetros tecnológicos de importancia.

4.5. CONSERVACION DE TOCINO (SIN SALAR) CONGELADO ENVASADO EN PELICULAS PLASTICAS FLEXIBLES

En virtud de los resultados obtenidos con respecto al desarrollo de rancidez oxidativa durante el almacenamiento congelado en carne vacuna, pescado y pollo, se prosiguieron los estudios utilizando un sustrato de alto tenor graso (tocino) a fin de magnificar la probabilidad del deterioro e implementar un método combinado de preservación (T° congelación - envasado) que permita inhibir o minimizar la ocurrencia del mismo.

El tocino está constituido por tejido graso de espesor varia-

ble localizado debajo de la piel del cerdo. Presenta una capa superficial, otra profunda y una tercera intermedia. Las capas más externas son las más ricas en ácidos grasos insaturados y las que dan una sensación de mayor dureza debido a un mayor contenido de tejido conectivo en los mismos.

El tejido graso contiene además agua, cenizas, proteínas y pequeñas cantidades de otros componentes del tejido muscular, siendo la porción acuosa -asociada al tejido conectivo- generalmente muy escasa.

La composición media correspondiente al tejido graso de cerdo propuesta por algunos investigadores (Grau, 1965) da cuenta de alrededor 90,3% de grasa para el tocino dorso-cervical, 92,5% en el tocino dorso-lumbar y 93,8% en el caso de la manteca peritoneal.

En función de las características señaladas, es altamente probable que durante el almacenamiento del tejido adiposo congelado se produzcan una serie de reacciones de deterioro -en forma relevante oxidación de lípidos- cuya consecuencia se traduzca en la disminución del período de vida útil del producto.

Los objetivos de este trabajo se orientaron al estudio de las modificaciones producidas en muestras de tocino dorsal sin salar, envasado en películas plásticas de distinta permeabilidad al oxígeno, durante el almacenamiento congelado a $T = -10$ y -20°C , respectivamente.

Así, a través de mediciones del índice de peróxido (PV), número de TBA, índice de acidez, coloración superficial y crecimiento microbiano, pudieron establecerse las condiciones de almacenamiento congelado que permiten prolongar la estabilidad del alimento en cuestión.

En la Figura 22 se observa la evolución del índice de peróxido (PV) vs. el tiempo de almacenamiento para muestras envasadas en polietileno y en EVA/SARAN/EVA a las distintas temperaturas de almacenamiento empleadas. En el caso de la película de alta permeabilidad al oxígeno, los valores de PV alcanzaron niveles de 2 meq de iodo/kg grasa a los 40 días de almacenamiento a $T = -20^{\circ}\text{C}$; valores de 5 meq de iodo/kg grasa se superaron a partir de los 120 días, alcanzándose niveles mayores de 10 meq de iodo/kg grasa a partir de los 170 días a -20°C .

En cambio, en EVA/SARAN/EVA, las muestras mantenidas tanto a -10°C como a -20°C mostraron valores bajos de PV, los cuales no alcanzaron a superar niveles de 2 meq de iodo/kg grasa durante 170 días de almacenamiento.

En lo que se refiere al número de TBA en función del tiempo de almacenamiento, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las muestras envasadas en polietileno y al vacío en EVA/SARAN/EVA (Fig. 23).

La curva correspondiente a envasado sin exclusión de oxígeno presenta un máximo a tiempos de almacenamiento relativamente cortos (30 días), lo que indica la ocurrencia de procesos autoxidativos desde prácticamente los primeros tramos del almacenamiento congelado en las muestras envasadas en polietileno. Se observa que la concentración de sustancias reactivas al TBA crece en el primer período y luego disminuye en función del predominio de reacciones que consumen MAL.

Paralelamente, las muestras envasadas al vacío mantienen valores bajos de TBA a lo largo de todo el tiempo de almacenamiento,

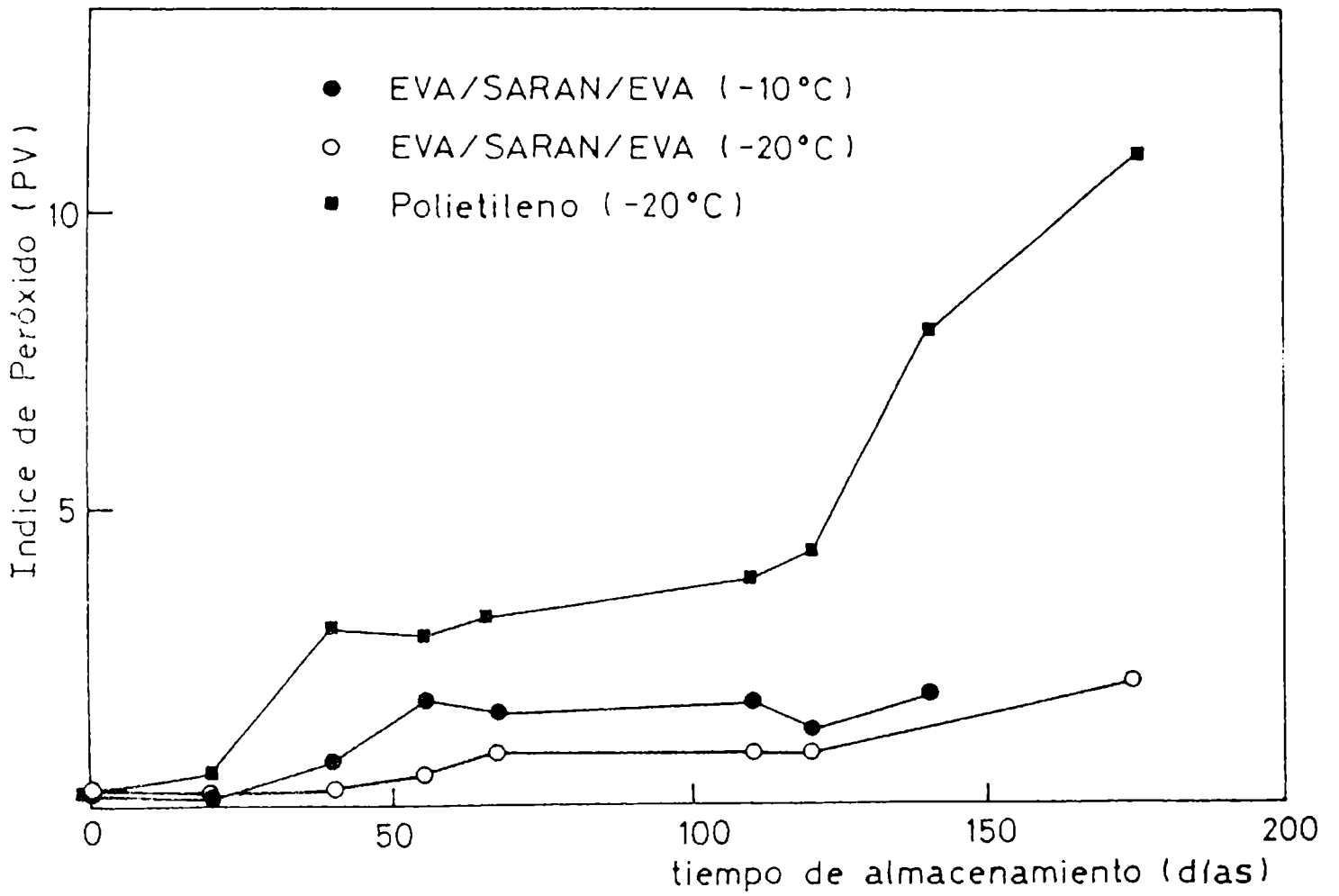


FIGURA 22 - Evolución del índice de peróxido (meq de iodo/kg grasa) durante el almacenamiento congelado de tocino dorsal sin salar envasado en: (●) EVA/SARAN/EVA (T = -10°C); (○) EVA/SARAN/EVA (T = -20°C); (■) polietileno (T = -20°C).

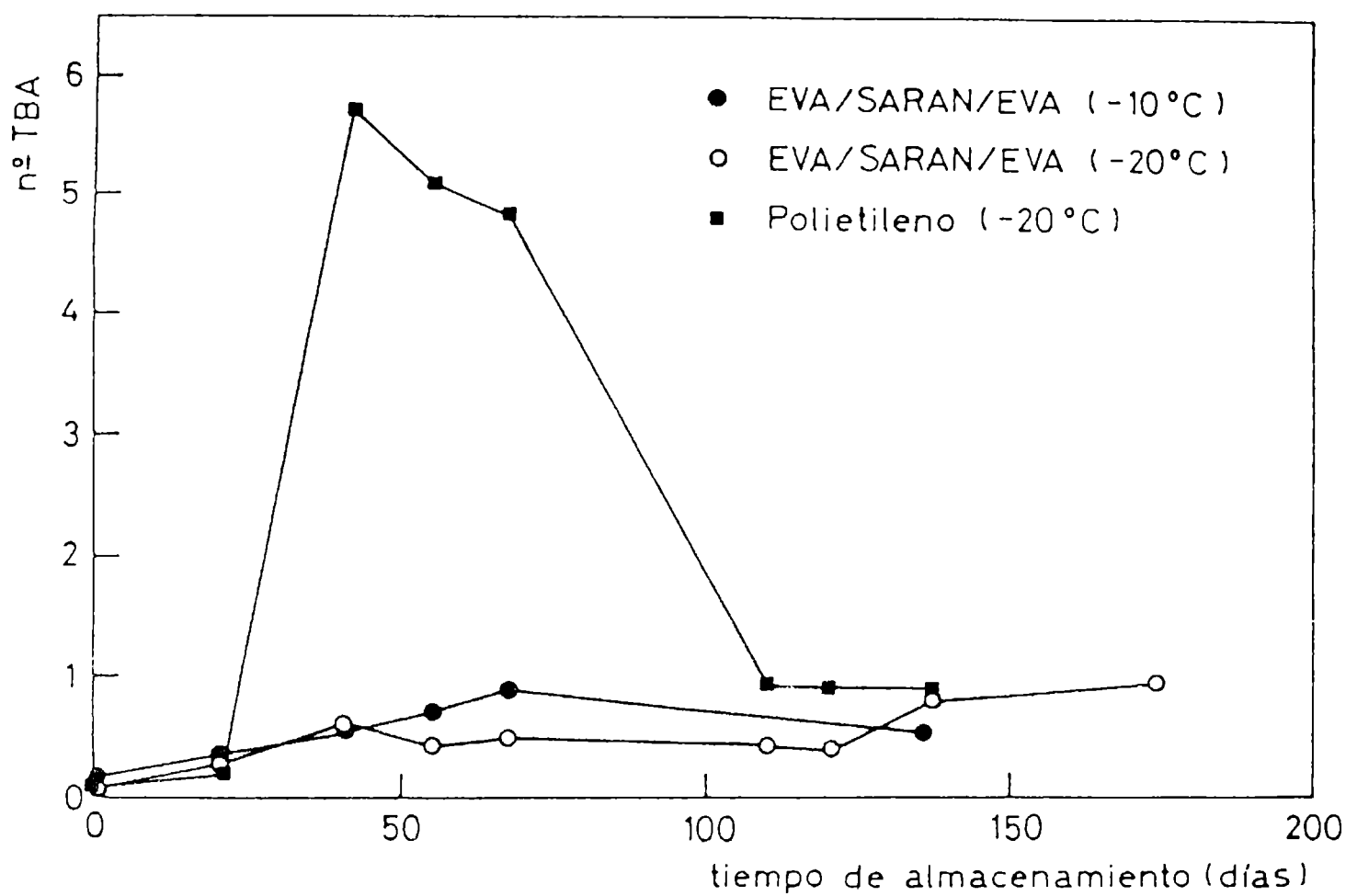


FIGURA 23 - Aplicación del ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para el seguimiento de la oxidación lipídica durante el almacenamiento congelado de tocino dorsal sin salar envasado en: (●) EVA/SARAN/EVA (T = -10°C); (○) EVA/SARAN/EVA (T = -20°C); (■) polietileno (T = -20°C). (n° TBA = mg MAL/kg de carne).

correlacionándose los resultados obtenidos con los correspondientes a la determinación del índice de peróxido.

Con respecto a las mediciones del índice de acidez, no se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la producción de ácidos grasos libres por hidrólisis (acción enzimática de lipasas) entre las muestras congeladas envasadas en polietileno y al vacío en EVA/SARAN/EVA (Fig. 24). Los valores de dicho índice -en ambos casos- se mantuvieron por debajo de 2 mg KOH/g grasa durante un período de 100 días de almacenamiento a -20°C .

La evaluación de las muestras de tocino (sin salar) -envasado con distintas películas-, se complementó con medidas de coloración superficial y recuentos microbianos a lo largo del almacenamiento congelado a las distintas temperaturas de trabajo.

No se registraron diferencias de coloración significativas ($P < 0,05$) durante el almacenamiento congelado de las muestras de tocino (sin salar) envasado en las distintas películas.

Las Figuras 25 a, b, y c muestran que los recuentos de microorganismos aerobios finales coinciden prácticamente con los iniciales, no produciéndose en ningún caso un desarrollo significativo de la flora microbiana ni registrándose modificaciones por efecto de la permeabilidad de las películas.

Los datos de coloración superficial y de recuentos microbianos fueron aportados por las Dras. M. Zamora y N.E. Zaritzky del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).

Estos resultados, en concordancia con los informados por otros autores (Slavin, 1968; Morris y Dawson, 1979; Karel, 1975),

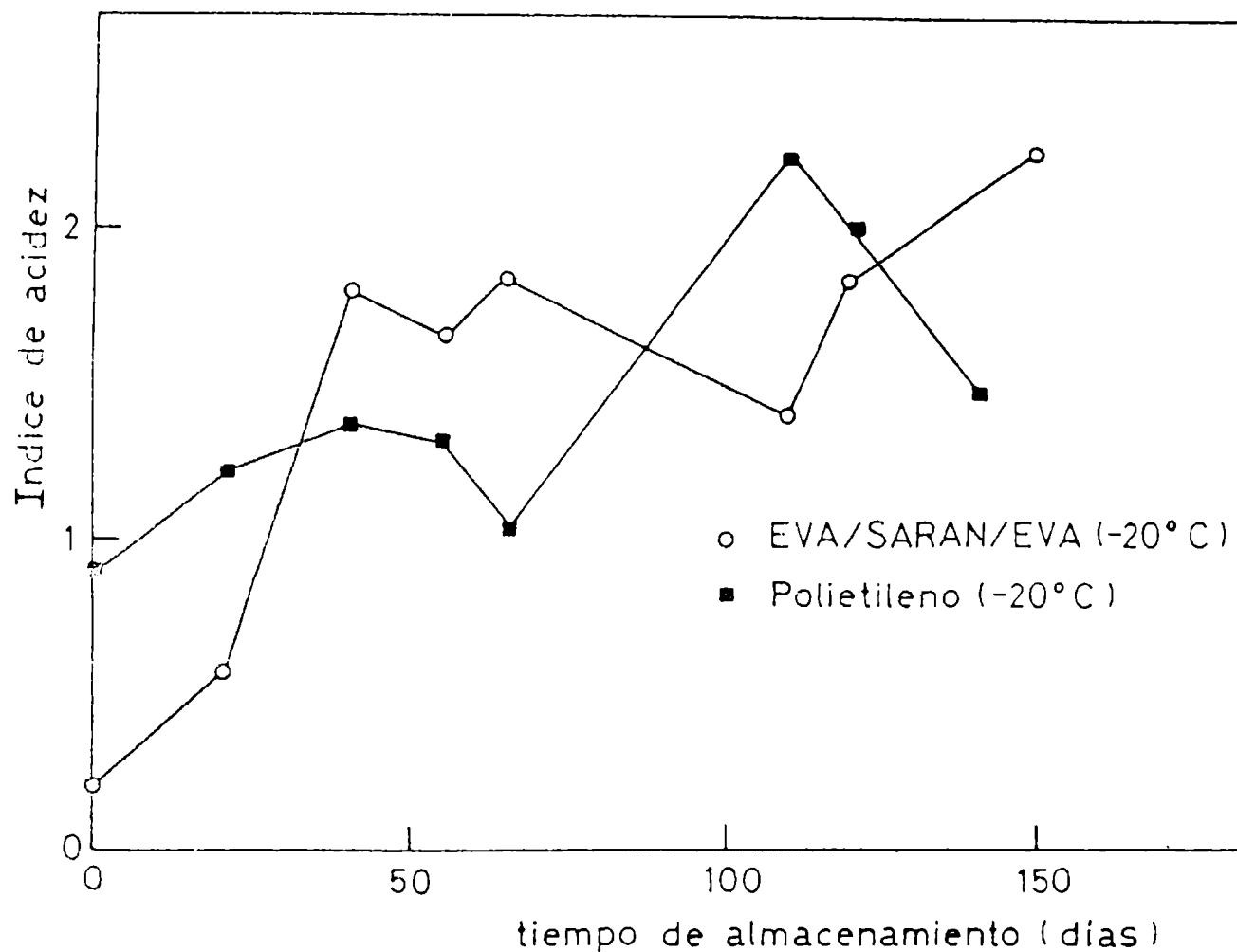
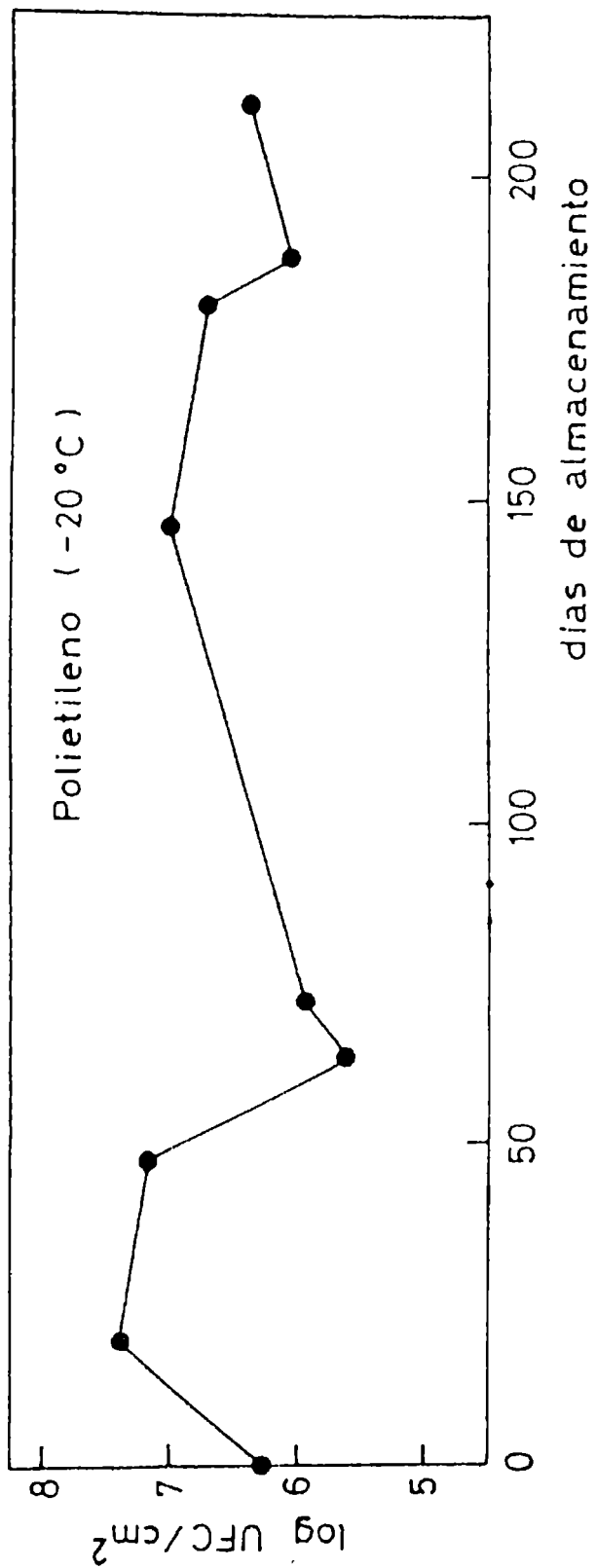


FIGURA 24 - Evolución del índice de acidez (mg KOH/g grasa) durante el almacenamiento a -20°C de tocino dorsal sin salar envasado en: (o) EVA/SARAN/EVA; (■) polietileno.



a

FIGURA 25 - Recuentos de microorganismos aeróbicos totales en tocino dorsal (sin salar) congelado, envasado en:

a) polietileno (T = -20°C)

UFC: unidades formadoras de colonias.

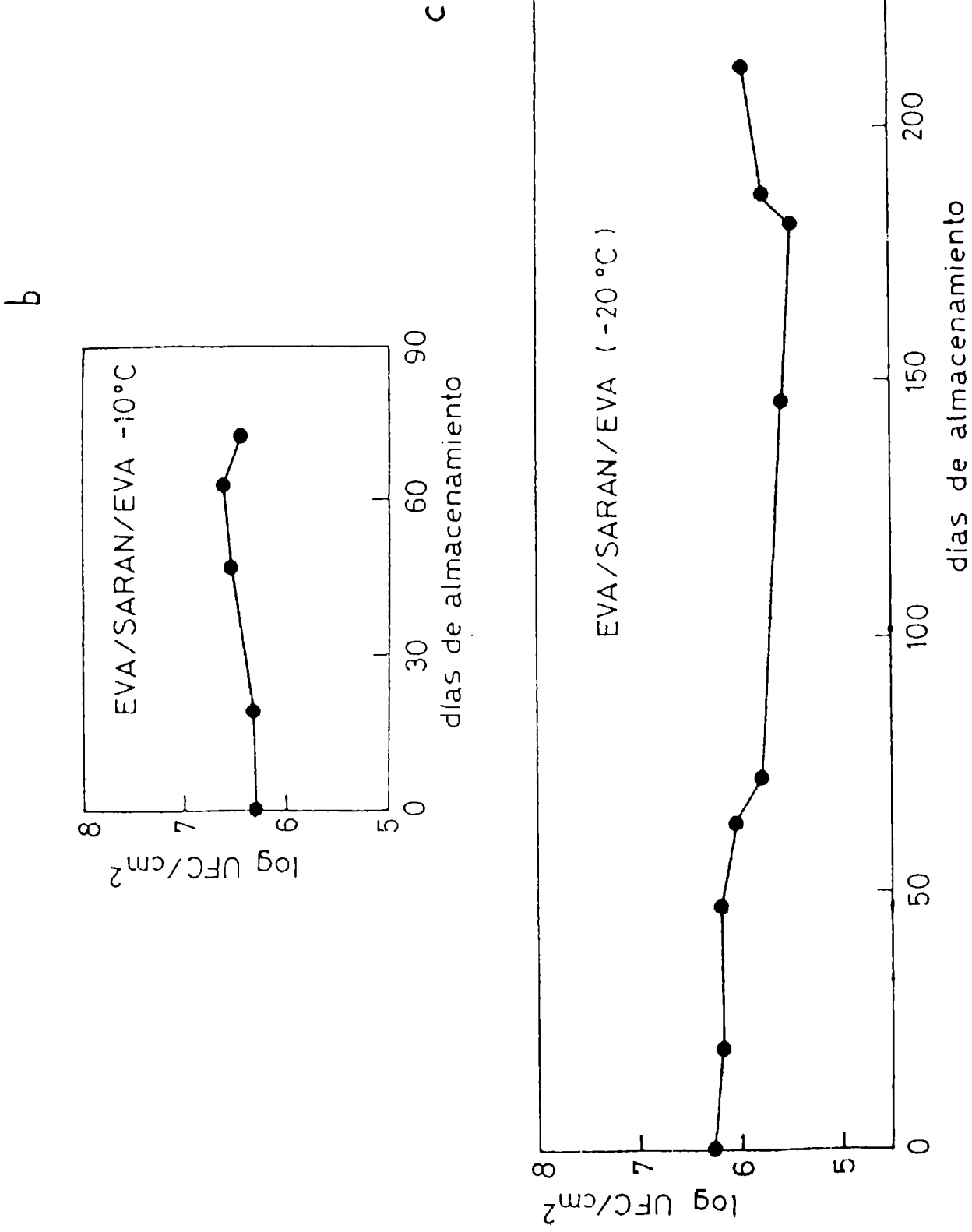


FIGURA 25 - Recuentos de microorganismos aeróbicos totales en tocino dorsal (sin salar) congelado, envasado en:
b) EVA/SARAN/EVA (T = -10°C) ; c) EVA/SARAN/EVA (T = -20°C). UFC: unidades formadoras de colonias.

mostraron claramente los efectos positivos de la exclusión de oxígeno y la utilidad del envasado al vacío -empleando para ello películas de baja permeabilidad al oxígeno- los que, combinados con las condiciones de almacenamiento ($T = -10$ y -20°C , respectivamente), permitieron minimizar o inhibir el desarrollo de rancidez oxidativa en los tejidos grasos empleados.

CAPITULO 5

OXIDACION LIPIDICA EN CARNES: INTERACCION LIPIDOS AUTOXIDADOS-PROTEINAS

5.1. CONSIDERACIONES GENERALES

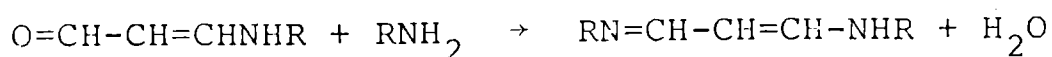
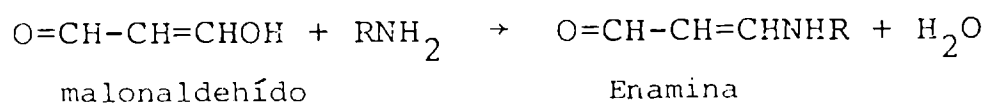
Dado que el proceso de rancidez oxidativa en carnes no sólo afecta a la fracción lipídica sino que extiende su influencia a otros constituyentes del alimento (proteínas, vitaminas, etc.), en cuanto a sus implicancias biológicas, la formación de complejos lípidos oxidados-proteínas sugiere -para algunos autores- la posibilidad que complejos similares puedan formarse bajo ciertas condiciones in vivo y también en tejidos de alimentos. Uno de los deterioros más frecuentemente observados por efecto de la peroxidación, se manifiesta en un aumento de la permeabilidad de las membranas celulares, eritrocitos y organelas (Karel, 1977).

En diversos estudios realizados en sistemas modelo se han obtenido evidencias de daños en la fracción proteica. Por ejemplo, enzimas con grupos sulfhidrilos son inactivadas; en tanto que otras proteínas se desnaturalizan, escinden, sufren polimerización o formación de complejos con productos provenientes de la oxidación (Matsushita, 1975; Zirlin y Karel, 1969; Kanner y Karel, 1976). Además, algunos aminoácidos sufren alteraciones pudiendo incluso ser destruidos, particularmente cistina, lisina, histidina, valina, fenilalanina y metionina, con la consiguiente pérdida de su valor biológico (Karel, 1977).

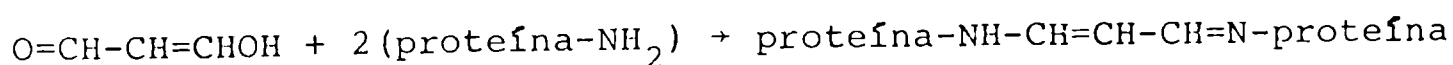
Generalmente, según se ha descripto previamente (Secc. 1.7.2. las interacciones entre lípidos autooxidados y proteínas pueden dividirse en dos categorías: 1) reacciones de proteínas con productos secundarios de la oxidación lipídica (aldehídos, cetonas, epóxidos, oximas y compuestos carbonílicos α, β -insaturados), lo cual lleva a la formación de complejos con o sin ocurrencia de

entrecruzamiento y 2) reacciones de proteínas con intermediarios de la oxidación lipídica (radicales libres e hidroperóxidos) dando como resultado radicales libres de naturaleza proteica, los que pueden sufrir reacciones de polimerización y fragmentación a posteriori.

Con respecto a las reacciones del primer tipo, se han realizado estudios especialmente con malonaldehído. Chio y Tappel (1969b) han propuesto un mecanismo que lleva a la formación de N,N'-1-amino-3-iminopropeno disustituido.



Esta reacción es la responsable de la formación de pigmentos fluorescentes y del entrecruzamiento de proteínas (Chio y Tappel, 1969a; Dillard y Tappel, 1971). El entrecruzamiento puede ocurrir de acuerdo a lo ejemplificado en la reacción:



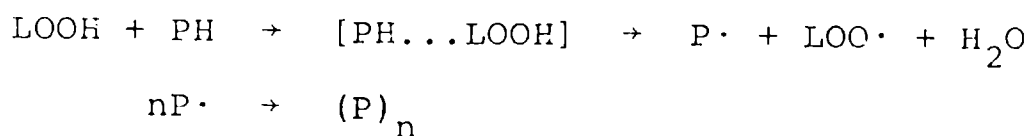
Braddock y Dugan (1973) observaron un aumento de los niveles de oxidación a través del ensayo de TBA, fluorescencia y pérdida de aminoácidos (Hys, Lys, Met) al hacer reaccionar miosina con productos de oxidación de linoleato de metilo.

Otros sistemas en los cuales fueron observados compuestos fluorescentes como resultado de interacciones lípidos peroxidados-

proteínas, están constituidos por sistemas modelo (Lípidos-Enzimas) (Leake y Karel, 1985).

En lo que se refiere a las reacciones entre las proteínas e intermediarios inestables de la oxidación lipídica (radicales libres, hidroperóxidos), las mismas han adquirido gran importancia debido al daño que producen sobre la fracción proteica, siendo el efecto similar al causado por el de las radiaciones ionizantes (Karel y col., 1975).

El mecanismo de polimerización de proteínas expuestas a lípidos peroxidados propuesto (Karel y col., 1975; Matsushita, 1975) sin la incorporación de fragmentos de origen lipídico puede verse en la reacción:



donde:

PH = proteína

L = lípido.

La polimerización de proteínas, causada como consecuencia de este tipo de reacciones, ha sido registrada en una variedad de sistemas constituidos por tejidos animales y vegetales, manifestándose el deterioro por ejemplo a través de la pérdida de solubilidad.

Esta pérdida de solubilidad puede originarse por: a) formación de complejos lípido-proteína, b) agregación proteica iniciada por reacciones de radicales libres con lípidos o c) reacciones con productos de descomposición de lípidos (Scaich y Karel,

1975; Karel, 1977).

Estudios realizados por Jarenbäck y Liljemark (1975) en músculo de pescado (bacalao), dan cuenta de la pérdida de solubilidad en complejos lípido-proteína debido a la oxidación lipídica.

Kanner y Karel (1976); Funes y col. (1980 y 1982); Funes y Karel (1981), estudiaron distintos aspectos y condiciones de la reacción entre lisozima y productos de autooxidación de linoleato de metilo peroxidado a 37°C en un sistema modelo liofilizado. Se estudiaron cambios en la solubilidad, fluorescencia, actividad enzimática y perfil electroforético de la fracción proteica, los cuales se compararon con los cambios en lisozima irradiada con rayos γ en ausencia de linoleato de metilo. Los resultados obtenidos revelaron un marcado entrecruzamiento de lisozima, especialmente a altos niveles de actividad acuosa. La polimerización en este caso, parece ser un proceso gradual que procede desde el monómero al dímero y luego hacia polímeros mayores.

5.2. EFECTO DE LA OXIDACION LIPIDICA SOBRE LAS PROTEINAS

MIOFIBRILARES DE MUSCULO BOVINO

Puesto que en la carne coexisten lípidos y proteínas y considerando que -de acuerdo a lo expresado en capítulos anteriores- durante su almacenamiento ocurre oxidación lipídica, nuestro objetivo fue evaluar los daños registrados en la fracción proteica mediante la realización de un test acelerado.

Así, hemos trabajado con proteínas miofibrilares de músculo de carne vacuna las que representan el 50% del total de proteí-

nas de la carne, poniéndolas en contacto con lípidos de la misma especie (1:1) -peroxidados o no- a una temperatura $T = (25 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante un lapso determinado, condiciones necesarias para favorecer el desarrollo del proceso de autoxidación. De esta manera, se logró una aproximación a un sistema más real pero menos complejo que el músculo bovino como tal.

En base a lo expuesto, se peroxidaron lípidos de músculo de carne vacuna. Para ello, se incubaron dichos compuestos en un baño de agua con agitación a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, según se ha detallado en la Sección 2.12. A fin de constatar la ocurrencia de la oxidación de lípidos, se determinó el número de TBA en función del tiempo de incubación, lo que se observa en la Tabla 16.

TABLA 16: Peroxidación de lípidos de músculo semitendinoso bovino

tiempo de incubación (hs.)	número TBA (control)	número TBA sistema con lípidos
0	---	206,4
21	---	239,0
43	---	265,0
48	---	292,6

- número TBA = mg MAL/Kg lípidos. Ensayo de TBA según la técnica de Matsushita modificada

- Cada valor surge del promedio de dos determinaciones

Al registrarse un incremento en el nivel de oxidación respecto de su valor inicial al cabo de 48 hs., se prepararon los distintos sistemas: (M_4) , (M_{25}) , $(M+L)$, $(M+L)_{N_2}$ y $(M+Per)$, tal como se ha indicado en la Sección 2.16.

Los sistemas (M₄) y (M₂₅) representaron sistemas control constituidos por miofibrillas almacenadas a 4°C y 25°C, respectivamente; el sistema (M+Per), se formuló incorporando proteínas miofibrilares y productos provenientes de la peroxidación lipídica y los sistemas designados como (M+L), se conformaron a través de miofibrillas y lípidos que no habían sufrido oxidación previa.

Posteriormente, se desarrolló la etapa de incubación de los sistemas en atmósfera de aire o nitrógeno, efectuándose además, las respectivas tomas de muestra, según lo señalado en la Sección 2.16.

Durante el transcurso de las experiencias realizadas, se siguió la evolución de la oxidación lipídica mediante la determinación del número de TBA en función del tiempo de incubación sobre los sistemas (M+L), (M+L)_{N₂} y (M+Per), lo cual puede observarse en la Tabla 17. En la misma, podemos notar un aumento sustancial del número de TBA en función del tiempo de incubación en los sistemas que contienen miofibrillas y lípidos no oxidados previamente. El mismo se registra en las primeras 10 hs. de incubación, disminuyendo luego a un nivel cercano al triple de su valor inicial.

Similar evolución se observa en el sistema constituido por miofibrillas y lípidos incubados en atmósfera de nitrógeno. Este hecho sugeriría, en forma preliminar, una leve incidencia de dicha atmósfera en lo que se refiere a minimizar el desarrollo de la autooxidación para las condiciones de tratamiento empleadas, debido probablemente además a una incompleta eliminación del oxígeno.

TABLA 17: Evolución del número TBA en función del tiempo de incubación a $T = (25 \pm 2)^\circ\text{C}$ para distintos sistemas.

t (hs.)	número TBA (M+L)	número TBA (M+L) N_2	número TBA (M+Per)
0	58,8	113,6	186,6
5	215,1	513,4	210,9
10	320,0	443,9	205,8
15	282,2	393,3	217,7
23	198,9	364,1	169,7
28	167,9	357,9	181,8

- número TBA = mg MAL/Kg lípidos. Ensayo de TBA según la técnica de Matsushita modificada

- Cada valor surge del promedio de dos determinaciones

Para el sistema (M+Per), observamos un nivel de oxidación inicial superior al detectado en los demás sistemas, lo cual es lógico dado que la formulación de dicho sistema involucra la presencia de lípidos peroxidados. A continuación, se registró un ligero aumento del nivel de oxidación, el cual se mantiene aproximadamente constante hasta la finalización de la experiencia.

El hecho de que el sistema (M+Per) no registra un incremento de la oxidación lipídica tan acentuado como los otros sistemas, está relacionado con los diferentes niveles de oxidación iniciales y con la capacidad intrínseca del mismo de proseguir oxidándose. Por lo tanto, es probable que en el caso de la experiencia descripta nos encontremos en la zona correspondiente al máximo

de oxidación para este sistema.

A continuación, las miofibrillas presentes en cada uno de los sistemas, fueron estudiadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% después de haber sido tratadas con dodecil sulfato de sodio (SDS) o con dodecil sulfato de sodio y mercaptoetanol (SDS+ME).

El tratamiento con SDS y urea -provenientes del buffer de muestra Urea 8 M SDS 0,3%- rompe las uniones hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas polipeptídicas; esto posibilita que tanto las cadenas pesadas y livianas de miosina y proteínas menores como las unidades monoméricas de actina (G-actina) puedan ingresar al gel de poliacrilamida. Adicionalmente, el SDS ejerce la función de cargar negativamente las cadenas proteicas en una relación carga/masa constante, por lo cual las mismas migran hacia el ánodo recorriendo distancias proporcionales a su peso molecular.

El tratamiento con mercaptoetanol (ME) tiene como consecuencia la ruptura de los puentes disulfuro (-S-S-) que existan en la estructura proteica.

A partir de los diagramas electroforéticos correspondientes a los sistemas (M_4) y (M_{25}), pudo visualizarse el perfil típico de las miofibrillas cuyas bandas concuerdan con datos de literatura (Wagner y Añón, 1986b; Porzio y Pearson, 1977; Hay y col., 1973) (Tabla 18). Se ha registrado además, una buena correlación entre los diagramas obtenidos para ambos sistemas control a 4 y 25°C, respectivamente desde el tiempo inicial hasta alrededor de 23 horas de incubación.

TABLA 18: Identificación de proteínas miofibrilares por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS 10%.

Banda	Proteína	PM
1	Línea M β	160.000
2	Proteína C	136.000
3	α -actinina	112.000
4	No identificada	entre 60.000 y 85.000
5	Actina	43.000
6	Troponina T	38.000
7	Tropomiosina	32.000
8	Troponina I	24.000
9	Cadena miosina liviana 2	17.000
10	Cadena miosina liviana 3	15.000

En lo que se refiere al sistema (M+L) tratado con SDS y ME, inicialmente se observa un perfil electroforético similar al del sistema control (M₂₅); luego, al cabo de 15 horas comienzan a incrementarse bandas en las zonas de bajo peso molecular (≈ 24.000). También se registra un aumento de las bandas correspondientes a especies proteicas de peso molecular 36.000 - 40.000. La contribución de las especies proteicas mencionadas, se hizo más notoria alrededor de las 23 horas de incubación (Fig. 26). Este hecho puede correlacionarse con la evolución de la oxidación lipídica para el sistema en estudio, el cual presentó -en dicho estado-

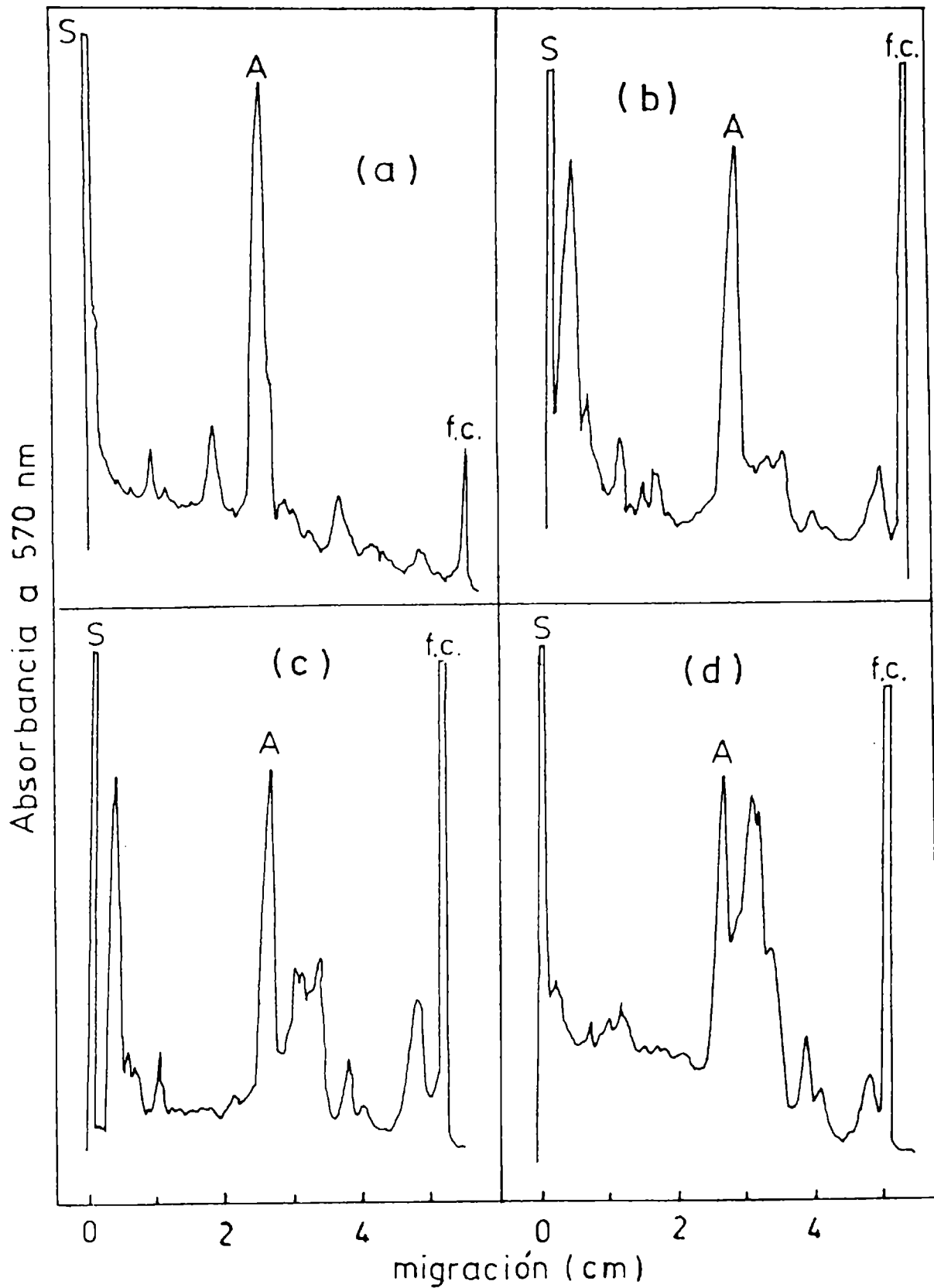


FIGURA 26 - Densitogramas de las electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de distintos sistemas incubados a 25°C: a) miofibrillas control (M_{25}) ($t=0$); b) sistema constituido por miofibrillas y lípidos de músculo semitendinoso bovino (M+L) ($t=10$ hs.); c) (M+L) ($t=15$ hs.); d) (M+L) ($t=23$ hs.). Las muestras fueron tratadas con SDS+ME. S: punto de siembra; A: actina; f.c.: frente del colorante.

un nivel de oxidación 3 ó 4 veces mayor que el inicial (Tabla 17), pudiendo asociarse las modificaciones comentadas con la ocurrencia de proteólisis.

En cuanto al sistema $(M+L)_{N_2}$ con idéntico tratamiento que el anterior, se registran cambios similares a los comentados aunque de menor intensidad que para el sistema (M+L) desde las 15 a las 28 horas de incubación (Fig. 27). Esto estaría relacionado con un ligero efecto protector de la atmósfera de nitrógeno sobre la interacción lípidos oxidados-proteínas, dado que el nivel de oxidación de ese período es del orden de 3-4 veces de su valor inicial.

A su vez, cabe tener en cuenta que la disminución de los valores del número de TBA detectada para los sistemas (M+L) y $(M+L)_{N_2}$ hacia las 23 horas de incubación a 25°C, implica una mayor importancia relativa de las reacciones de consumo de los productos de la oxidación lipídica, entre ellas su interacción con las proteínas del medio.

El análisis de los densitogramas obtenidos para el sistema (M+Per) aporta una interesante información. En este caso, alrededor de las 10 horas de incubación a $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ ya se observa un aumento de las bandas correspondientes a pesos moleculares del orden de $(36 - 40)10^3$, como también de especies proteicas de menor PM $(23 - 25)10^3$. Posteriormente, al progresar la incubación y con ello la posibilidad de interacción entre lípidos peroxidados y proteínas, se visualizan cambios más acentuados en el perfil no sólo en los rangos anteriormente mencionados, sino que además aparecen en forma notoria especies proteicas de PM mayores

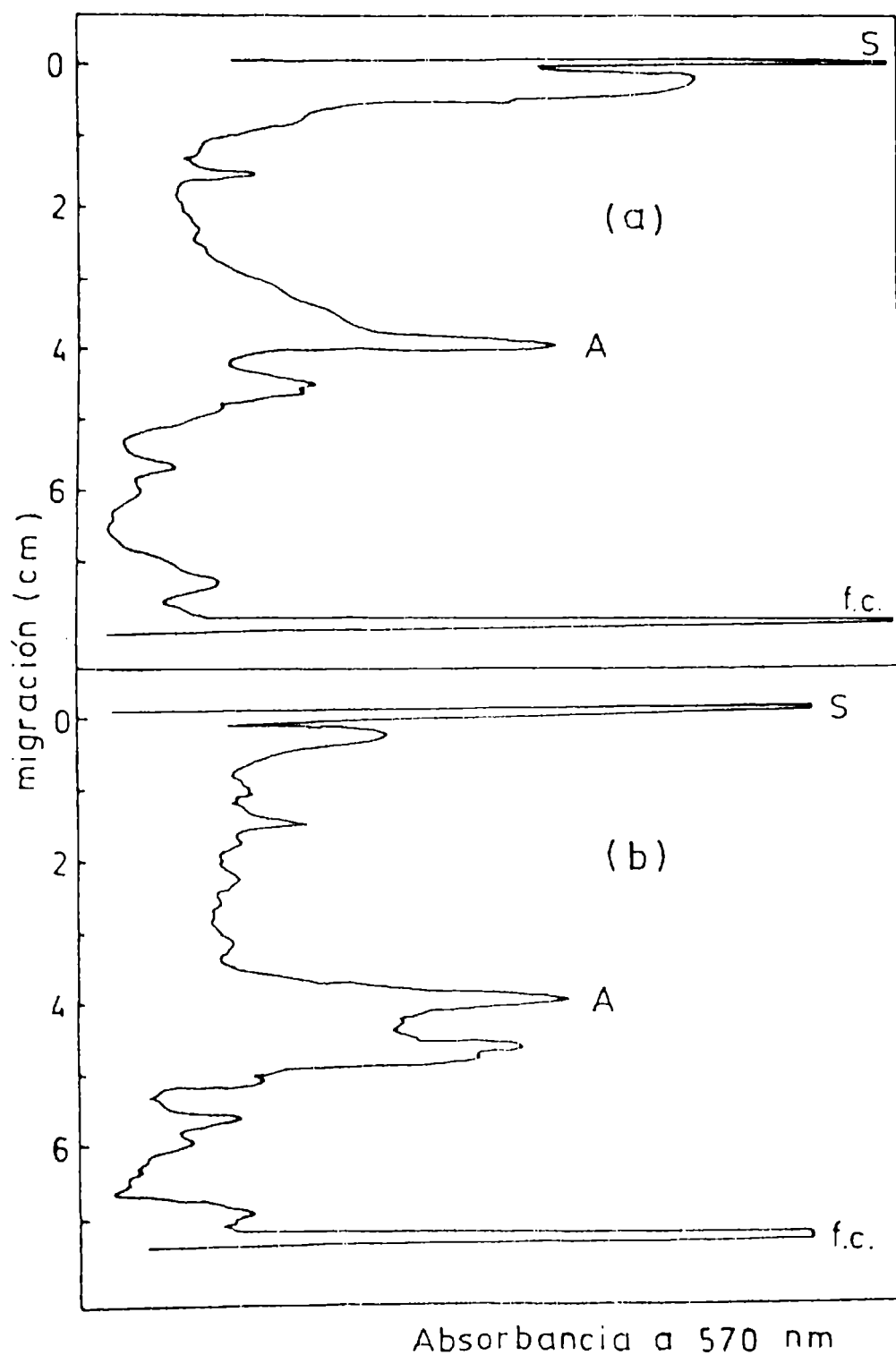


FIGURA 27 - Densitogramas de las electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS: a) sistema constituido por miofibrillas y lípidos de músculo semitendinoso bovino incubados a 25°C en atmósfera de nitrógeno $(M+L)_{N_2}$ (t = 15 hs.); b) $(M+L)_{N_2}$ (t = 28 hs.) Las muestras fueron tratadas con SDS+ME. S: punto de siembra; A; actina; f.c.: frente del colorante.

(75.000 - 90.000) (Fig. 28). En estas últimas, estarían involucrados enlaces de tipo covalente excluyendo puentes disulfuro (-S-S-), ya que dichas bandas aún aparecen con el tratamiento de agentes disociantes como lo son el SDS y la urea. Estos hechos pueden ser explicados sobre la base de que el sistema (M+Per) presentó, desde el comienzo y a lo largo de toda la experiencia, un nivel de oxidación lipídica considerablemente mayor que los otros dos sistemas en estudio, lo cual puede traducirse en una mayor disponibilidad de especies lipídicas activas necesarias para inducir las alteraciones registradas en el sistema poliproteico que nos ocupa.

El estudio del comportamiento electroforético de las proteínas miofibrilares tratadas sólo con SDS, aportó una correlación aceptable entre los sistemas de miofibrillas control incubadas a 4 y 25°C, respectivamente desde $t = 0$ hacia alrededor de $t = 23$ hs., registrándose hacia las 28 horas algunas alteraciones en la zona de altos PM debidas principalmente a efecto térmico.

Analizando la evolución del sistema (M+Per) se observó, luego de 10 horas de incubación, una disminución en el pico correspondiente a actina. Conjuntamente con este hecho, se detectó la aparición de formas proteicas de mayor PM luego de 23 horas de experiencia, resultando dichas modificaciones muy notorias al cabo de 28 horas de incubación a $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ (Fig. 29).

Si bien es necesario tener en cuenta según se ha señalado previamente la incidencia de la temperatura a tiempos prolongados de interacción, conviene remarcar el hecho del nivel de oxidación considerable existente en el sistema (M+Per) para el estado que

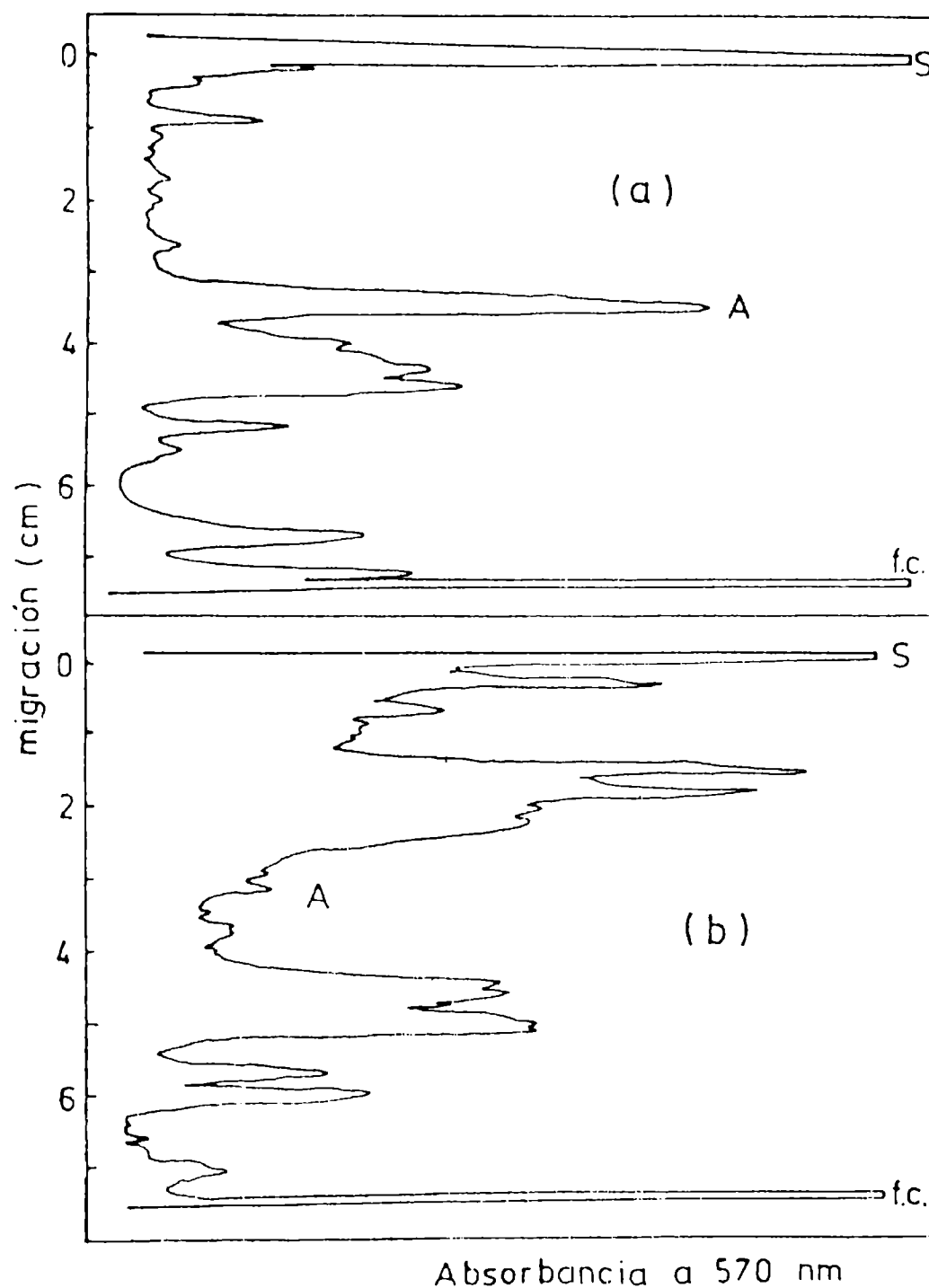


FIGURA 28 - Densitogramas de las electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS: a) sistema constituido por miofibrillas y productos provenientes de la peroxidación lipídica de músculo semitendinoso bovino incubados a 25°C (M+Per) (t = 10 hs.); b) (M+Per) (t = 28 hs.). Las muestras fueron tratadas con SDS+ME. S: punto de siembra; A: actina; f.c.: frente del colorante.

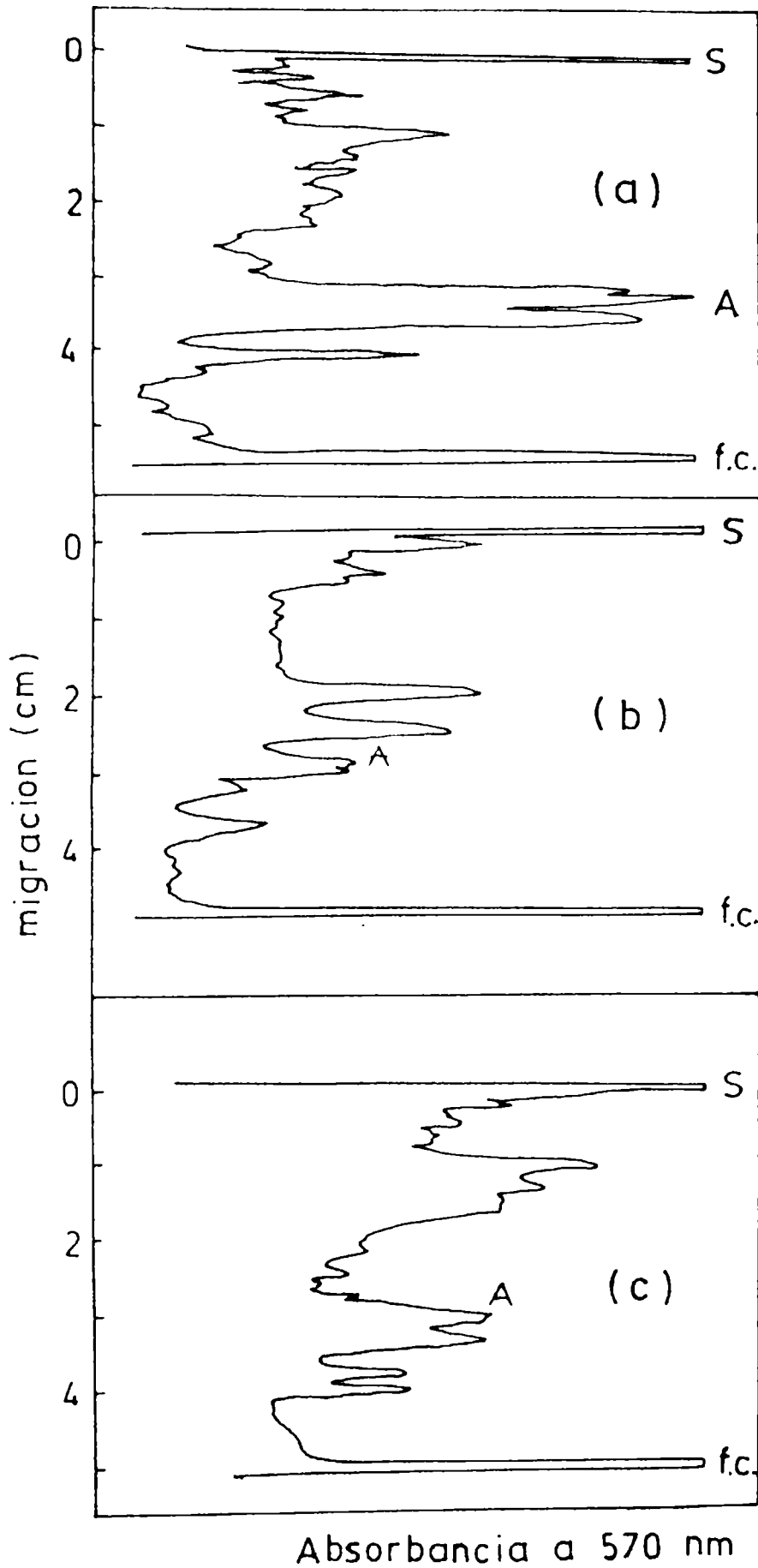


FIGURA 29 - Densitogramas de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS: a) sistema constituido por miofibrillas y productos provenientes de la peroxidación lipídica (M+Per) (t=10 hs.); b) (M+Per) (t = 23 hs.); c) (M+Per) (t = 28 hs.). S: punto de siembra; A: actina; f.c.: frente del colorante.

nos ocupa. Por lo tanto, podría considerarse un efecto sinérgico de la temperatura-nivel de oxidación como responsables de la mayor concentración de los agregados de mayor PM mencionados.

Dichos agregados involucrarían en un comienzo uniones por puentes disulfuro (-S-S-) estando probablemente comprometida actina, ya que dicha proteína está presente en los diagramas electroforéticos del sistema tratado con SDS+ME y en cambio, disminuye mucho en los tratados solamente con SDS. Hacia el final de la incubación (t = 28 hs.), ambos diagramas (SDS con o sin ME) reflejan la presencia de agregados de mayor PM por lo que -en este caso- la naturaleza de las uniones sería de tipo covalente, exceptuando las uniones disulfuro.

Cabe señalar, que la formación de agregados registrada en el sistema (M+Per) fue más pronunciada que en el sistema (M+L). Esto está relacionado con la potencialidad del sistema compuesto por lípidos peroxidados para promover los cambios citados en el perfil proteico con mayor antelación e intensidad que en el caso del sistema (M+L).

En el caso del sistema (M+L)_{N₂}, su evolución no arrojó cambios de importancia, lo cual es lógico esperar en función de los resultados obtenidos para el sistema (M+L) y en forma adicional por el efecto protector atribuible a la atmósfera de nitrógeno.

La aparición de agregados de mayor peso molecular plantea algunas hipótesis, tales como que los mismos se originen mediante el reordenamiento y asociación de especies de menor PM -producidas por fragmentación como consecuencia de la oxidación lipídica- o bien que los mismos constituyan nuevas especies que surjan como producto directo de la interacción lípidos autooxidados-proteínas.

Teniendo en cuenta los datos de literatura para sistemas modelo (Funes y Karel, 1984; Nakhost y Karel, 1983) y de acuerdo a los distintos mecanismos de interacción lípido autooxidados-proteínas explicitados en la Sección 5.1., las alteraciones registradas sobre la fracción proteica miofibrilar se refieren a ese contexto. Por otra parte, es muy importante remarcar la complejidad del sistema de trabajo abordado, dada su naturaleza poliproteica.

Las evidencias registradas en la experiencia realizada, tales como la formación de agregados de mayor peso molecular y las fragmentaciones provocadas en el sistema, indican la ocurrencia de procesos de interacción lípidos oxidados-proteínas. No obstante, en virtud de las características del sistema anteriormente citadas, es sumamente difícil establecer cuál es el mecanismo predominante en el proceso que nos ocupa, lo que marca futuras instancias para lograr su dilucidación.

En base a todo lo expuesto, considerando los resultados obtenidos a través del test acelerado efectuado y proyectándolo al tejido cárneo almacenado al estado congelado, es dable esperar que la producción de procesos de autooxidación lipídica en una extensión considerable ejerza su influencia -tal como lo planteábamos al comienzo del capítulo- no sólo sobre la porción lipídica sino a su vez produciendo alteraciones importantes sobre distintas especies de la fracción proteica con el consiguiente daño en sus cualidades nutricionales, organolépticas y funcionales.

ASPECTOS SIGNIFICATIVOS DEL EFECTO DE LAS BAJAS TEMPERATURAS
SOBRE LA OXIDACION LIPIDICA EN CARNES.

Acorde con el objetivo central de este trabajo sobre la evolución de la oxidación lipídica en carnes almacenadas, gran parte del mismo tuvo como propósito la implementación y optimización de un método de evaluación del proceso sobre un nuevo sistema de estudio.

En función de las diversas formas y procedimientos preexistentes para llevar a cabo el ensayo de TBA (directamente sobre el alimento, sobre un extracto del mismo o bien sobre una fracción del destilado por arrastre por vapor), su aplicación sobre el exudado desproteínizado proveniente de la carne, introduce una alternativa con características promisorias.

Sin embargo, como toda opción presenta limitaciones en la extensión de su aplicación, ya que el hecho de que el sustrato -por su estructura física y composición química- sea capaz de rendir su contenido de exudado, se convierte en una de ellas. Por ejemplo, en el caso de tocino (sin salar) no fue posible aplicar esta metodología por las características del alimento. No obstante, en los casos en que sea viable, el exudado ofrece como aporte el constituir una parte natural del tejido representativa de sus componentes hidrosolubles, siendo a la vez un sistema más simple que brinda una mayor facilidad para su estudio.

Evidentemente el MAL determinado en el exudado no es el total del MAL producido por los procesos oxidativos; este dialdehído y otros compuestos carbonílicos se producen a través de las reacciones de descomposición de los hidroperóxidos, de manera tal que su concentración va aumentando paulatinamente pero, a medida que estos compuestos carbonílicos se van produciendo, se distribu

yen y difunden a través de las distintas fases del alimento, pudiendo entonces entrar en contacto con otros componentes de la carne con los cuales pueden reaccionar. Estas últimas reacciones, que son de gran importancia por las consecuencias nutricionales, organolépticas y funcionales, ocurren principalmente con las proteínas a través de las reacciones de condensación, pudiendo originar complejos de proteína-lípido. Es a través de estas reacciones que el contenido de MAL libre disminuye de forma tal que, cuando las mismas resultan ser más importantes que las reacciones de producción, la concentración neta de MAL libre decrece tal como se observó en el pescado congelado.

La interacción entre MAL y otros componentes fue puesta de manifiesto mediante ensayos de recuperación de MAL agregado al exudado, el cual disminuyó sensiblemente de 80,7 (t = 0 día) a 54,5% (t = 1 día). En este caso, el MAL agregado se combinó muy probablemente con las proteínas presentes en el exudado disminuyendo por lo tanto el MAL libre determinable. En lo que se refiere a la carne es posible una interacción más compleja aún, por la existencia de otro tipo de proteínas además de aquellas presentes en el exudado.

No descartamos tampoco la posibilidad que la microflora, especialmente en el caso de carnes refrigeradas, pudiera haber influido en alguna medida en el nivel medible de MAL.

De esta manera, podría explicarse el bajo rendimiento del MAL recuperado en carnes inyectadas, como así también las diferencias observadas entre los días 0 y 1. Esto confirmaría la necesidad de conocer dichos factores de recuperación a fin de

poder determinar los niveles reales de MAL en la carne almacenada (tanto el MAL libre como el combinado). Aparte de estas causas estrictamente químicas, esa baja recuperación puede deberse también a variaciones en el rendimiento de exudado.

Ahora bien, analizando las metodologías empleadas -el método tradicional de Tarladgis para determinar MAL (en medio ácido 90%) y el método de Matsushita modificado (buffer pH = 3,6)-, hemos llegado a la conclusión que éste último si bien es menos sensible es más específico. Decimos esto último, debido a los barridos espectrofotométricos de las soluciones resultantes de la aplicación de ambos métodos y de las experiencias de comparación (exudado versus destilado). Aplicando el método de Matsushita modificado al exudado desproteínizado, se obtienen resultados sistemáticamente inferiores a los obtenidos por la técnica de Tarladgis al destilado, aunque con la misma evolución. La obtención de valores inferiores en el caso del exudado pueden ser explicados en base a la ausencia de reacciones de oxidación que pueden ocurrir en el balón durante la destilación misma.

De acuerdo con la naturaleza de los procesos de refrigeración y congelación (la temperatura y tiempo de almacenamiento) a los que fueron sometidas las carnes, se confirmó la menor incidencia de la oxidación lipídica prevista para el caso de las carnes refrigeradas. Este hecho está relacionado con la temperatura del proceso y con la mayor ocurrencia de alteraciones deteriorativas de origen microbiano, las cuales limitan el período de vida útil de las carnes mucho antes que puedan manifestarse alteraciones de tipo oxidativo.

Además, cabe señalar a fines de comparación que luego de cuatro meses de almacenamiento congelado a -5°C para carne vacuna, el nivel de oxidación -medido a través del número de TBA- fue similar al obtenido al cabo de diez días a 4°C . Paralelamente, el nivel de oxidación para salmón congelado (pescado graso) almacenado a -20°C al cabo de 18 semanas, aún resultó menor que el detectado para la misma especie al cabo de un mes de almacenamiento congelado a -5°C . Todo esto refuerza nuevamente la importancia de la temperatura de almacenamiento en los procesos de oxidación, lo cual se ensambla con datos de literatura sobre la vida útil de varias especies de pescado (Labuza, 1982). Así, a través de la evaluación organoléptica sobre el "flavor" o cambios de textura, se expone la dependencia del Q_{10} con las especies según su contenido graso, siendo mayor para el caso de los pescados grasos.

En el caso de las carnes vacunas refrigeradas, pudo observarse el continuo aumento de la concentración de sustancias reactivas al TBA (MAL) a lo largo del almacenamiento.

Con respecto a las carnes congeladas almacenadas, las de pollo y bovino no presentaron un aumento sustancial de la oxidación pero en el caso de pescado congelado, se registró un gran incremento y descenso posterior en la concentración de MAL, comportamiento típico observado en este tipo de procesos oxidativos (Deng y col., 1977; Tarladgis y Watts, 1960).

Así, pudo detectarse una evolución diferencial para las diversas especies almacenadas a la misma temperatura (-5°C), lo cual está relacionado con su distinta susceptibilidad a la auto

oxidación lipídica originada en diferencias en su composición acídica, contenido en sustancias antioxidantes (α -tocoferol), sustancias prooxidantes, mioglobina, etc.

En base a los argumentos expuestos, hemos evaluado como factible el seguimiento de la oxidación lipídica a través del ensayo de TBA practicado sobre exudados desproteinizados provenientes de carnes de las diversas especies estudiadas.

En cuanto a la velocidad de congelación, nuestros resultados indican que este parámetro no ejercería neta influencia sobre el desarrollo de la rancidez oxidativa en carnes de pollo y pescado (salmón de mar). No obstante, dada la incidencia del mismo a nivel histológico y sobre la desnaturalización de proteínas (Love, 1966; Wagner y Añón, 1985), la conclusión sería trabajar a velocidades de congelación rápidas a fin de no introducir daños con consecuencias negativas en la calidad final del alimento.

Por otra parte, en alimentos de muy alto contenido graso resultó ser muy conveniente la implementación de un método combinado de conservación considerando por un lado el almacenamiento congelado a distintas temperaturas y por otro, el envasado al vacío empleando películas plásticas flexibles.

Así, trabajando tanto a -10 como a -20°C y envasando al vacío con película EVA/SARAN/EVA, se logró inhibir o minimizar el deterioro que de otra forma sufrirían muestras de tocino (sin salar), sin alterarse factores como coloración superficial y estabilidad microbiológica por el término de 6 meses.

Con respecto al tema interacción lípidos autooxidados-proteínas, el mismo tiene gran importancia desde el punto de vista nutricional debido a las implicancias que reviste, según lo comentado en la sección 5.2.

Cabe señalar que a pesar de sus limitaciones, el empleo de un test acelerado (temperatura de incubación-tiempo) permitió la obtención de información sobre la evolución de los sistemas de estudio con mayor antelación que su desarrollo en condiciones reales. Esto puede comprobarse considerando el tenor de oxidación lipídica registrado para alguno de dichos sistemas a través del número de TBA (\cong 300 mg MAL/Kg grasa) al cabo de 15 hs. a 25°C, respecto de los niveles de rancidez oxidativa correspondientes a carne vacuna congelada almacenada 15 semanas a -5°C (\cong 0,2 mg MAL/Kg carne) (Tabla 17 y Fig. 18, respectivamente).

Además, los distintos sistemas analizados (M_4), (M_{25}), (M+L) y (M+Per), si bien entrarían en la categoría de sistemas modelo, presentan un nivel de complejidad e interacción mayor que estos últimos, dada su naturaleza poliproteica. Este hecho brinda como aspecto positivo una mayor representatividad, es decir un mayor acercamiento a la realidad sin incluir las dificultades que presupone el estudio del músculo bovino tal cual.

Así, analizando el comportamiento exhibido por distintos sistemas constituidos por proteínas miofibrilares y lípidos de músculo semitendinoso bovino -con distintos niveles de oxidación- incubados a 25°C, pudieron registrarse una serie de cambios en el perfil electroforético de los mismos tales como: aumento de la concentración de especies proteicas (PM \cong 24.000) producido

posiblemente por efecto de proteólisis; aumento de la concentración de especies proteicas (PM \approx 36.000 - 40.000) y disminución del pico de actina (PM \approx 43.000) con la consecuente aparición de agregados de PM mayores (75.000 - 90.000), especialmente en sistemas con lípidos peroxidados luego de un tiempo considerable de interacción. A partir del tratamiento realizado con SDS y urea -ambos agentes disociantes- y con mercaptoetanol (agente reductor), pudo inferirse que la naturaleza de enlaces involucrados en dichos agregados implicaría, en primera instancia, un cierto número de puentes disulfuro (-S-S-) predominando los de tipo covalente a medida que se incrementa el tiempo de incubación.

Paralelamente, la incubación en atmósfera de nitrógeno -en este caso- aportó un ligero efecto protector sobre la oxidación lipídica, debido probablemente en parte a una incompleta exclusión del oxígeno del sistema. Complementando la información disponible y realizando una extrapolación al sistema real objeto de nuestro estudio (carne almacenada al estado congelado), la evidencia de las alteraciones comentadas sobre la fracción proteica requeriría un cierto tiempo para que el desarrollo de la rancidez oxidativa alcance un nivel y extensión considerable, constituyendo la misma un factor limitante en lo que hace a la calidad del producto.

En función de todo lo expresado, es importante entonces el estudio de este tipo de interacción sobre la base de las alteraciones o daños registrados sobre la fracción proteica de la carne, como así también sobre los diversos factores que gobiernan su manifestación que en suma, son los que ejercen su influencia sobre

el desarrollo de los procesos oxidativos tratados en el presente trabajo de tesis.

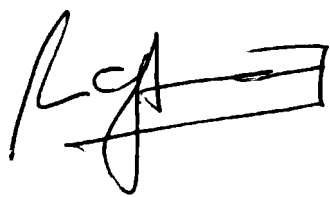
CONCLUSIONES

- El exudado desproteínizado proveniente de carnes refrigeradas y congeladas constituye una nueva opción para el seguimiento de la oxidación lipídica en función del tiempo de almacenamiento a través del ensayo de TBA.
- En la evaluación de la oxidación lipídica mediante el ensayo de TBA, el método de Matsushita modificado es más específico que el método de Tarladgis en su aplicación a exudados desproteínizados de carnes refrigeradas y congeladas. Por otra parte, el método de Tarladgis es más sensible que el de Matsushita modificado en su empleo sobre destilados.
- El MAL determinado en el exudado es una parte del total producido en los procesos oxidativos, el cual puede estimarse mediante el cálculo de los respectivos factores a través de ensayos de recuperación formulados a tal efecto.
- Existe una tendencia de aumento de la oxidación lipídica en función del tiempo de almacenamiento en carne vacuna refrigerada.
- La incidencia de la oxidación lipídica es mayor en el caso de las carnes congeladas que en el de carnes refrigeradas, dado que las alteraciones de origen microbiano son predominantes en éstas últimas debido a las temperaturas superiores a 0°C empleadas.

- La temperatura de almacenamiento congelado reviste gran importancia en el desarrollo de los procesos de autoxidación lipídica, especialmente en sustratos susceptibles de sufrir este tipo de deterioro (salmón, tocino sin salar). Así, a menor temperatura se registra una menor incidencia o un mayor retardo de su evolución en función del tiempo de almacenamiento.
- Para una misma temperatura de almacenamiento congelado ($T = -5^{\circ}\text{C}$), diversas especies pueden presentar distinta susceptibilidad a la oxidación lipídica debido, entre otros factores, a diferencias en su composición acídica (especialmente en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados), contenido de sustancias antioxidantes (α -tocoferol), etc.
- En carnes vacuna y de pollo congeladas almacenadas a -5°C , no se observó un aumento sensible del número de TBA a lo largo de 4 meses de almacenamiento, aunque esta última especie mostró ser más proclive a sufrir autoxidación. La carne de salmón congelada en cambio, presentó una marcada susceptibilidad a los procesos oxidativos registrándose una típica curva de oxidación durante el curso del almacenamiento.
- El empleo de un método combinado de preservación temperatura de congelación-envasado al vacío (-20°C , película EVA/SARAN/EVA; -10°C , EVA/SARAN/EVA) permite inhibir o minimizar el deterioro producido por la oxidación lipídica en sustratos de

alto contenido graso (por ejemplo, tocino sin salar), sin verse afectados aspectos tales como coloración superficial y estabilidad microbiológica.

- La velocidad de congelación no tendría influencia sobre el proceso de oxidación lipídica en las especies estudiadas.
- La interacción lípidos autooxidados-proteínas miofibrilares de músculo bovino provoca daños en la fracción proteica (actina, troponinas). Se registra también la formación de agregados de mayor peso molecular.



Urs. MARIA CRISTINA ARON



MABEL C. TOMAS

*Caminante, son tus huellas el camino y nada más,
Caminante no hay camino, se hace camino al andar ...*

Antonio Machado

BIBLIOGRAFIA

- Almandós, M.E.; Giannini, D.H.; Ciarlo, A.S. y Boeri, R.L. (1986). Formaldehyde as an interference of the 2-thiobarbituric acid test. *J.Sci.Food Agric.* 37, 54/8.
- Allen, C.E. y Allen Foggeding, E. (1981). Some lipid characteristics and interactions in muscle foods. A review. *Food Technol.* N° 5, 253.
- Añón, M.C. y Calvelo, A. (1980). Freezing rate effects on the drip loss of frozen beef. *Meat Science*, 4, 1.
- Asakawa, T. y Matsushita, S. (1980). Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*, 15, 137.
- Awad, A.; Powrie, W.D. y Fennema, O. (1968). Chemical deterioration of frozen bovine muscle at -4°C. *J.Food.Sci.* 33, 227.
- Awad, A.; Powrie, W.D. y Fennema, O. (1969). Deterioration of fresh-water whitefish muscle during frozen storage at -10°C. *J.Food Sci.*, 34, 1.
- Banks, A. y Hardy, R. (1965). En *Proceedings of the International Congress of Food Science Technology* (J.M. Leitch, ed.), Vol. II, Gordon and Breach, New York, pág. 203-209.
- Bendall, J.R. (1969). *Muscles, molecules and movement*. American Elsevier Publishing Co., New York (citado por Ockerman, 1977).
- Bevilacqua, A.E.; Zaritzky, N.E. y Calvelo, A. (1979). Histological measurements of ice in frozen beef. *J.Food Technol.* 14, 237.
- Bevilacqua, A.E. y Zaritzky, N.E. (1980). Ice morphology in frozen beef. *J.Food Technol.* 15, 589.

- Bevilacqua, A.E. y Zaritzky, N.E. (1982). Ice recrystallization in frozen beef. *J.Food Sci.* 47, 1410.
- Bigalli, G. (1977). Determination of pentane formed during autoxidation of oils contained in solid samples. *J.Am.Oil Chem. Soc.* 54, 229.
- Bishop, C.M. y Odense, P.H. (1967). The ultrastructure of the white striated myotomal muscle of the cod, *Gadus morhua*. *J. Fish Res.Bd.Can.* 24, 2549.
- Bodwell, C.E. y McClain, P.E. (1971). Composición química de los tejidos animales. En "Ciencia de la carne y de los productos cárnicos" (J.F. Price y B.S. Schweigert, eds.), Pág. 80, Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 37, 911.
- Braddock, R.J. y Dugan, L.R., Jr. (1973). Reaction of autoxidizing linoleate with Coho Salmon. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 50, 343.
- Briskey, E.J.; Seraydarian, K. y Mommaerts, W.F.H.M. (1967). The modification of actomyosin by α -actinin. II. The interaction between α -actinin and actin. *Biochim.Biophys.Acta* 133, 424.
- Briskey, E.J. y Fukasawa, T. (1971). Myofibrillar proteins of skeletal muscle. In "Advances in Food Research", Vol. 19 (C.O. Chichester, E.M. Mrak y G.F. Stewart, eds.), Academic Press, New York.
- Brook, R.J. (1976). Controlled grain growth. In "Treatise on materials science and technology", Vol. 9 (F.F.Y. Wang, ed.), Pág. 331, Academic Press, London.

- Buttery, R.G. y Teranishi, R. (1963). Measurements of fat autoxidation and browning aldehydes in food vapors by direct vapor injection gas-liquid chromatography. *J.Agric.Food Chem.* 11, 504.
- Buttkus, H.A. (1967). The reaction of myosin with malonaldehyde. *J.Food Sci.* 33, 432.
- Calvelo, A. (1981). Recent studies on meat freezing. En "Developments in meat science - 2" (R. Lawrie, ed.), Pág. 125, Applied Science Publishers Ltd., Essex, England.
- Cassens, R.G. (1971). Estructura microscópica de los tejidos animales. En "Ciencia de la carne y los productos cárnicos" (J.F. Price y B.S. Schweigert, eds.), Pág. 11, Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Considine, D.M. y Considine, G.D. (1982). Sea foods. In "Foods and food production encyclopedia", Pág. 1748, Ed. Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York, N.Y.
- Chan, H.W.S. (1977). Photo-sensitized oxidation of unsaturated fatty acid methyl esters. The identification of different pathways. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 54, 100.
- Cheftel, J.C. y Cheftel, H. (1976). Oxidación de lípidos. En "Introducción a la bioquímica y tecnología de alimentos", Vol. I, Pág. 265, Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Chen, C.C.; Pearson, A.M.; Gray, J.I. y Merkel, R.A. (1984). Effects of salt and some antioxidants upon the TBA number of meat. *Food Chem.* 14, 167.

- Chio, K.S. y Tappel, A.L. (1969a). Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and aminoacids. *Biochem.* 8, 2821.
- Chio, K.S. y Tappel, A.L. (1969b). Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and malonaldehyde. *Biochem.* 8, 2827.
- Chou, H.E.; Acott, K. y Labuza, T.P. (1973). Sorption hysteresis and chemical reactivity: Lipid oxidation. *J.Food Sci.* 38, 316.
- Christie, W.W. (1978). The composition structure and function of lipids in the tissues of ruminant animals. *Prog.Lipid Res.* 17, 111.
- Dahle, L.K.; Hill, E.G. y Holman, R.T. (1962). The thiobarbituric acid reaction and the autoxidation of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch.Biochem.Biophys.* 98, 253.
- Davidkova, E. y Khan, A.W. (1967). Changes in lipid composition of chicken muscle during frozen storage. *J.Food Sci.* 32, 35.
- Dawson, R.C.; Elliott, D.C.; Elliott, W.C. y Jones, K.M. (1969). *Data for biochemical research*, 2nd ed. Oxford Press, London, Pág. 484.
- de Koning, A.J.; Evans, A.A.; Heydenrych, C. ; de V. Purcell, Ch.J. y Wessels, J.P.H. (1985). A critical investigation of a number of different methods of lipid determination in fish meal, with particular emphasis on corrections required in these determinations. *J.Sci.Food Agric.* 36, 177.

- Deng, J.C.; Matthews, R.F. y Watson, C.M. (1977). Effect of chemical and physical treatment on rancidity development of frozen mullet (*mugil cephalus*) fillets. *J.Food Sci.* 42, 344.
- Dillard, C.J. y Tappel, A.L. (1971). Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes. *Lipids* 6, 715.
- Dillard, C.J. y Tappel, A.L. (1973). Fluorescent products from reaction of peroxidizing polyunsaturated fatty acids with phosphatidyl ethanolamine and phenylalanine. *Lipids* 8, 183.
- Fennema, O.R.; Powrie, W.D. y Marth, E.H. (1973). Characteristics of food myosystems and their behaviour during freeze-preservation. En "Low temperature preservation of foods and living matter". Pág. 282, Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- Fennema, O.R. (1976). Water and ice. En "Principles of food science" (O.R. Fennema, Editor). Pág. 13, Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- Fennema, O.R. (1985). Food Chemistry. Second Edition, revised and expanded (Owen R. Fennema, Editor), Pág. 185.
- Frankel, E.N. (1983). Recent advances in the chemistry of rancidity of fats. En "Recent advances in the chemistry of meat" (A.J. Bailey, Editor). Pág. 87, The Royal Society of Chemistry, Burlington House, London.
- Funes, J.; Yong, S. y Karel, M. (1980). Changes in lisozyme due to reactions with volatile products of peroxidizing methyl linoleate. *J.Agric.Food Chem.* 28, 794.

- Funes, J. y Karel, M. (1981). Free radical polymerization and lipid binding of lysozyme reacted with peroxidizing linoleic acid. *Lipids* 16, 347.
- Funes, J.A.; Weiss, U. y Karel, M. (1982). Effects of reaction conditions and reactant concentrations on polymerization of lysozyme reacted with peroxidizing lipids. *J.Agric.Food Chem.* 30, 1204.
- Funes, J. (1984). Oxidación de lípidos. Presentado en el "Congreso Mundial de Tecnología de Alimentos 84", Buenos Aires, Rep. Argentina.
- Funes, J. y Karel, M. (1984). Protein aggregation in intact and disrupted peroxidizing erythrocyte membranes. *J.Food Biochem.* 8, 303.
- Gaddis, A.M.; Ellis, R. y Currie, G.T. (1961). Carbonyls in oxidizing fat. V. The composition of neutral, volatile monocarbonyl compounds from autoxidized oleate, linoleate, linolenate esters and fats. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 38, 371.
- Gokalp, H.Y.; Ockerman, H.W.; Plimpton, R.F. y Harper, W.I. (1983). Fatty acids of neutral and phospholipids rancidity scores and TBA values as influenced by packing and storage. *J.Food Sci.* 48, 829.
- Gornall, A.G.; Bardawil, C.J. y David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. *J.Biol.Chem.* 177, 751.
- Coll, 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.

- Grau, R. (1965). Composición química de la carne. En "Carne y productos cárnicos". Pág. 22, Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Gray, J.I. (1978). Measurement of lipid oxidation: A review. J. Am.Oil Chem.Soc. 55, 539.
- Hamm, R. (1970). Properties of meat proteins. En "Proteins as human food" (A.R. Lawrie, Editor). Pág. 107, Butterworths, London.
- Hanson, S.W.F. y Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. Biochem. J. 89, 101.
- Harrington, W.F. y Rodgers, M.E. (1984). Myosin. En "Annual review of biochemistry", Vol. 53 (C.C. Richardson, P.D. Boyer y A. Meister, Editores). Pág. 35, Annual Reviews Inc., California, USA.
- Hay, J.D.: Currie, R.W. y Wolfe, F.H. (1973). Polyacrilamide disc gel electrophoresis of fresh and aged chicken muscle proteins in sodium dodecylsulfate. J.Food Sci. 38, 987.
- Heidelbaugh, N.D. y Karel, M. (1970). Effect of water-binding agents on the catalyzed oxidation of methyl linoleate. J.Am. Oil Chem.Soc. 47, 539.
- Huang, W.H. y Greene, B.E. (1978). Effect of cooking method on TBA numbers of stored beef. J.Food Sci. 43, 1201.
- Hultin, H.O. (1976). Characteristics of muscle tissue. En "Principles of food science. Part I. Food Chemistry". Pág. 577 (O.R. Fennema, Editor), Marcel Dekker, Inc., New York.

- Hultin, H.O. (1985). Characteristics of muscle tissue. En "Food Chemistry", Second Edition, revised and expanded (Owen R. Fennema, Editor). Pág. 725, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Igene, J.O. y Pearson, A.M. (1979). Role of phospholipids and triglycerides in warmed-over flavor development in metal model systems. J.Food Sci. 44, 1285.
- Igene, J.O.; Pearson, A.M.; Merkel, R.A. y Coleman, T.H. (1979). Effect of frozen storage time, cooking and holding temperature upon extractable lipids and TBA value of beef and chicken. J. Anim.Sci. 49, 701.
- Igene, J.O.; Pearson, A.M.; Dugan, L.R. y Price, J.F. (1980). Role of triglycerides and phospholipids on development of rancidity in model meat systems during frozen storage. J.Food Chem. 5, 263.
- Jarenbäck, L. y Liljemark, A. (1975). Ultrastructural changes during frozen storage of cod (*Gadus morhua* L.). III. Effects of linoleic acid and linoleic acid hydroperoxides on myofibrillar proteins. J.Food Technol. 10, 437.
- Jul, M. (1984). Early investigations. Crystal formation. En "The quality of frozen foods". Pág. 8, Ed. Academic Press Inc. (London) Ltd.
- Kakuda, Y.; Stanley, D.W. y van der Voort, F.R. (1981). Determination of TBA number by high performance liquid chromatography. J.Am.Oil Chem.Soc. 58, 773.

- Kanner, J. y Karel, M. (1976). Changes in lysozyme due to reactions with peroxidizing methyl linoleate in a dehydrated model system. *J.Agric.Food Chem.* 24, 468.
- Karel, M. (1973). Symposium: Protein interactions in byosystems. Protein-lipid interactions. *J.Food.Sci.* 38, 756.
- Karel, M. (1975). Protective packaging of foods. En "Principles of food science. Part II. Physical principles of food preservation" (O.R. Fennema, Editor). Pág. 93, Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- Karel, M.; Schaich, K. y Roy, R. (1975). Symposium on effects of oxidized lipids on food proteins and flavor. *J.Agric.Food Chem.* 23, 159.
- Karel, M. (1977). Interaction of food proteins with water and with lipids, and some effects of these interactions on functional properties. En "Biotechnological applications of proteins and enzymes" (Z. Boak y N. Sharon, Editores). Cap. 19, Pág. 317. Academic Press, New York, N.Y.
- Karel, M. (1979). Lipid oxidation, secondary reactions and water activity of foods. Presentado en el Seminario "Autoxidation Processes in Food and Related Biological Systems", octubre 29-31, Natick, Massachusetts.
- Kawashima, K.; Itoh, H. y Chibata, I. (1979). Synergistic ternary antioxidant compositions comprising tocopherol, partially hydrolyzate of gelatin and organic acid. *Agric.Biol.Chem.* 43, 827.

- Kawashima, K.; Itoh, H. y Chibata, I. (1981). Antioxidant effect of peptide in combination with sugar on autoxidation of edible oils. *Agric.Biol.Chem.* 45, 987.
- Ke, P.J.; Ackman, R.G.; Linke, B.A. y Nash, D.M. (1977). Differential lipid oxidation in various parts of frozen mackerel. *J.Food Tech.* 12, 37.
- 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.
- Keller, J.D. y Kinsella, J.E. (1973). Phospholipid changes and lipid oxidation during cooking and frozen storage of ground beef. *J.Food Sci.* 38, 1200.
- Kosugi, H. y Kikugawa, K. (1985). Thiobarbituric acid-reactive substances in chicken fat and unsaturated fatty acids. *J. Food Sci.* 50, 1181.
- Kosugi, H. y Kikugawa, K. (1986). Reaction of thiobarbituric acid with saturated aldehydes. *Lipids*, 21 (9), 537.
- Kunzman, J.E.; Field, R.A. y Kazantzis, D. (1978). Lipid oxidation in mechanically deboned red meat. *J.Food Sci.* 43, 1375.
- Kwon, T.W.; Menzel, D.B. y Olcott, H.S. (1965). Reactivity of malonaldehyde with food constituents. *J.Food Sci.* 30, 808.
- Laakso, S. y Lilius, E. (1982). Milk casein: Inhibitor of lipoygenase-catalyzed lipid peroxidation. *J.Agric.Food Chem.* 30, 913.

- Labuza, T.P. (1971a). Proc.3rd.Intl.Cong.Food Sci.Technol. 1970, Washington, D.C., Pág. 618.
- Labuza, T.P. (1971b). Kinetics of lipid oxidation in foods. CRC Critical Rev. Food Technol. 2, 355.
- Labuza, T.P. (1982). Shelf life of frozen meat and sea food. En "Shelf-life dating of foods". Pág. 439, Food & Nutrition Press, Inc., Westport, Connecticut 06880, USA.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227, 680.
- Laemmli, U.K. y Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T₄. J.Mol.Biol. 80, 575.
- Lawrie, R.A. (1974). Ciencia de la carne. Ed. Acribia, 2a Edición, Zaragoza, España.
- Lea, C.H. (1961). Some biological aspects of fat determination. Food Technol. 15, 33.
- Lea, C.H. (1962). En "Lipids and their oxidation" (H.W. Schultz, E.A. Day y R.O. Sinnhuber, Editores). Avi Publishing Comp., Westport, Conn. Pág. 3-28.
- Leake, L. y Karel, M. (1985). Nature of fluorescent compounds generated by exposure of protein to oxidizing lipids. J.Food Biochem. 9, 117.
- Ledward, D.A. y Mac Farlane, J.J. (1971). Some observations on myoglobin and lipid oxidation in frozen beef. J.Food Sci. 36, 987.
- Lillard, D.A. y Day, E.A. (1964). Degradation of monocarbonyls from autoxidizing lipids. J.Am.Oil Chem.Soc. 31, 549.

- Love, M.R. (1966). The freezing of animal tissue. En "Cryobiology". Pág. 317 (H.T. Meryman, Editor). Academic Press, London.
- Love, R.M. (1980). The chemical biology of fishes, Vol. 2, Advances 1968-1977, Academic Press, London.
- Lowey, S.; Goldstein, L. y Luck, S. (1966). Isolation and characterization of a helical sub-unit from heavy meromyosin. Biochem. Z. 345, 248.
- Lowry, O.H. ; Rosenbroug, H.J.; Lewis, A. y Randall, K.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265.
- Lundberg, W.O. (1962). En "Lipids and their oxidation" (W.H. Schultz, E.A. Day y R.O. Sinnhuber, Editores). Avi Publishing Comp. Westport, Conn., Pág. 31-50.
- Mackie, I.M. (1983). New approaches in the use of fish proteins. En "Developments in food proteins-2" (B.F.J. Hudson, Editor). Pág. 215. Applied Science Publishers Ltd., England.
- Mai, J. y Kinsella, J.E. (1979). Changes in lipid oxidation of cooked minced carp (*Cyprinus carpio*) during frozen storage. J.Food Sci. 44, 1619.
- Marcuse, R. y Johansson, L. (1973). Studies on the TBA test for rancidity grading. II. TBA reactivity of different aldehyde classes. JAOCs 50, 387.
- Martino, M.N. (1987). Recristalización del hielo en sistemas modelo y su extensión al almacenamiento congelado de carnes. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.

- Mascheroni, R.H. (1977). Transferencia de calor con simultáneo cambio de fase en tejidos cárneos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Matsushita, S. (1975). Specific interactions of linoleic acid hydroperoxides and their secondary degraded products with enzyme proteins. *J.Agric.Food Chem.* 23, 150.
- Mc Donald, I.W. y Scott, T.W. (1977). Foods of ruminant origin with elevated content of polyunsaturated fatty acids. *World Rev.Nutr.Dietet.* 26, 144.
- Melton, S. (1983). Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. *Food Technol.* 7, 105.
- Moerck, K.E. y Ball, H.R. (1974). Lipid autoxidation in mechanically deboned chicken meat. *J.Food Sci.* 39, 876.
- Morris, D.M. y Dawson, L.E. (1979). Storage stability of mechanically deboned sucker (Catostomidae) flesh. *J.Food Sci.* 44, 1093.
- Murray, J.M. y Weber, A. (1974). The cooperative action of muscle proteins. *Sci.Am.* 230, 58.
- Nair, P.G.V.; Gopakumar, K. y Nair, M.R. (1976). Lipid hydrolysis in mackerel (*Rastrellinger Kanagurta*) during frozen storage. *Fish Technol.* 13 (2), 111.
- Nakhost, Z. y Karel, M. (1983). Changes in bovine mioglobin due to interaction with methyl linoleate in a model system. *J.Food Sci.* 48, 1335.

- Nawar, W.W. (1985). Lipids. En "Food Chemistry", Second edition, revised and expanded (Owen R. Fennema, Editor). Pág. 139, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Novak, A.F. (1977). Fish proteins. En "Food Colloids" (H.D. Graham, Editor). Pág. 292. The Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut.
- Ockerman, H.W. (1974). Chemistry of muscle and major organs. En "Meat Higiene" (J.A. Libby, Editor). Pág. 232, Lea y Febiger, Philadelphia.
- Ockerman, H.W. (1977). Meat proteins. En "Food Colloids" (H.D. Graham, Editor). Pág. 240, The Avi Publishing Company Inc., Westport, Connecticut.
- Ohkawa, H.; Ohishi, N. y Yagi, K. (1978). Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. J. Lipid Res. 19, 1053.
- Ohkawa, H.; Ohishi, N. y Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal.Biochem. 95, 351.
- Patton, S. (1974). Malonaldehyde lipid oxidation and the thiobarbituric acid test. J.Am.Oil Chem.Soc. 51, 114.
- Pawar, S.S. y Magar, N.G. (1966). Chemical changes during frozen storage of pomphrets, mackerel and sardines. J.Food Sci. 31, 87.
- Pearson, A.M. (1976). Función del músculo y cambios post-mortem. En "Ciencia de la carne y de los productos cárnicos" (J.F. Price y B.S. Schweigert, Editores). Pág. 212, Ed. Acribia, Zaragoza, España.

- Pearson, A.M.; Gray, J.I.; Wolzak, A.M. y Horenstein, N.A. (1983). Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. *Food Technol.* 7, 121.
- Pearson, A.M.; Love, J.D. y Shorland, F.R. (1977). Warmed-over flavor in meat, poultry and fish. *Adv.Food Res.* 23, 1.
- Pikul, J.; Leszczynski, D.E. y Kummerow, F.A. (1983). Elimination of sample autoxidation by butylated hydroxytoluene additions before thiobarbituric acid assay for malonaldehyde in fat from chicken meat. *J.Agric.Food Chem.* 31 (6), 1339.
- Pokorny, J.; Valentova, H. y Davidek, J. (1985). Modified determination of 2-thiobarbituric acid value in fats and oils. *Die Nahrung* 29, 31.
- Porzio, M.A. y Pearson, A.M. (1977). Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecylsulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *Biochim.Biophys.Acta* 490, 27.
- Price, J.F. y Schweigert, B.S. (1971). *The science of meat and meat products*. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- Pryor, W.A.; Stanley, J.P. y Blair, E. (1976). Autoxidation of polyunsaturated fatty acids. II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids*, 11, 370.
- Reineccius, G.A. (1979). Symposium on meat flavor. Off flavors in meat and fish. A review. *J.Food Sci.* 44, 12.
- Riedel, L. (1957). Kalorimetrische Untersuchungen über das Gefrieren von Fleisch. *Kältetechnik*, 9, 38.

- Rhee, K.S. (1978a). Minimization of further lipid peroxidation in the distillation 2-thiobarbituric acid test of fish and meat. *J.Food Sci.* 43, 1776.
- Rhee, K.S. (1978b). Factors affecting oxygen uptake in model systems used for investigating lipid peroxidation in meat. *J.Food Sci.* 43, 6.
- 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.
- Scaich, K.M. y Karel, M. (1975). Free radicals in lysozyme reacted with peroxidizing methyl linoleate. *J.Food Sci.* 40, 456.
- Seo, C.W. (1976). Hydrocarbon production from freeze-dried meats. *J.Food Sci.* 41, 594.
- Seo, C.W. y Joel, D.L. (1980). Pentane production as an index of rancidity in freeze-dried pork. *J.Food Sci.* 45, 36.
- Shenouda, S.Y.K. (1980). Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. *Adv.Food Res.* 26, 275.
- Sinnhuber, R.O. y Yu, T.C. (1958a). Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Food Res.* 23, 626.
- Sinnhuber, R.O. y Yu, T.C. (1958b). 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. 2. The quantitative determination of malonaldehyde. *Food Technol.* 12, 9.

- Slabyj, B.M. y Hultin, H.O. (1984). Oxidation of a lipid emulsion by a peroxidizing microsomal fraction from herring muscle. *J. Food Sci.* 49, 1392.
- Slavin, J.W. (1968). En "The freezing preservation of foods" (D.K. Tressler, W.B. Van Arsdel and M.J. Copley, Editores), Vol. 2, Avi Publishing Comp., Westport, Conn. Pág. 179-196.
- Tarladgis, B.G. y Watts, B.M. (1960). Malonaldehyde production during the controlled oxidation of pure, unsaturated fatty acids. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 37, 403.
- Tarladgis, B.G.; Watts, B.M. y Younathan, M.T. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J.Food Sci.* 37, 44.
- Tarladgis, P.G.; Pearson, A.M. y Dugan, L.R. (1962). The chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for the determination of oxidative rancidity in foods. I. Some important side reactions. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 39, 34.
- Terao, J. Y Matsushita, S. (1977). Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid esters. *J.Am. Oil Chem.Soc.* 54, 234.
- Trombly, R. y Tappel, A. (1975). Fractionation and analysis of fluorescent products of lipid oxidation. *Lipids* 10, 441.
- Uchiyama, M. y Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal.Biochem.* 86, 271.

- Urbain, W.M. (1976). Conservación de la carne. En "Ciencia de la carne y los productos cárnicos (J.F. Price y B.S. Schweigert, Editores). Pág. 413. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Uri, N. (1961). En "Autoxidation and Antioxidants" Vol I. Pág. 55. Interscience Publishers, New York, N.Y.
- Vladimirov, Y.A.; Olenev, V.I.; Suslova, T.B. y Cheremisina, Z.P. (1980). Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. Adv. Lipid Res. 17, 173.
- Vyncke, W.V. (1975). Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.). Fette Seifen.Anstrich. 77, 239.
- Wagner, J.R. y Añón, M.C. (1985). Effect of freezing rate on the denaturation of miofibrillar proteins. J.Food Technol. 20, 735.
- Wagner, J.R. (1986). Desnaturalización de proteínas de músculo bovino durante la congelación y el almacenamiento en estado congelado. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- 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.
- Wagner, J.R. y 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.

- Watt, B.K. y Merrill, A.L. (Editores) (1963). Composition of Foods, Agriculture Handbook N° 8, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Williams, J.C.; Field, R.A.; Miller, G.J. y Welke, R.A. (1983). Evaluation of TBA methods for determination of lipid peroxidation in red meats from four species. *J.Food Sci.* 48, 1776.
- 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.
- Yamauchi, K.; Nagai, Y. y Ohashi, T. (1980). Quantitative relationship between alpha tocopherol and polyunsaturated fatty acids and its connection to development of oxidative rancidity in porcine skeletal muscle. *Agric.Biol.Chem.* 44, 1061.
- Yee, J.J.; Shipe, W.F. y Kinsella, J.E. (1980). Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copper catalyzed methyl linoleate oxidation. *J.Food Sci.* 45, 1082.
- Younathan, M.T.; Marjan, Z.M. y Arshad, F.B. (1980). Oxidative rancidity in stored ground turkey and beef. *J.Food Sci.* 45, 274.
- Zamora, M.C. y Zaritzky, N.E. (1987). Potassium sorbate inhibition of microorganism growing on refrigerated packaged beef. *J.Food Sci.* 52, 257.
- Zipser, M.W.; Kwon, T.W. y Watts, B.M. (1964). Oxidative changes in cured and uncured frozen cooked pork. *J.Agr.Food Chem.* 12, 105.

Zirlin, A. y Karel, M. (1969). Oxidation effects in a freeze-dried gelatin-methyl linoleate system. J.Food Sci. 34, 160.

NOMENCLATURA

a_w	actividad acuosa
A	absorbancia
d	días
D	factor de dilución
Hys	histidina
HR	humedad relativa
K	constante de proporcionalidad (Ec. 2)
k_A	velocidad de la reacción $ROO\cdot + AH \rightarrow ROOH + A\cdot$ (Ec.5)
k_3	velocidad de las reacciones de propagación (Ec. 1)
k_6	velocidad de las reacciones de terminación (Ec. 1)
Lys	lisina
m	masa de lípidos (g)
MAL	conjunto de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) incluyendo principalmente al malonaldehído
(M ₄)	sistema control constituido por miofibrillas incubadas a T = 4°C
(M ₂₅)	sistema control constituido por miofibrillas incubadas a T = (25±2) °C
(M+L)	sistema constituido por miofibrillas y lípidos incubados en atmósfera de aire a T = (25±2) °C
(M+L) _{N₂}	sistema constituido por miofibrillas y lípidos incubados en atmósfera de nitrógeno a T = (25±2) °C
(M+Per)	sistema constituido por miofibrillas y productos provenientes de la peroxidación lipídica de músculo semitendinoso bovino incubados en atmósfera de aire a T = (25±2) °C
Met	metionina

N	normalidad de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Ec. 7)
	normalidad de NaOH (Ec. 8)
n° TBA	número de TBA (mg MAL/Kg carne)
PM	peso molecular MAL (Ec. 6)
PV	índice de peróxido
r	velocidad global de reacción (Ec. 1)
r_i	velocidad de las reacciones de iniciación (Ec. 1)
T	temperatura
t_c	tiempo característico de congelación
V	volumen total de exudado (Ec. 6)
	volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Ec. 7)
	volumen de NaOH (Ec. 8)
V_A	volumen de exudado que interviene (Ec. 6) en la reacción de TBA
W	peso de la muestra (Ec. 6)

LETRAS GRIEGAS

ϵ_M	coeficiente de extinción o absorción molar aparente
--------------	-----------------------------------------------------

FE DE ERRATAS

Página 36, línea 18: Dice: meq. de I_2 /kg de ácidos grasos

Debe decir: el índice de peróxido se expresa en meq. de iodo por kilo de grasa.

Página 125, línea 6: Dice: agua, cenizas, proteínas

Debe decir: agua, minerales, proteínas

Título del Capítulo III: Dice: Oxidación lipídica en carne

Debe decir: Oxidación lipídica en carne vacuna