

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Tesis Doctoral

**Estudio de la aplicación de la tecnología de altas presiones e
incorporación de aditivos en el desarrollo de hamburguesas de
carne bovina reducidas en sodio**

Tesista:

MVZ. Amparo Eccoña Sota

Directores:

Dr. Sergio R. Vaudagna

Dr. Francisco Speroni

Buenos Aires, 2018

Dedicado a mi familia

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto Tecnología de Alimentos (ITA) dependiente del Centro de Investigación de Agroindustria (CIA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). El CONICET financió la Beca Latinoamericana de la MVZ. Amparo Eccoña Sota y el trabajo experimental fue financiado por los proyectos INTA PE PNAlyAV 1130033 y PICT 2015 0291.



Agradecimientos:

Esta Tesis Doctoral fue realizada en el Instituto Tecnología de Alimentos del INTA y con apoyo del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, gracias a estas instituciones por el financiamiento, y gracias al CONICET por la beca otorgada.

Numerosas personas participaron en el desarrollo de esta tesis, colaborando en los ensayos y dando consejos, por ello quisiera agradecer a todas ellas.

Mi sincero agradecimiento al Dr. Sergio Vaudagna y al Dr. Francisco Speroni por la confianza que pusieron en mí, por la oportunidad de trabajar en este proyecto y el apoyo que me brindaron a lo largo de esta etapa de mi formación académica.

A todos mis compañeros de trabajo del Instituto Tecnología Alimentos y en especial al área de Procesamiento de Alimentos, gracias por su compañía y los buenos momentos. Un especial agradecimiento a Claudio Sanow, Ana María Sancho, Natalia Szeman, Fernanda Martínez, Gabriela Denoya, Anabel Rodríguez, Mariana Cap, Paula Ormando, Yanina Barrio, Marilina Molas y Reynaldo Silva por haberlos conocido y compartido conocimientos. Dios los bendiga en todo lo que hacen.

Gracias a mis padres y hermanos por los buenos consejos y por apoyarme en todo momento durante esta etapa a pesar de la distancia.

Los resultados de esta Tesis Doctoral fueron presentados en los trabajos que se detallan a continuación:

60th International Congress of Meat Science and Technology. Eccoña Sota Amparo, Sanow Claudio, Sancho Ana M, Vaudagna Sergio R. High hydrostatic pressure treatment of raw material: effect on physicochemical and texture properties of beef patties. 17 al 22 de agosto de 2014, Punta del Este, Uruguay.

International Nonthermal Food Processing Workshop. Eccoña Sota Amparo, Vaudagna Sergio R, Speroni Francisco. High hydrostatic pressure treatment of minced beef for patty manufacture: effects of pressure level and holding time on thermal and molecular characterization of proteins. 22 al 23 de octubre de 2014, Columbus, Ohio, EE. UU.

1° Congreso Argentino de Estadística. Amparo Eccoña Sota, Ana M. Sancho, Francisco Speroni, Sergio R. Vaudagna. Superficie de respuesta en la optimización de parámetros cromáticos y humedad expresable de hamburguesas tratadas con APH y formuladas con distintas concentraciones de aditivos. 6 al 9 de octubre de 2015, Buenos Aires, Argentina.

XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XV CYTAL). Eccoña Sota Amparo, Vaudagna Sergio R., Speroni Francisco. Efecto del tratamiento con altas presiones hidrostáticas sobre el comportamiento térmico y la caracterización molecular de las proteínas cárnicas de hamburguesas de carne bovina formuladas con distintas concentraciones de aditivos. 3 al 5 de noviembre de 2015, Buenos Aires, Argentina.

VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC). Eccoña Sota A. Sancho A.M., Sanow C., Speroni F., Vaudagna S.R. Propiedades fisicoquímicas y texturales de hamburguesas de carne bovina elaboradas con fibra cítrica y transglutaminasa, tratadas con altas presiones hidrostáticas. 2 al 4 de noviembre de 2016, Córdoba, Argentina.

XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XVI CYTAL). Amparo Eccoña Sota, Francisco Speroni, Ana María Sancho, Sergio Ramón Vaudagna. Aplicación de altas presiones hidrostáticas en hamburguesas de carne

bovina adicionadas con antioxidantes. 18 al 20 de septiembre de 2017, Mar del Plata, Argentina.

Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas (CLICAP).

Amparo Eccoña Sota, Mariana Cap, Anabel Rodríguez, Ana María Sancho y Sergio R. Vaudagna. Evaluación del efecto del tratamiento con alta presión hidrostática y de la formulación sobre la inactivación de cepas nativas de STEC O157 en hamburguesas de carne bovina. 11 al 13 de abril de 2018, San Rafael, Mendoza, Argentina.

RESUMEN

La ingesta actual de Sodio a nivel mundial supera las necesidades fisiológicas y en varios países, incluida la República Argentina, sobrepasa ampliamente la ingesta máxima recomendada por la Organización Mundial de la Salud. El mayor aporte de Sodio proviene de los alimentos procesados. El consumo excesivo de Sodio está asociado a la hipertensión arterial, que a su vez es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares. La reducción del uso de sales de Sodio implica un desafío importante para la industria cárnica, ya que el Cloruro de Sodio (NaCl) y el Tripolifosfato de Sodio (TPFS) cumplen importantes funciones tecnológicas, como la intervención en la extracción y solubilización de las proteínas miofibrilares, necesarias para mejorar propiedades como la retención de agua y la textura. También el NaCl desempeña un rol fundamental en el desarrollo del *flavor* típico de algunos productos cárnicos y en el aseguramiento de la inocuidad y extensión de vida útil de la mayoría de ellos.

La tecnología de altas presiones hidrostáticas (APH) además de asegurar la inocuidad, extender la vida útil y mantener las características sensoriales y nutricionales originales del alimento, puede modificar la estructura de macromoléculas e inducir efectos específicos en la textura, la retención de agua y otras propiedades de los alimentos, por lo tanto, su aplicación permitiría el desarrollo de nuevos productos.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue evaluar la utilización de aditivos en combinación con distintas estrategias de aplicación de APH, en el desarrollo de hamburguesas reducidas en Sodio.

Para alcanzar el objetivo planteado se realizaron distintos estudios. En el primer estudio se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y tecnológicas y la microestructura de hamburguesas formuladas con materia prima (carne picada) tratada con distintos niveles de presión y tiempos de mantenimiento de la presión. En ese estudio las hamburguesas fueron preparadas con la carne tratada con APH (78,75 %), grasa bovina (10 %), agua (10 %) y aditivos convencionales (1 % NaCl y 0,25 % TPFS). En este estudio se observó que la aplicación del menor nivel de presión evaluado (150 MPa) sobre la materia prima no produjo diferencias significativas en las propiedades fisicoquímicas y tecnológicas de las hamburguesas ni sobre las propiedades térmicas y moleculares de las proteínas cárnicas, en comparación con las hamburguesas que no fueron tratadas con APH. Cuando el nivel de presión fue mayor (300 MPa), se observaron diferencias significativas en la textura, particularmente en los parámetros dureza y esfuerzo de corte de las hamburguesas cocidas, los cuales

disminuyeron. Además, se observó un incremento significativo de la pérdida de peso por cocción.

En el segundo estudio, se evaluó el efecto combinado de la incorporación de aditivos (distintas concentraciones de NaCl, fibra cítrica y enzima transglutaminasa) y el tratamiento con APH (100 – 300 MPa) sobre las propiedades fisicoquímicas y tecnológicas y la microestructura de las hamburguesas. También se evaluó el efecto de los tratamientos sobre las propiedades térmicas y moleculares de las proteínas cárnicas. Resulta importante destacar que en este estudio el tratamiento con APH se aplicó sobre las hamburguesas ya preparadas. Los resultados de este estudio mostraron que la incorporación de TG y fibra cítrica a las mayores concentraciones evaluadas incrementaron la unión de las partículas cárnicas, mejorando de esta manera la textura de las hamburguesas. Además, la adición de fibra contrarrestó el efecto de la alta presión sobre la retención de agua, permitiendo la reducción de la pérdida de peso por cocción. El grado de desnaturalización de las proteínas cárnicas incrementó con el aumento de la presión, siendo superior a 50 % a 300 MPa. A su vez, la mayor concentración de NaCl (2 %) incrementó el grado de desnaturalización.

Uno de los mayores inconvenientes que presenta la aplicación de APH en carnes y productos cárnicos es la alteración del color debido a la desnaturalización de la mioglobina y al incremento de su oxidación. Además, los tratamientos con APH producen un incremento de la oxidación de lípidos. Por ello en el tercer estudio se evaluó el efecto de la concentración de compuestos antioxidantes (extracto de romero, Eritorbato de Sodio) y del tratamiento con APH sobre las propiedades fisicoquímicas, tecnologías y bioquímicas de hamburguesas. La oxidación de los lípidos (número de TBARS) en las hamburguesas no fue afectada por el tratamiento con APH, pero sí por el aumento de la concentración de NaCl. Por otra parte, la incorporación de extracto de romero contribuyó a disminuir la oxidación en el rango 0,1 a 0,2 % mientras que a concentraciones inferiores a 0,1 % tuvo efecto prooxidante en las hamburguesas cuando estas fueron tratadas con APH. Sin embargo, la incorporación de Eritorbato de Sodio tuvo un efecto positivo, contribuyendo a reducir el aumento de la luminosidad inducido por el incremento del nivel de presión. Además, ese aditivo incrementó en forma significativa la capacidad antioxidante de las hamburguesas.

En el último estudio del presente trabajo de Tesis Doctoral se evaluó el efecto de los tratamientos con APH sobre la inactivación de un coctel inoculado de cepas nativas de *Escherichia coli* O157:H7 productores de toxina Shiga (STEC O157) y de la microbiota alteradora en hamburguesas preparadas con distintas formulaciones. Las

hamburguesas fueron elaboradas modificando la concentración de grasa y de NaCl, utilizándose un total de 4 formulaciones: carne magra (60 y 80 %), grasa (10 y 20 %), agua (10 %), TPFS (0,5 %) y NaCl (1 y 2 %). Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (4x3). Los factores fueron la formulación y el nivel de presión aplicado (0,1; 400 y 600 MPa). El análisis de los resultados indicó un efecto significativo de la formulación y del nivel de presión aplicada sobre la inactivación de cepas nativas de STEC O157. Las hamburguesas elaboradas con 2 % NaCl y tratadas con APH, presentaron menores reducciones en comparación con las muestras formuladas con 1 % NaCl y tratadas con los mismos niveles de presión. A su vez, el nivel de presión presentó un efecto significativo sobre la inactivación de las cepas de STEC O157. Así, en hamburguesas elaboradas con 1 % NaCl, 10 % grasa y tratadas a 600 MPa durante 5 min a 20 °C, se obtuvo 4,5 reducciones decimales de los recuentos de STEC O157. Además, se lograron aproximadamente 4 reducciones decimales de la microbiota alteradora. Con lo cual se demostraría la potencialidad de la tecnología de APH en el aseguramiento de la inocuidad y en la extensión de la vida útil de productos cárnicos. Sin embargo, se observó una importante injuria celular en las cepas de STEC O157, fundamentalmente en las hamburguesas tratadas a 600 MPa, por lo que en futuros estudios será necesario evaluar estrategias complementarias a las aplicadas en este Trabajo de Tesis.

ÍNDICE GENERAL

1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. La carne: generalidades	1
1.2. Importancia de la carne en Argentina	1
1.3. Composición e importancia nutricional de la carne	3
1.4. Estructura del músculo y proteínas de la carne	4
1.4.1 Proteínas sarcoplásmicas	5
1.4.2 Proteínas miofibrilares.....	6
1.4.2.1 Miosina	6
1.4.2.2 Actina	7
1.4.2.3 Tropomiosina.....	7
1.4.2.4 Troponina	7
1.4.3 Proteínas del estroma	9
1.5. Parámetros de calidad de la carne y productos cárnicos	9
1.5.1 Parámetros cromáticos	9
1.5.2 pH.....	11
1.5.3 Capacidad de retención de agua.....	12
1.5.4 Propiedades de textura	13
1.5.5 Aroma y sabor.....	14
1.6. Derivados cárnicos	14
1.6.1 Concepto de hamburguesa	15
1.6.2 Ingredientes y aditivos utilizados en la elaboración de productos cárnicos..	16
1.6.2.1 Agua	16
1.6.2.2 Cloruro de Sodio.....	17
1.6.2.3 Fosfatos.....	18
1.6.2.4 Fibra alimentaria	19
1.6.2.5 Enzima transglutaminasa.....	20

1.6.2.6 Extracto de romero	21
1.6.2.7 Eritorbato de Sodio	22
1.6.3 Importancia de la reducción de sales en los productos cárnicos	23
1.6.4 Importancia de la calidad microbiológica de la hamburguesa	24
1.7. Alta presión hidrostática	26
1.7.1 Desarrollo histórico de la tecnología de APH	27
1.7.2 Principios básicos del sistema de presurización	27
1.7.3 Descripción del equipo de APH	29
1.8. Alta presión hidrostática como tecnología de preservación de alimentos.....	34
1.9. Efecto del procesamiento con APH en los parámetros más importantes de calidad e inocuidad de carne y productos cárnicos	36
1.9.1 Efecto de la APH los parámetros cromáticos	36
1.9.2 Efecto de la APH en las proteínas de la carne	37
1.9.3 Efecto de la APH en los lípidos	39
1.9.4 Efecto de la APH sobre los microorganismos.....	39
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivo general	41
2.2. Objetivos específicos	41
2.3. Hipótesis.....	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Materiales y procedimientos generales.....	43
3.1.1 Materia prima	43
3.1.2 Aplicación de los tratamientos con APH.....	44
3.1.3 Cocción de las muestras	45
3.2. Aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas sobre la materia prima (carne picada) para la elaboración de hamburguesas de carne bovina.....	45
3.2.1 Materiales	46
3.2.2 Procedimiento de preparación de las hamburguesas	46

3.2.3 Diseño experimental.....	48
3.3. Aplicación de APH a hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales y con enzima transglutaminasa y fibra cítrica	49
3.3.1 Materiales	49
3.3.2 Diseño experimental.....	49
3.3.2.1 Función deseabilidad	51
3.3.3 Procedimiento de preparación de las hamburguesas	53
3.4. Aplicación de tratamientos con APH a hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales y con compuestos antioxidantes	54
3.4.1 Materiales	54
3.4.2 Diseño experimental.....	55
3.4.3 Procedimiento de preparación de las hamburguesas	57
3.5. Evaluación del efecto del tratamiento con APH y de la formulación sobre la inactivación de un coctel de cepas nativas de STEC O157 inoculado en hamburguesas de carne bovina.....	59
3.5.1 Materiales	59
3.5.2 Control de la materia prima	60
3.5.3 Preparación de las hamburguesas con diferentes formulaciones	61
3.5.4 Preparación de hamburguesas no inoculadas	61
3.5.5 Preparación de inóculo.....	61
3.5.6 Preparación de hamburguesas inoculadas con STEC O157	62
3.5.7 Diseño experimental.....	62
3.6. Determinaciones analíticas.....	63
3.6.1 pH	63
3.6.2 Parámetros cromáticos	64
3.6.1 Análisis del perfil de textura.....	64
3.6.2 Esfuerzo de corte y trabajo de corte mediante celda de Kramer	65
3.6.3 Humedad expresable	66
3.6.4 Pérdida de peso por cocción	66

3.6.5 Determinación de Sustancias Reactivas al ácido 2-Tiobarbitúrico.....	67
3.6.6 Determinación de la actividad antioxidante mediante la técnica de capacidad de reducción del ion férrico	68
3.6.7 Determinación del contenido de proteína	69
3.6.8 Análisis térmico mediante calorimetría diferencial de barrido	69
3.6.9 Caracterización molecular de proteínas cárnicas mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida.....	70
3.6.9.1 Extracción de proteínas	70
3.6.9.2 Preparación de los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y sembrado de las muestras	70
3.6.10 Análisis microbiológico	71
3.6.10.1 Hamburguesas inoculadas:	71
3.6.10.2 Hamburguesas no inoculadas:.....	71
3.6.11 Análisis sensorial	72
3.6.12 Análisis de microestructura mediante observación con microscopio electrónico de barrido.....	73
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
4.1. Aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas sobre la materia prima (carne picada) para la elaboración de hamburguesas de carne bovina	74
4.1.1 pH	75
4.1.2 Parámetros cromáticos	76
4.1.3 Análisis del perfil de textura.....	79
4.1.4 Esfuerzo y trabajo de corte.....	80
4.1.5 Pérdida de peso por cocción y humedad expresable	82
4.1.6 Análisis del comportamiento térmico de las proteínas cárnicas de la materia prima y las hamburguesas	83
4.1.6.1 Comportamiento térmico de las proteínas de la materia prima tratada con APH	84
4.1.6.2 Comportamiento térmico de proteínas de hamburguesas elaboradas con materia prima tratada con APH.....	87

4.1.7 Análisis del perfil electroforético de las proteínas	89
4.1.7.1 Análisis de la solubilidad de las proteínas de carne picada tratada con APH.....	90
4.1.7.2 Análisis de la solubilidad de las proteínas extraídas de hamburguesas elaboradas con carne picada tratada con APH.....	92
4.1.8 Análisis de la microestructura de muestras de hamburguesa mediante microscopía electrónica de barrido.....	94
4.1.9 Conclusión	98
4.2. Aplicación de APH a hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales y con enzima transglutaminasa y fibra cítrica	100
4.2.1 pH	101
4.2.2 Parámetros cromáticos	103
4.2.3 Parámetros de textura (Análisis del Perfil de Textura, TPA).....	107
4.2.4 Esfuerzo y trabajo de corte.....	110
4.2.5 Pérdida de peso por cocción y humedad expresable	113
4.2.6 Análisis del comportamiento térmico de las proteínas cárnicas de hamburguesas elaboradas con distintas concentraciones de aditivos y tratadas con APH.....	116
4.2.7 Análisis del perfil electroforético de las proteínas	123
4.2.7.1 Efecto de los aditivos y la aplicación de APH sobre las proteínas sarcoplásmicas.....	123
4.2.7.2 Efecto de los aditivos y la aplicación de APH sobre las proteínas miofibrilares.....	124
4.2.8 Análisis de la microestructura de muestras de hamburguesa mediante microscopía electrónica de barrido.....	127
4.2.9 Optimización de los factores de diseño utilizando la función deseabilidad	133
4.2.10 Validación de los valores predichos mediante la función deseabilidad	135
4.2.11 Conclusión	141
4.3. Aplicación de tratamientos con APH a hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales y con compuestos antioxidantes.....	144

4.3.1 pH	145
4.3.2 Parámetros cromáticos	149
4.3.3 Parámetros de textura	155
4.3.4 Esfuerzo y trabajo de corte.....	159
4.3.5 Pérdida de peso por cocción y humedad expresable	163
4.3.6 Análisis de los parámetros de Oxidación de Lípidos (número de TBARS) y Capacidad Antioxidante	167
4.3.7 Análisis microbiológico	173
4.3.8 Análisis térmico	175
4.3.9 Caracterización molecular de extractos proteicos de hamburguesas	179
4.3.9.1 Caracterización de proteínas sarcoplásmicas.....	180
4.3.9.2 Caracterización de proteínas miofibrilares	181
4.3.10 Análisis de la microestructura de muestras de hamburguesa mediante microscopia electrónica de barrido.....	184
4.3.11 Conclusión	190
4.4. Evaluación del efecto del tratamiento con APH y de la formulación sobre la inactivación de un coctel de cepas nativas de STEC O157 inoculado en hamburguesas de carne bovina.....	192
4.4.1 Actividad de agua.....	194
4.4.2 Efecto de los distintos tratamientos sobre la inactivación de un coctel de cepas nativas de STEC O157 inoculado en hamburguesas de carne bovina.....	196
4.4.3 Análisis del efecto de los distintos tratamientos en la inactivación de la microbiota alterante en hamburguesas	201
4.4.4 Conclusiones	206
5. CONCLUSIONES GENERALES.....	207
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	212
7. ANEXOS.....	251

Capítulo 1

ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1. La carne: generalidades

El término “carne” tiene distintas definiciones. En algunas oportunidades se refiere solo a los músculos esqueléticos y otras veces se refiere a musculatura esquelética y otros tejidos comestibles de un animal. En un sentido general se define como carne a “aquellos tejidos animales que pueden emplearse como alimento” (Forrest y col., 1975; Lawrie, 1985), que pasaron por cambios bioquímicos y físicos tras la muerte del animal. El código alimentario argentino (CAA), define genéricamente como carne a la parte comestible de los músculos de bovinos, bubalinos, porcinos, ovinos, caprinos, llamas, conejos domésticos, nutrias de criadero, pollos, pollas, gallos, gallinas, pavitos, pavitas, pavos, pavas, patos domésticos, gansos domésticos y codornices, declarados aptos para la alimentación humana por la inspección veterinaria oficial antes y después de la faena. Con la misma definición se incluyen a los animales silvestres de caza o criados en cautiverio, pescados, crustáceos, moluscos y otras especies comestibles. Por extensión se considera carne al diafragma y músculos de la lengua, no así los músculos de sostén del aparato hioideo, el corazón y el esófago. La carne será limpia, sana, debidamente preparada, y comprende a todos los tejidos blandos que rodean al esqueleto, incluyendo su cobertura grasa, tendones, vasos, nervios, aponeurosis y todo aquel tejido no separado durante la operación de la faena.

La carne es un producto muy heterogéneo ya que la composición química y los atributos tecnológicos y sensoriales son altamente influenciados por el manejo *ante mortem* (raza, sexo, edad, peso y condiciones de producción como tipo de sistema, alimentación, estrés previo a la faena, etc.) y factores *post mortem* (velocidad de enfriamiento, temperatura, tiempo de almacenamiento, estimulación eléctrica, condiciones de envasado, etc.) (Lawrie, 1985; Venel y col., 2001; Andrés y col., 2007).

1.2. Importancia de la carne en Argentina

Mientras que en los países desarrollados el consumo de carne no ha registrado importantes variaciones, el consumo anual per cápita de carne en los países en desarrollo se ha duplicado desde 1980. El crecimiento demográfico y el incremento de los ingresos, junto con los cambios en las preferencias alimentarias, han producido un aumento de la demanda de productos pecuarios. Según las

proyecciones, la producción mundial de carne se duplicará para el año 2050 y se prevé que la mayor parte del crecimiento se concentrará en los países en desarrollo. El creciente mercado de la carne representa una importante oportunidad para los productores pecuarios y los elaboradores de productos cárnicos de estos países. No obstante, el incremento de la producción ganadera y la elaboración y comercialización de carne y productos cárnicos conformes a las normas higiénico-sanitarias supone un serio desafío (FAO, 2016).

El mercado cárnico argentino se ha caracterizado históricamente por un alto consumo de carne bovina, no obstante, la nueva realidad que presenta este sector en los últimos años exhibió una caída, con una lenta recuperación. Mientras tanto, otros sectores de la industria cárnica, en particular el aviar y el porcino fueron ganando terreno. Sin embargo, el consumo de carne bovina presenta un patrón marcadamente diferente con respecto al consumo de carne aviar y porcina. A nivel mundial Argentina ha ocupado la primera posición en términos de consumo de carne bovina per cápita en el año 2013. (Bolsa de Comercio de Córdoba, 2013).

La Cámara de Industria y Comercio de Carnes de la República Argentina (CICCRA) informó que el consumo por habitante de carne bovina en Argentina habría sido de 61,8 kg por año en el primer mes del año 2017, lo que representa un aumento con respecto al promedio del año anterior (56,9 kg). Con respecto a los productos derivados de la carne, en el caso de las hamburguesas, en el país se consumen 56.000 toneladas de hamburguesas por año, esta cifra representa el 2 % de los 2,8 millones de toneladas de carne que se producen anualmente (Manzoni, 2015). La base de datos de la FAO (FAOSTAT 2014), registra que la fuente más importante de proteínas (uno de los nutrientes principales de la dieta) en Argentina es la carne bovina (Figura 1.2).

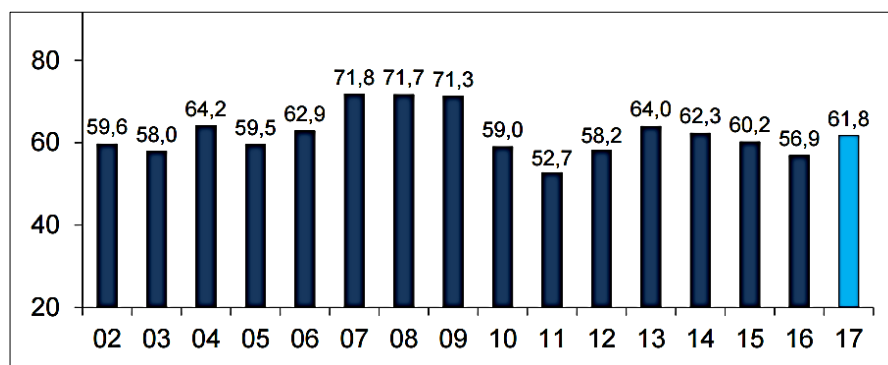


Figura 1.1. Consumo de carne bovina (kg/per cápita/año, de enero de 2002 a enero de 2017). (Cámara de la Industria y Comercio de Carnes de la República Argentina- CICCRA, 2017).

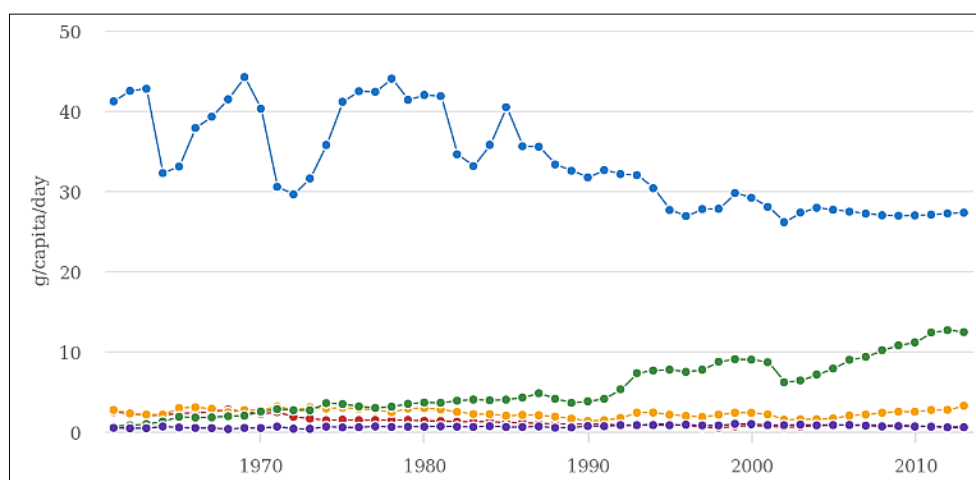


Figura 1.2. Suministro de proteína (g/per cápita/día): carne bovina (azul), carne de ave (verde), carne porcina (amarillo), carne ovina y caprina (violeta), otros (rojo). (FAOSTAT, 2014).

1.3. Composición e importancia nutricional de la carne

La carne y los productos cárnicos contienen importantes niveles de componentes nutricionales esenciales. Proveen proteínas de alto valor biológico y presentan mayor proporción de aminoácidos esenciales comparados con los alimentos de origen vegetal. Además, suministran otros nutrientes, entre ellos ácidos grasos esenciales como linolénico, linoleico y araquidónico. A su vez, la carne y los productos cárnicos son una fuente importante de vitamina A, vitaminas del complejo B y minerales como fósforo, Hierro, cobre, magnesio y cinc (Fennema y Tannenbaum, 2001). Entre los minerales, el mayor interés se relaciona con el Hierro, por una disponibilidad mayor que la presente en otros alimentos como cereales y leguminosas (Hopkins, 1981). El Hierro hemo de la carne presenta una excelente absorción y, además, incrementa la absorción del Hierro disponible en otras fuentes alimenticias (Godber, 1994).

La composición promedio de una fracción comestible de carne bovina fresca libre de grasa subcutánea es: agua (65-80 %), proteínas (16-22 %), lípidos (1,5-13 %), carbohidratos (0,5-1,5 %) y cenizas (1 %) (Forrest y col., 1975). El contenido de proteínas de la carne es superior al de la mayoría de los alimentos de origen vegetal. Los lípidos de la carne (sin incluir el tejido adiposo subcutáneo) aparecen principalmente entre los haces de fibras musculares, existiendo además lípidos intracelulares. En general se considera que estos lípidos tienen un mayor grado de

insaturación que los del tejido adiposo. El contenido en carbohidratos es bajo y está constituido principalmente por el glucógeno, además de pequeñas cantidades de glucosa, mono y disacáridos e intermediarios del metabolismo glucolítico (Bodwell, 1977; Bodwell y col., 1981).

1.4. Estructura del músculo y proteínas de la carne

La unidad estructural del músculo esquelético es una célula muy especializada llamada fibra muscular, que normalmente tiene un diámetro equivalente de entre 20 y 100 μm (Figura 1.3). La longitud puede variar de unos pocos milímetros a decenas de centímetros. Cada fibra muscular contiene entre 1000 y 2000 miofibrillas, estructuras largas y finas de aproximadamente 1 o 2 μm de diámetro, su eje mayor es paralelo al de la fibra muscular, extendiéndose a lo largo de la célula (Forrest y col., 1979; Regenstein y Regenstein, 1984). Las miofibrillas presentan elementos estructurales de dos tipos distintos, los filamentos gruesos y delgados. Estos dan la apariencia de bandas claras y oscuras en los cortes longitudinales de preparados histológicos (Murai y col., 1995). La banda clara es monorefringente cuando se observa con luz polarizada, se describe como isotrópica y se llama banda I, contiene mayormente moléculas de actina. La amplia banda oscura presenta doble refringencia a la luz polarizada, es anisotrópica y se llama banda A, contiene moléculas de miosina. La banda I está dividida por una banda oscura estrecha llamada línea Z, que es una estructura densa (Vigoreaux, 1994). La porción de miofibrilla comprendida entre dos líneas Z adyacentes se llama sarcómero y comprende una banda A y dos medias bandas I que se localizan a cada lado de la banda A. El sarcómero es la unidad estructural repetitiva de la miofibrilla, así como la unidad básica en la que tiene lugar el ciclo de contracción-relajación muscular (Price y Schweigert, 1987). La longitud del sarcómero varía, pero se puede admitir una longitud media de 2,5 μm (Lawrie, 1985).

Las proteínas cárnicas pueden clasificarse en función de su solubilidad en sarcoplásmicas (como la mioglobina, hemoglobina, enzimas asociadas a la glucólisis, al ciclo del ácido cítrico y a la cadena transportadora de electrones), miofibrilares (como la actina, miosina, troponina, tropomiosina, actininas α y β , proteína C y proteína M) y proteínas del estroma, las cuales son proteínas constituyentes del tejido conectivo que envuelve a la fibra -endomio-, al fascículo o haz de fibras -perimio- y al músculo -epimio- (Forrest y col., 1975). A continuación, se describen las principales proteínas cárnicas que influyen sobre la calidad de la carne y de los productos cárnicos.

1.4.1 Proteínas sarcoplásmicas

Las proteínas sarcoplásmicas son solubles a una fuerza iónica menor o igual a 0,1 M a pH neutro. Constituyen el 30-35 % de la proteína total en el músculo esquelético y representan al menos entre 100 y 200 proteínas diferentes (Goll y col., 1977). Tienen un tamaño molecular relativamente pequeño, presentan una estructura globular y generan baja viscosidad (Asghar y col., 1985). La mioglobina es la proteína sarcoplásmica más importante, responsable del color de la carne, atributo que define la compra del producto por parte del consumidor, en el caso de carne fresca (Kijowski, 2001). El color de la carne depende no sólo de la concentración de mioglobina, sino también del estado químico de la molécula de mioglobina (Howell y Lawrie, 1984).

La mioglobina actúa como depósito o transportador de oxígeno en el músculo vivo. El oxígeno que llega al músculo con la hemoglobina difunde desde los capilares sanguíneos a la fibra muscular, donde es unido a la mioglobina para su posterior uso en el metabolismo aerobio. La molécula de mioglobina consta de un grupo proteico, la globina, y de un grupo prostético hemo, con un átomo de Hierro y un anillo de porfirina que consta de cuatro grupos pirrólicos (Cross y col., 1986). El átomo de Hierro presenta seis enlaces de coordinación, cuatro de los cuales están ocupados por el anillo de porfirina, y el quinto se une al nitrógeno imidazólico de una histidina de la cadena polipeptídica. El sexto enlace de coordinación queda libre para unirse al oxígeno o a otras moléculas, determinando las propiedades y el color del complejo (Bodwell y McClain, 1971).

La mioglobina, en la carne fresca, está presente en tres formas diferentes que se intercambian constantemente (Figura 1.4): mioglobina reducida o desoximioglobina, de color rojo púrpura, con Hierro ferroso (Fe^{2+}) cuando la presión parcial de oxígeno es baja, como en el interior de la carne. Mioglobina oxigenada u oximioglobina, de color rojo brillante, con Hierro ferroso (Fe^{2+}), que se forma cuando la proteína está en contacto con el oxígeno, como en la superficie de la carne y mioglobina oxidada o metamioglobina, de color pardo, con Hierro férrico (Fe^{3+}). La mioglobina reducida de color púrpura, en presencia de oxígeno, se puede transformar en oximioglobina, confiriendo el color rojo brillante típico a las carnes frescas (Clydesdale y Francis, 1971), o en metamioglobina, que produce un color marrón menos deseado (Hood y Riordan, 1973). En la carne fresca la producción de sustancias reductoras naturales provoca la reducción continua de metamioglobina a mioglobina, siempre que exista oxígeno en el medio (Cross y col., 1986).

1.4.2 Proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares son la mayor fracción proteica del tejido muscular y constituyen la miofibrilla. Tienen una solubilidad intermedia y tienen una alta capacidad de emulsificar y de retener agua. Las proteínas miofibrilares son responsables de las propiedades texturales de la carne y de los productos cárnicos (Yasui y col., 1982; Asghar y col., 1985). La adición de sales en la elaboración de estos productos es de suma importancia ya que las sales participan en la extracción, solubilización y en el desplegamiento de estas proteínas, debido a este cambio de conformación de las proteínas, estas forman una estructura tridimensional tipo gel cuando el producto cárnico es sometido a cocción, donde el agua, la grasa y otros constituyentes de la carne son retenidos (Sofos, 1989; Trout y Schmidt, 1986).

En los límites de la banda A (uniones bandas A-I) en las fibras cárnicas *post rigor*, los filamentos delgados (actina) y gruesos (miosina) están unidos a través de la formación del complejo actomiosina. Las proteínas miofibrilares están compuestas del complejo actomiosina (15-20 % de actina y 50-55 % de miosina) que son conocidas también como proteínas contráctiles y seis proteínas reguladoras, tropomiosina (5-8 %), troponina (5-8 %), α -actinina (2-3 %), β -actinina (0,5-1 %), proteína C (2-3 %) y proteínas de la línea M (3-5 %). Las proteínas reguladoras controlan la interacción actina-miosina y regulan el ensamblaje de las proteínas miofibrilares individuales en los miofilamentos (Goll y col., 1977).

1.4.2.1 Miosina

La miosina presente en el tejido muscular (miosina II) es la proteína miofibrilar más abundante del músculo, tiene un peso molecular de 500 kDa, está formada por dos cadenas enrolladas entre sí, que presentan varias zonas α -hélice hacia uno de sus extremos, y hacia el otro, varios grupos sulfhidrilo, que forman la parte más voluminosa y activa de la molécula, porque se relaciona con la actina y posee actividad GTPásica (Lowey y col., 1969), es la principal proteína contráctil. La miosina contiene seis cadenas polipeptídicas, ensambladas en una estructura cuaternaria. La región de la cola está formada por dos cadenas pesadas (CPM) enrolladas en una estructura α -helicoidal, cada cadena pesada consta de una cabeza globular. Dos cadenas ligeras (CLM) se asocian con el cuello de cada región de la cabeza que unen las cadenas pesadas. Las funciones biológicas de la miosina residen en las cadenas pesadas (Bailey, 1982; Bechtel, 1986; Fennema y Tannenbaum, 2001).

La miosina es la proteína muscular que posee mayor capacidad de retención de agua, de emulsificación y de gelificación, propiedades funcionales muy importantes en tecnología de alimentos (Carballo y López de Torre, 1991).

1.4.2.2 Actina

La actina es una proteína globular, constituida por una cadena polipeptídica simple que forma un monómero que puede unir una molécula de nucleótido (adenosín trifosfato (ATP) o adenosín difosfato (ADP)) y un catión divalente (calcio o magnesio) (Straub y Feuer, 1950). Los filamentos delgados están formados principalmente por dos tipos de moléculas de actina, que presentan dos formas, globular o actina G, que se polimeriza favorecida por la β -actinina, y forma la actina fibrosa o actina F (Swatland, 1991). Posteriormente se descubrió que también existe una forma L-actina que favorece la polimerización de la G-actina y su transformación en F-actina (Bechtel, 1986). La actina tiene un elevado valor biológico por su contenido de triptófano y cistina.

1.4.2.3 Tropomiosina

Es una molécula α -helicoidal formada por dos cadenas, que presenta dos tipos de subunidades, α y β (Cohen y Holmes, 1963). Su composición en aminoácidos es similar a la de la miosina (Lehrer, 1975) y se coloca en los surcos que forman al enrollarse las dos F-actinas, estabilizando el filamento delgado. La tropomiosina se encuentra generalmente unida a la troponina formando la tropomiosina activa (Stone y Smillie, 1978).

1.4.2.4 Troponina

Es importante en la relajación-contracción muscular (Mannherz y Goody, 1976). Está formada por tres fracciones, la troponina T (unida fuertemente a la tropomiosina), la troponina C (se une a los iones calcio) y la troponina I (inhibe la interacción entre miosina y actina). Al iniciarse la contracción muscular se libera una gran cantidad de iones calcio desde el retículo sarcoplásmico, que son ligados por la troponina C, con lo que aumenta la afección por las otras dos fracciones de troponina, dejando libre a la actina para formar complejo con la miosina (Bechtel, 1986).

Existe otra serie de proteínas que ejercen funciones reguladoras, como las actininas, que regulan el estado físico de la actina (Price y Schweigert, 1994), o como las denominadas proteínas reguladoras menores, asociadas a los filamentos de

miosina y actina. Algunas de ellas son: la proteína C, la proteína M, la proteína F y la proteína I (Moss y col., 1975; Masaki y Takaiti, 1972, 1974; Ohashi y col., 1977; Maruyama y col., 1977a).

Las proteínas del citoesqueleto representan una clase de proteínas que desempeñan un papel estructural en la arquitectura de la miofibrilla y de la célula muscular. Se cree que estas proteínas dan continuidad mecánica a lo largo de la miofibrilla, y que en última instancia son las que proporcionan elasticidad a la fibra. Las más importantes son la conectina y la titina (Maruyama y col., 1977b; Granger y Lazarides, 1978; Toyoda y Maruyama, 1978; Wang y col., 1979; Ohashi y Maruyama, 1980; Maruyama y col., 1981).

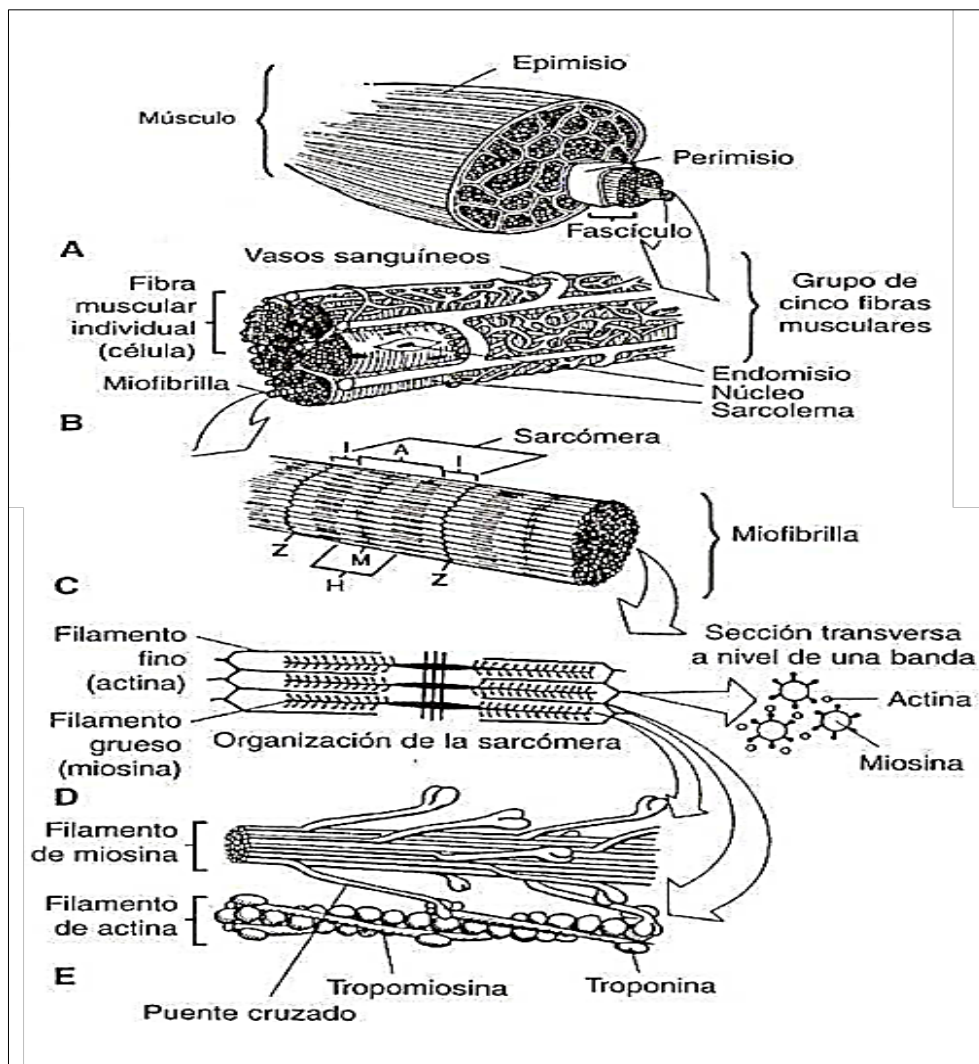


Figura 1.3. Diagrama esquemático de la organización estructural del tejido muscular (Williams y Warwick, 1980).

1.4.3 Proteínas del estroma

Las proteínas del estroma también son conocidas como proteínas del tejido conectivo (o conjuntivo). A este grupo pertenecen el colágeno, la elastina y algunas proteínas de la membrana celular. Ellas exhiben una estructura fibrosa. El colágeno de tipo I es el más prevalente cuantitativamente.

El colágeno comprende el 20-25 % de la proteína total. Es la principal proteína en hueso, tendón y piel. Su molécula está construida por tres cadenas polipeptídicas helicoidales, que se estabilizan mediante enlaces intermoleculares e intramoleculares, tiene un peso de aproximadamente 300 kDa. Una parte del colágeno es soluble en disoluciones salinas neutras, otra parte es soluble en ácido y una tercera es insoluble (Fennema y Tannenbaum, 2001). El colágeno se caracteriza por experimentar una contracción mediante un tratamiento térmico.

La dureza de la carne está relacionada con el colágeno. Con la edad del animal, se forman más enlaces covalentes dentro y entre las moléculas de colágeno. Esto contribuye significativamente a la dureza de la carne (Asghar, Samejima y col., 1985; Pearson y Gillett, 1999). Las proteínas estromales no poseen capacidad de gelificación, por lo que solo se observa coagulación por encima de 80 °C (Ziegler y Acton, 1984).

1.5. Parámetros de calidad de la carne y productos cárnicos

La carne, al igual que la mayoría de los alimentos, debe poseer características que la hagan aceptable al consumidor, por lo que deberá reunir una serie de requisitos enmarcados dentro del concepto de calidad.

Wood (1990) define como calidad de la carne al conjunto de características logradas durante la producción, el procesado y la conservación, que permiten brindar al consumidor un producto diferenciado y que cumpla tres requisitos: el valor nutritivo (composición química), la seguridad (higiene y ausencia de contaminantes) y la satisfacción al consumirla (características organolépticas).

1.5.1 Parámetros cromáticos

El color es probablemente la primera característica que el consumidor asocia con la calidad y la aceptabilidad de los alimentos, por ello es importante revisar algunos procesos bioquímicos involucrados en la formación de color en la carne.

La mioglobina es la principal proteína hemínica responsable del color de la carne (Livingston y col., 1983). Otras hemoproteínas como la hemoglobina y el citocromo C también tienen un rol en el color de la carne bovina, de cordero, de cerdo y de pollo (Mancini y Hunt, 2005).

La longitud exacta de la cadena polipeptídica de mioglobina es dependiente de la especie, pero contiene en promedio 153 residuos en mamíferos y una estructura secundaria que es el 80 % α -hélice (Antonini, 1965).

El Hierro hemo puede existir en forma de ion ferroso reducido ($2+$), o como férrico oxidado ($3+$). La oximioglobina es la forma oxigenada de la mioglobina con el Hierro en forma reducida (Fe^{2+}), ocupando el oxígeno el sexto enlace de coordinación. Este pigmento es el responsable del color rojo brillante, deseable en la carne fresca (King y Whyte, 2006; Fennema y Tannenbaum, 2001). La desoximioglobina presenta el Hierro reducido (Fe^{2+}), tiene desocupada la sexta posición de coordinación, siendo su color rojo púrpura y encontrándose en ausencia de oxígeno como por ejemplo en el interior de la pieza cárnica o en carnes envasadas a vacío. Estas dos formas reducidas de la mioglobina rápidamente se oxidan a la “indeseable” metamioglobina, que tiene el Hierro en su forma oxidada (Fe^{3+}) y agua en el sexto enlace de coordinación siendo de color marrón. La metamioglobina es incapaz de unir oxígeno y así está fisiológicamente inactiva (Faustman y Cassens, 1990).

En la carne también pueden aparecer otros pigmentos derivados de la mioglobina. La formación de coloraciones verdes en la carne fresca fue descrita por Jensen (1945), y está asociada a una alteración en la estructura del grupo hemo (Lawrie, 1985). Existen dos posibles derivados de la mioglobina responsables de una apariencia verde. La cooglobina resulta de la interacción entre la mioglobina (Hierro ferroso o férrico) y peróxido de hidrógeno (Lawrie, 1985) y su formación se favorece a valores de pH entre 4,5 y 6,0 (Fox y col., 1974). La fuente de peróxido de hidrógeno puede ser bacteriana (Jensen, 1945), resultado de la interacción del ácido ascórbico con la molécula de oxígeno de la oximioglobina (Fox, 1966), o ser producido por el propio músculo (Harel y Kanner, 1985). La sulfomioglobina es el segundo derivado de la mioglobina capaz de impartir color verde a la carne fresca. Este pigmento se forma por la acción del sulfuro de hidrógeno y el oxígeno sobre la mioglobina reducida (Lawrie, 1985). También la producción bacteriana de sulfuro de hidrógeno facilita el desarrollo de coloraciones verdes en la carne (Egan y col., 1980).

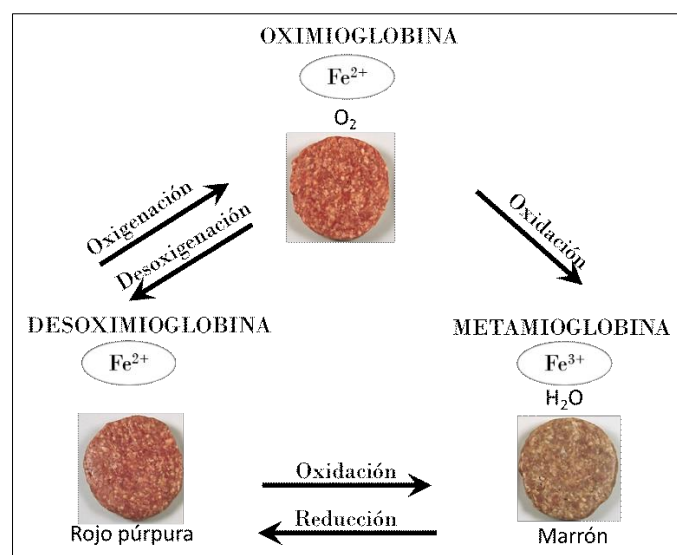


Figura 1.4. Esquema de la relación entre las distintas formas químicas de la mioglobina y su contribución al color de la carne.

1.5.2 pH

El pH es otro factor que influye sobre las velocidades de varias reacciones químicas y enzimáticas. Generalmente, para inhibir intensamente el crecimiento microbiano y los procesos enzimáticos se requieren valores extremos de pH. Como contraste, en la carne, los cambios de pH relativamente pequeños ocasionan profundas modificaciones de su calidad (Fennema y Tannenbaum, 2001).

El pH del tejido muscular del animal vivo es prácticamente neutro (7,0-7,2). En la etapa *post mortem* se produce ácido láctico a partir del glucógeno muscular, como producto de la glucólisis anaerobia que tiene lugar al detenerse el aporte de oxígeno. Mientras en el músculo haya glucógeno se producirá ácido láctico, descendiendo el pH hasta que se interrumpen los fenómenos glucolíticos. Por otra parte, la hidrólisis del ATP también ocasiona un incremento de la concentración de los iones H^+ en el músculo, éstos contribuyen al descenso del pH *post mortem* en un 10 % (Hamm, 1977).

El pH de la carne depende de la especie, en el caso de carne bovina corresponde al rango 5,4-5,7; siendo el óptimo 5,5. Un pH elevado (>6,0) en carne bovina se caracteriza por carnes más oscuras, con una mayor capacidad de retención de agua, consistencia firme, aspecto seco de la superficie (Fischer y Hamm, 1980), estas carnes se denominan oscuras, firmes y secas y en inglés por la sigla DFD (*dark, firm and dry*) y se producen con mayor frecuencia en carne bovina y ovina y ocasionalmente en carne de cerdo y de pavo. El agua es retenida (alejamiento del

punto isoeléctrico de las proteínas y por ello abundancia de cargas libres que fijan al dipolo H₂O) y el músculo es empaquetado regularmente con pocos espacios extracelulares. La luz es absorbida por la estructura ordenada y traslúcida, la reflexión es baja y las superficies aparecen oscuras. El elevado pH es causado por la utilización de las reservas de glucógeno muscular antes del sacrificio, con lo cual la formación de ácido láctico *post mortem* es escasa (Dougall, 1970).

Un pH bajo (menor a 5,4-5,5), próximo al punto isoeléctrico de las proteínas (escasas cargas que fijan al dipolo H₂O), dará carnes más claras, blandas y con menor poder de retención de agua. Estas carnes se dominan pálidas, blandas y exudativas y en inglés PSE (*Palid, Soft and Exudative*). En estos músculos tiene lugar un metabolismo glicolítico rapidísimo, que determina velocidades de descenso del pH y de desaparición del ATP muy rápidas. Las fibras musculares separadas producen una estructura desordenada con un gran espacio extracelular y la luz se refleja en mayor proporción desde la superficie (Dougall, 1970). En este caso el glucógeno se conserva hasta el sacrificio, pero en los momentos inmediatamente previos al mismo se produce un gran estrés que determina un rápido consumo de glucógeno y descenso del pH, todo esto a una temperatura alta (prácticamente de animal vivo).

Así el color, la jugosidad, la textura e incluso el aroma y el *flavor* están directa o indirectamente relacionados con el pH de la carne (Lawrie, 1985).

1.5.3 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA) es un parámetro fisicoquímico importante por su contribución a la calidad de la carne y la de sus productos derivados. Este término se emplea para describir la eficacia de una matriz para mantener ligada su propia agua y también agua añadida bajo la influencia de fuerzas externas (presión, calor, vacío, etc.) (Hamm, 1960).

El contenido de agua de la carne magra es de aproximadamente 75 % p/p. La mayor parte de esta se mantiene tanto en el interior de las miofibrillas como entre ellas, entre las miofibrillas y el sarcolema, o bien entre las células musculares y entre los haces de fibras (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005). Una pequeña fracción del total del agua presente en la carne (0,5 g de agua cada 1 g de proteína) se encuentra fuertemente unida a la superficie de las proteínas mediante uniones puente de hidrógeno o bien puede estar presente en hendiduras, y se la denomina agua ligada (Offer y Knight, 1988). Otra fracción se encuentra como agua inmovilizada, la cual se mantiene unida por efectos estéricos (espacio) y/o por fuerzas de atracción con el

agua ligada (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005). La mayor cantidad de agua, aproximadamente el 95 %, se encuentra en estado de agua libre y se mantiene por las proteínas miofibrilares, en la estructura que estas forman (Offer y Knight 1988).

Los cambios en la CRA son un indicador muy sensible de los cambios en la estructura y funcionalidad de las proteínas miofibrilares (Hamm, 1972; Honikel y col., 1986), así la desnaturalización y la formación de agregados de las proteínas provoca disminución de la CRA.

La CRA de la carne está relacionada con la textura, la ternera, el color, la jugosidad y la firmeza de la carne y productos cárnicos cocidos (Hamm, 1960).

1.5.4 Propiedades de textura

Las propiedades de textura de los alimentos son un factor importante, ya que de ellas depende en buena medida la aceptación de estos. Esta aceptación puede estimarse por métodos sensoriales (sentidos) o fisicoquímicos. Los métodos instrumentales están basados en la medición y cuantificación de magnitudes físicas como la fuerza, la deformación y el tiempo y son por lo tanto fundamentales.

Según Bourne (1982) y Szczesniak (1963) las propiedades texturales de un alimento son las características físicas que surgen de los elementos estructurales del alimento, que son detectados por el tacto, están relacionados con la deformación, desintegración, y el flujo del alimento bajo una fuerza, y son medidos objetivamente por funciones de masa, tiempo y distancia. Otro concepto similar de la textura es el que define la Organización Internacional de Normalización como "todos los atributos mecánicos, geométricos y superficiales de un producto perceptibles mediante receptores mecánicos, táctiles y receptores visuales y auditivos" (ISO, 1994).

En la carne cocida, Dransfield y col. (1984) señalan que los componentes principales de la textura son la ternera y la jugosidad. Las carnes menos jugosas son consideradas menos tiernas. La ternera es la cualidad de la carne de dejarse cortar y masticar (con mayor o menor facilidad) antes de la deglución, estando directamente ligada a la resistencia mecánica del producto. El caso contrario sería la dureza, definida como la propiedad de la textura manifestada por una alta y persistente resistencia a la rotura en la masticación (Jowitt, 1974). La firmeza se define como la propiedad de la textura manifestada por una alta resistencia a la deformación por aplicación de una fuerza, siendo registrada tras los primeros mordiscos. El estado de

las miofibrillas del tejido muscular, la cantidad y el tipo de tejido conectivo y la cantidad de grasa determinan la textura de la carne.

La textura de un producto cárnico picado/triturado se debe principalmente a la interacción inter-partículas y a la funcionalidad de las propiedades gelificantes para producir una textura deseable. En general, las proteínas de interés en la gelificación de la carne son las miofibrilares, ya que tienen la capacidad de estabilizar la grasa y el agua.

1.5.5 Aroma y sabor

Muchas de las reacciones psicológicas y fisiológicas que despierta la carne derivan de una impresión compleja resultante de la percepción de su sabor y aroma. El aroma y el sabor son propiedades sensoriales de gran importancia para el consumidor, ya que en combinación con el color y la textura determinan la calidad, aceptación o rechazo de la carne y los productos cárnicos. El aroma y el sabor de la carne se generan cuando esta se cocina, dado que la carne cruda posee un sabor metálico similar a la sangre. Cuando la carne se somete a cocción se sucede una serie compleja de reacciones en donde compuestos precursores como aminoácidos, péptidos, azúcares, lípidos, etc. reaccionan entre sí generando una gran variedad de compuestos volátiles y no volátiles que imparten el aroma y sabor propios de la carne cocida. Igualmente, la grasa presente en la carne está intrínsecamente ligada al sabor que es característico de cada especie animal (Farmer, 1999).

Todos los parámetros que definen la calidad de la carne y los productos cárnicos están relacionados directa e indirectamente. Así, el color, la textura, la firmeza, la terneza y particularmente la jugosidad de la carne están fuertemente condicionados por la CRA. La terneza se relaciona con el pH, siendo mayor cuando el pH de la carne es menor a 5,8 y disminuyendo en el rango entre 5,8 y 6,3. Valores de pH superior a este último incrementan la terneza de la carne, pero facilitan el deterioro de esta. Incrementos en los niveles de glucógeno previo a la faena descenderán el pH a valores inferiores a 5,8 determinando que la carne resulte más tierna (Depetris y Santini, 2005).

1.6. Derivados cárnicos

Según el artículo 302 del Código Alimentario Argentino, se entiende por “chacinados”, a los productos preparados sobre la base de carne y/o sangre, vísceras u otros subproductos animales que hayan sido autorizados para el consumo humano,

adicionados o no con sustancias aprobadas a tal fin. Los chacinados se clasifican en embutidos (frescos, secos y cocidos) y no embutidos (frescos y cocidos).

Dentro de los **embutidos frescos** se encuentran: butifarra, codeguín, chorizo fresco, longaniza parrillera, salchicha fresca, salchicha tipo Oxford. **Embutidos secos**: cervelat, chorizo a la española, longaniza, longaniza a la española, longaniza napolitana, lomo embuchado a la española, salame, salamines, sopresatta a la italiana. **Embutidos cocidos**: burzot en cuero, morcilla, morcilla de hígado, morcillón con lengua, mortadela, pata rellena, salame ruso o tipo polonés, salchicha tipo Frankfurt, salchicha tipo Viena, salchichón con jamón, salchicha de carne sobreasada.

Entre los **chacinados no embutidos** cocidos se encuentran: arrollado criollo, burzot, cima, chinesco, fantasía, fiambre cocido de pata de cerdo, fiambre cocido de paleta de cerdo, fiambre cocido de lomo de cerdo, fiambre cocido de... (nombre/s de la/s especie/s) para sándwiches, florentina, galantina, galantina a la francesa, galantina de cabeza, galantina de lengua, galantina de lengua forrada, galantita italiana, galantina ojo de rey, galantina panceta arrollada, galantina tres en uno, galantita vienesa, lechón arrollado, matambre arrollado, picadillo de jamón, queso de cerdo, queso de cerdo alemán, queso de cerdo alemán colorado, rulada. Entre los **chacinados no embutidos frescos** se encuentran las hamburguesas.

1.6.1 Concepto de hamburguesa

En el artículo 330 del Código Alimentario Argentino, se define como “hamburgués” o “bife a la hamburguesa”, al producto de forma plana, elaborado exclusivamente con carne bovina picada con un contenido graso promedio en el lote no mayor al veinte por ciento (20 % p/p), sal, con o sin el agregado de antioxidantes, aromatizantes, saborizantes, especias, exaltadores de sabor, estabilizantes (únicamente fosfatos y polifosfatos) estabilizantes de color (excluyendo nitritos y nitratos) autorizados. No se admite el agregado de colorantes naturales y/o artificiales. En caso de utilizarse carnes distintas de la bovina, deberá denominarse “hamburgués de...” o “bife a la hamburguesa de...” seguido de la denominación de la o de las especies que lo componen. Según lo establece la Ley 26.905 (Regulación del Consumo de Sodio) las hamburguesas podrán contener como máximo 850 mg de Sodio por 100 g de producto. A diferencia de las hamburguesas, los medallones poseen una forma similar a estas, pero que no se ajusta exactamente a la definición de hamburgués o bife a la hamburguesa, ya que se consideran que estos pueden contener ingredientes como sustancias amiláceas hasta un máximo de 5 % y/o

proteínas de soja hasta un máximo de 2 % y se admite un porcentaje de grasa de hasta el 50 % p/p, pero las características generales y el proceso de elaboración es el mismo en ambos productos.

1.6.2 Ingredientes y aditivos utilizados en la elaboración de productos cárnicos

Según el Código Alimentario Argentino, ingrediente es toda sustancia, incluidos los aditivos alimentarios, que se emplea en la fabricación o preparación de un alimento y esté presente en el producto final en su forma original o modificada. Además, menciona que aditivo alimentario es cualquier ingrediente agregado a los alimentos intencionalmente, sin el propósito de nutrir, con el objeto de modificar las características físicas, químicas, biológicas o sensoriales, durante la manufactura, procesado, preparación, tratamiento, envasado, acondicionado, almacenado, transporte o manipulación de un alimento; podrá resultar que el propio aditivo o sus derivados se conviertan en un componente de dicho alimento. Esta definición no incluye a los contaminantes o a las sustancias nutritivas que se incorporan a un alimento para mantener o mejorar sus propiedades nutricionales.

A continuación, se describen los ingredientes y aditivos principales, entre otros, en la elaboración de productos cárnicos.

1.6.2.1 Agua

El agua es el componente más abundante de los alimentos, tiene importancia crítica en las cualidades deseables en los alimentos, es determinante de la velocidad de muchas reacciones químicas, tanto deseables como indeseables. A su vez es reactivo en las reacciones de hidrólisis, es el medio donde difunden especies químicas y es el principal componente de la estructura de los alimentos (Fennema y Tannenbaum, 2001).

El agua que se agrega en la elaboración de productos cárnicos debe ser de alta calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria dado el uso alimentario al que va a ser destinada. Conocer el pH y el grado de dureza del agua que va a ser usada es muy importante ya que ambos parámetros influyen sobre la funcionalidad de los aditivos y una concentración alta de iones puede afectar negativamente la capacidad de retención de agua del producto final. El agua puede agregarse al producto cárnico de dos maneras: combinada con el ingrediente no cárnico o agregado directamente.

1.6.2.2 Cloruro de Sodio

La sal de cocina o Cloruro de Sodio (NaCl), es uno de los ingredientes habitualmente empleados en la elaboración de productos cárnicos, es el ingrediente más antiguo utilizado por su acción conservante, debido a que es capaz de reducir la actividad de agua del producto y, por lo tanto, retrasar el crecimiento microbiano (Durand, 2002). La sal aporta el gusto salado a los productos cárnicos (debido principalmente al ion Na^+) y es además un agente potenciador del sabor. También es responsable del desarrollo de la textura, de la jugosidad, uniformidad del color y del incremento de los rendimientos totales del proceso (Desmond, 2006).

Se han postulado dos hipótesis que explicarían el rol del Cloruro de Sodio sobre la CRA de la carne (Ruusunen y Poulanne, 2005). La sal mejora la hidratación de las proteínas cárnicas, permitiendo el hinchamiento de estas proteínas (miofilamentos) e incluso provoca solubilización parcial de los filamentos. A valores de pH mayores al punto isoeléctrico de las proteínas, el Cloruro de Sodio a baja concentración incrementa notablemente la capacidad de retención de agua, mientras que a valores de concentración alta sucede lo contrario. A valores de pH por debajo del punto isoeléctrico, los iones Cl^- neutralizan las cargas positivas de las proteínas de manera que, al disminuir la repulsión entre ellas, se produce una contracción de la estructura proteica que origina una pérdida de la CRA. Honikel (1988) propuso que los iones Cl^- , a pH mayores al punto isoeléctrico debilitan las uniones entre los grupos de signo contrario de las cadenas proteicas y llegan a interactuar con los grupos cargados positivamente. Esto induce un aumento de la carga eléctrica negativa de las proteínas miofibrilares que se repelen entre sí, por lo que la estructura proteica se relaja y aumenta la CRA. Los factores que inhiben el hinchamiento ilimitado de los filamentos son los puentes cruzados de actomiosina entre los mismos y la línea Z. La cantidad de agua ligada está determinada por la carga neta de las proteínas, y el número y la fuerza (resistencia) de los puentes cruzados que limitan la unión. No obstante, esta hipótesis no tiene en cuenta el efecto de los contraiones, como, por ejemplo, los iones Sodio.

Por otra parte, Offer y Knight (1988) sugirieron una hipótesis alternativa también basada en una unión selectiva de los iones Cloruro a las proteínas miofibrilares. Estos autores postularon que el hinchamiento ocurre por un mecanismo entrópico impulsado por las partes libres de la meromiosina liviana unidas a los filamentos de actina. Los iones Cl^- se unen selectivamente a las proteínas, pero debido a que las proteínas estructurales son sólidas e inmóviles en la carne, las fuerzas

electrostáticas empujan a los contraiones (iones Na^+) muy cerca de la superficie de los filamentos creando así una distribución no uniforme de los iones en la fase acuosa. Esto establece una fuerza de tipo osmótica en el interior de la red de filamentos, atrayendo moléculas de agua dentro del sistema. Esto causaría un hinchamiento ilimitado pero los puentes cruzados causan una fuerza opuesta a la cual Offer y Knight (1988) llamaron “presión elástica”. El sistema alcanzaría el equilibrio en el momento que la presión osmótica creada por la distribución no homogénea de los iones y la presión elástica se hacen iguales.

La contribución del NaCl a la extracción y solubilización de las proteínas cárnicas y al desplegamiento de la conformación nativa es fundamental. Esto se debe a que es responsable del principal aporte de la fuerza iónica al producto. Asimismo, en el caso de productos cárnicos preparados con pastas o con emulsiones cárnicas, la extracción y solubilización de las proteínas miofibrilares contribuyen a la emulsificación de la grasa y a la mayor cohesión entre partículas, mejorando la textura del producto. Debido al cambio de conformación de las proteínas, éstas forman una estructura tridimensional tipo gel cuando el producto es cocido, en el cual el agua, la grasa y otros constituyentes de la carne son retenidos (Sofos, 1989; Trout y Schmidt, 1986).

1.6.2.3 Fosfatos

Los fosfatos son compuestos frecuentemente incluidos en la formulación de los productos cárnicos, ya que incrementan la CRA y el rendimiento, mejoran la unión (*binding*) entre las piezas y minimizan la rancidez oxidativa, entre otros (Sofos, 1989). Estos efectos están fundamentados en diversos factores, entre ellos, incremento del pH, de la fuerza iónica y de la capacidad secuestrante de cationes y su interacción con las proteínas miofibrilares.

La incorporación de fosfatos produce un aumento del pH del producto, a valores mayores al punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares (pI 5,4); las proteínas se despliegan y reaccionan con las moléculas de agua para compensar las cargas internas desbalanceadas (Sofos, 1989).

La incorporación de fosfatos a la carne y productos cárnicos aumenta la fuerza iónica, sin embargo, este incremento depende de su capacidad de disociación. A medida que la longitud de la cadena de estas sales se incrementa, disminuye su grado de disociación, lo cual resulta en menores valores de fuerza iónica con polifosfatos de cadenas largas comparados con cantidades similares de polifosfatos de cadena corta (Trout y Schmidt, 1986).

Trout y Schmidt (1986) explicaron el aumento en la funcionalidad en términos del efecto opuesto de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. A baja fuerza iónica los fosfatos alteran la conformación de las proteínas modificando las interacciones electrostáticas. Sin embargo, a medida que aumenta la fuerza iónica los efectos electrostáticos de los fosfatos disminuyen. Una vez que se reducen los efectos electrostáticos, los efectos hidrofóbicos se vuelven dominantes (Trout y Schmidt, 1986).

Otros investigadores atribuyen la acción de los polifosfatos y su relación con la capacidad para disociar el complejo actomiosina, formado por las proteínas miofibrilares actina y miosina, durante el transcurso del *rigor mortis*. La disociación del complejo actomiosina permitiría al ordenamiento miofibrilar expandirse lateralmente, incrementando la retención de agua.

Otro modo potencial de acción de los fosfatos es a través de su actividad quelante de cationes como calcio, magnesio y zinc. La especulación es que estos metales son quelados y removidos de las proteínas, las cuales abren su estructura, mejorando así la CRA (Sofos, 1989).

Actualmente se admite que el efecto de los fosfatos está basado principalmente en su interacción con las proteínas miofibrilares. Además, los fosfatos pueden ejercer un efecto diferente si se encuentran solos o en presencia de Cloruro de Sodio ya que ambos ingredientes actúan de forma sinérgica.

Los fosfatos poseen también capacidad antioxidante, influyendo sobre la estabilidad del color y del sabor (Sofos, 1989). Las reacciones de oxidación son las principales causas del deterioro del sabor y el color durante el almacenamiento de los productos cárnicos. Estas reacciones están catalizadas por los metales, en particular Hierro y Níquel. El Hierro es aportado por la carne y los dos metales por el desgaste del material y de los cuchillos manuales o asociados a la maquinaria. Por las mismas razones influyen sobre la estabilidad del color (Durand, 2002). Por otra parte, los fosfatos contrarrestan los efectos de deterioro del NaCl sobre el color de los productos cárnicos (Sofos, 1989).

1.6.2.4 Fibra alimentaria

El Código Alimentario Argentino en el artículo 1385, define fibra alimentaria como cualquier material comestible que no sea hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano. Incluye polisacáridos no almidón, pectinas, almidón

resistente, inulina, oligofruktosa, polidextrosa, maltodextrinas resistentes, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), transgalactooligosacáridos (TOS).

La fibra alimentaria se clasifica en soluble e insoluble. La celulosa es una fibra dietética insoluble. Es uno de los ingredientes funcionales más comunes en los productos alimenticios (Ang y Miller, 1991). La fibra dietética puede proveer una multitud de propiedades funcionales cuando es incorporada en sistemas alimentarios (Soukoulis y col., 2009). Ello se debe a que sus constituyentes pueden interactuar con los componentes de los alimentos durante el procesamiento, logrando cambios en la biodisponibilidad de los nutrientes, así como, en la textura y el sabor del producto final (Fernández y col., 1998). Además, la fibra se ha utilizado como sustituto de la grasa, agente de reducción de grasa durante la fritura, potenciador de volumen, aglutinante, agente de carga y estabilizante (Ang y Miller, 1991).

Algunos componentes de la fibra dietética son deseables no solo por sus propiedades nutricionales, sino también por sus propiedades funcionales y tecnológicas (Thebaudin y col., 1997). Algunas aplicaciones de fibra resultaron exitosas en la mejora del rendimiento de cocción y de la textura de los productos cárnicos (Akoh, 1998; Jiménez-Colmenero, 1996).

1.6.2.5 Enzima transglutaminasa

La enzima transglutaminasa (TG) se utiliza para incrementar la adhesión y mejorar la textura de los productos cárnicos. Esta enzima cataliza la polimerización y el entrecruzamiento de las proteínas a través de la formación de enlaces covalentes entre los restos de lisina y glutamina, aún a bajas temperaturas (Motoki y col., 1987; Nino y col., 1985). Esta enzima cataliza la reacción de transferencia entre los grupos γ -carboxiamida de residuos de glutamina en proteínas, péptidos y en varias aminas primarias. Cuando un grupo ϵ -amino de lisina actúa como receptor de grupos acil, resulta en una polimerización y un entrecruzado molecular de las proteínas vía formación de enlaces ϵ -(γ -glutamil) lisina. Esto ocurre a través del intercambio de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina por amonio en el grupo carboxiamida del residuo de la glutamina en la molécula de proteína. En la ausencia de aminas primarias, el agua puede tomar el papel del aceptor de grupos acil, resultando en la desaminación de los grupos γ -carboxiamida de residuos de glutamina para formar ácido glutámico (Belitz y col., 2009; Orrù y col., 2003)

La TG es un ingrediente muy útil en la aplicación de tecnologías innovadoras para la producción de alimentos a base de proteína (animal o vegetal). La TG se ha utilizado en la producción de productos cárnicos para mejorar la cohesividad. Además, Motoki y Seguro (1998) evidenciaron que la aplicación de TG mejoró la solubilidad, la retención de agua y la estabilidad térmica de proteínas. Por lo cual, las aplicaciones de esta enzima en productos cárnicos son muy variadas y versátiles.

1.6.2.6 Extracto de romero

Las investigaciones referidas al uso de extractos de origen vegetal fueron incrementando en las últimas dos décadas. Estos extractos se utilizan con el objeto de inhibir el deterioro oxidativo en productos cárnicos y prolongar su vida útil (Chen y col., 1999; Mc Carthy y col., 2001 a y b, Yu y col., 2002) y son ampliamente utilizados en la industria alimentaria. Los antioxidantes son utilizados en carnes frescas y procesadas para prevenir la rancidez oxidativa y el deterioro del color (Ismail y col., 2009).

El extracto de romero es el compuesto de ese grupo más usado comercialmente, con el objeto de extender la vida útil, retardar la aparición de “*off-flavor*” y evitar la pérdida del color y del *flavor* característicos de los alimentos (Sánchez-Escalante, 2001). La actividad antioxidante de los componentes del extracto de romero depende de la polaridad y estructura molecular de los mismos. Los componentes con mayor actividad antioxidante son el ácido carnósico y el carnosol. El ácido rosmarínico, de mayor polaridad, se concentra en la fase acuosa de las emulsiones O/W por lo que, su interacción con los hidroperóxidos en la interfase raramente ocurre. En cambio, el ácido carnósico y carnosol de menor polaridad, se localizan en la interfase de las emulsiones O/W donde los hidroperóxidos se hallan en contacto con los agentes oxidantes y prooxidantes (Zheng y Wang, 2001).

Varios autores estudiaron los efectos de la incorporación de extracto de romero en productos cárnicos, siguiendo dos métodos de aplicación, polvo seco y extractos en solventes orgánicos. Algunos autores sugirieron el uso a concentraciones entre 500 y 2500 ppm, informando que la adición de 2500 ppm de extracto de romero fue tan efectiva como los antioxidantes sintéticos tales como butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT) (Sebranek y col., 2005). El uso de estos antioxidantes sintéticos está siendo cuestionado en los últimos años, ya que se ha informado que tanto el BHA como el BHT presentarían actividad carcinogénica (Nakatani, 1992), por lo tanto, son cada vez menos utilizados en los alimentos.

La legislación de la Unión Europea (Reglamento nº 723/2013) permite el uso de extracto de romero (E 392) según el contenido de materia grasa en carne y productos cárnicos, en pescado y sus productos, en moluscos y crustáceos; excepto embutidos secos y carne deshidratada. Por lo tanto, establecen el nivel máximo de uso del extracto de romero en 15 mg/kg para los productos con un contenido de materia grasa no superior al 10 %, y un nivel máximo de 150 mg/kg (expresado en una base de grasas) para los productos con un contenido de materia grasa superior al 10 %.

1.6.2.7 Eritorbato de Sodio

El Eritorbato de Sodio ($C_6H_7NaO_6$) se produce a partir de diferentes azúcares, como los de caña de azúcar o de maíz. También se denomina isoascorbato de Sodio y su código INS es 316. El Eritorbato de Sodio es el isómero óptico del L-ascorbato de Sodio. La acción tecnológica de ambos compuestos es idéntica, aunque no desde el punto de vista nutricional, ya que el L-ascorbato de Sodio es un componente habitual en nuestra dieta: vitamina C o ácido ascórbico, mientras que el Eritorbato de Sodio, tiene una acción vitamínica correspondiente al 5 % de la que presenta el L-ascorbato de Sodio. Otra diferencia importante entre ambos es el precio, siendo más económico el Eritorbato de Sodio. Es por ello que cuando se incluye en las formulaciones con fines tecnológicos y no nutricionales, el compuesto de elección es el Eritorbato de Sodio.

El Eritorbato de Sodio se comercializa bajo la forma de sólido cristalino de color blanco, de olor y sabor neutro, que puede formar gránulos o polvo. El uso principal del Eritorbato de Sodio en la industria de los alimentos es como conservante, por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Wirth, 1990). Sus propiedades reductoras (efecto antioxidante), inhiben la formación de radicales de peróxido en la superficie, por acción de la luz ultravioleta y el oxígeno del aire. Proporciona estabilidad del color en el producto terminado y mejora el sabor, los cuales pueden ser mantenidos durante el almacenamiento y la distribución de los productos (Hui, 2001). En productos cárnicos curados contribuye a la formación y estabilización del color, debido a que reduce al nitrito a óxido nitroso, facilitando la formación de nitrosomioglobina, acelerando la formación del color rosado típico de los productos curados. También evita la formación de las nitrosaminas cancerígenas, bloqueando la formación de agentes nitrosantes a partir del óxido nitroso.

El Ascorbato y el Eritorbato de Sodio tienen bajo efecto antioxidante sobre las grasas, dada su insolubilidad en éstas. De cualquier manera, hay productos en los

cuales no se puede utilizar ningún tipo de antioxidantes para grasas como tocoferoles, butilhidroxianisol (BHA) o butilhidroxitoluol (BHT), como es el caso del jamón cocido (Freixanet, 2017).

1.6.3 Importancia de la reducción de sales en los productos cárnicos

Las enfermedades no transmisibles (ENT) constituyen la principal causa de morbimortalidad en todo el mundo y las intervenciones para aliviar la carga que conllevan son muy costosas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que la ingesta de alta concentración de Sodio se ha asociado con diversas ENT (como la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares o los accidentes cerebrovasculares), de modo que disminuir el consumo de Sodio puede reducir la tensión arterial y el riesgo de dichas ENT (OMS, 2013). Los últimos datos indican que en el mundo se consume mucho más sodio del necesario. En muchos casos, el consumo supera ampliamente lo recomendado en la actualidad por la OMS, 2 g de Sodio (equivalentes a 5 g de NaCl) por día. El comité de Evaluación Científica de la Ingesta Dietética de Referencia (DRI) del Instituto de Medicina / Comisión de Alimentos y Nutrición de Washington (una de las fuentes internacionales de referencia para los requerimientos nutricionales), reportó que la ingesta adecuada de sodio es de 1,5 g por día (3,8 g de sal por día) y el nivel máximo tolerable en base a la prevención del incremento sanguíneo, de 2,3 g de Sodio por día. A su vez, con incremento de la edad, la ingesta adecuada disminuye siendo 1,3 g por día de Sodio para mayores de 50 años y 1,2 g de Sodio al día para mayores de 70 años. La Tercera Encuesta Nacional Sobre Factores de Riesgo para ENT informó que el consumo diario promedio de sal en Argentina es de 12 g por día (Ministerio de Salud e INDEC, 2015).

En Argentina, en el año 2013 se promulgó una ley para promover la reducción del consumo de Sodio por parte de la población, la Ley Nacional N° 26.905 de regulación del consumo de Sodio, en donde se fijó la reducción progresiva de la sal contenida en los alimentos procesados. En esa ley se fijaron los valores máximos de Sodio en tres grupos de alimentos: productos cárnicos y sus derivados; farináceos y sopas, aderezos y conservas. Particularmente en el caso de hamburguesas, el valor máximo de Sodio fijado es de 850 mg cada 100 g de producto. La Ley regula además la incorporación de advertencias sobre los riesgos del consumo de sal en exceso en los envases de los alimentos y promueve la eliminación de los saleros en las mesas de los locales gastronómicos.

Los productos cárnicos contribuyen en gran medida al aporte diario de Sodio. La mayor parte del Sodio proviene de los productos cárnicos procesados, aunque hay diferencias entre países. El consumo de productos cárnicos está ampliamente extendido, representando una parte importante de la ingesta diaria de sal, que puede llegar al 30 %. En EE. UU. la contribución diaria de sal por parte de los productos cárnicos procesados se sitúa en torno al 20 % (Desmond y col., 2006). También hay que tener en cuenta que no todos los productos cárnicos contienen los mismos niveles de sal e incluso dentro de un mismo producto puede variar considerablemente su contenido en sal.

Asimismo, durante la elaboración de algunos productos cárnicos se añaden ciertos aditivos como el Glutamato Monosódico, los Fosfatos de Sodio, el Nitrato o el Nitrito de Sodio, el Ascorbato o Eritorbato de Sodio que actúan como fuentes adicionales de Sodio, aunque, la contribución al contenido final de Sodio por parte de estos aditivos es baja en comparación con el aporte del Cloruro de Sodio, que es aproximadamente el 75 % (Ruusunen y Puolanne, 2005; Desmond, 2006).

La reducción del contenido de sal en los alimentos procesados continúa siendo unos importantes desafíos para la industria alimentaria, debido a las funciones de preservación, sensoriales y tecnológicos que cumple en los alimentos. Es agente conservante y realzador del sabor, a la vez de mejorar la textura, la capacidad de retención de agua y conferir aromas y *flavors* característicos. La utilización de nuevas tecnologías de procesamiento y el uso de ingredientes de origen natural como sustitutos de la sal podrían ser una alternativa para lograr la disminución de su uso por parte de la industria cárnica. Con la reducción del contenido de Sodio se consigue modificar el perfil nutricional de los alimentos, permitiendo posicionarlos en el mercado como productos adecuados para una alimentación más saludable.

1.6.4 Importancia de la calidad microbiológica de la hamburguesa

La implementación de buenas prácticas de manufactura y la aplicación de los principios del sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) deben garantizar la inocuidad de los alimentos. Sin embargo, pueden no resultar suficientes. La inclusión de tecnologías convencionales y/o emergentes en el plan de APPCC para reducir o eliminar microorganismos patógenos, podría asegurar la inocuidad alimentaria.

La carne es un sustrato que posibilita la multiplicación de microorganismos, especialmente bacterias, tanto alteradoras como patógenas. Los alimentos cárnicos

son por naturaleza perecederos y en ellos ocurren numerosos cambios durante su acondicionamiento y procesado, el pH normal de la carne (5,4 y 5,7) es adecuado para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos y un potencial de reducción que permite el crecimiento de los anaerobios en profundidad y los aerobios en la superficie (ICMSF, 1998). La carne, incluso cuando se obtiene en condiciones higiénicas adecuadas, presenta una contaminación superficial. Durante la elaboración de productos cárnicos, factores tales como la temperatura, la manipulación y el picado de la carne, favorecen el crecimiento de microorganismos. En la elaboración de hamburguesas, el picado de la carne distribuye a nivel de toda la pasta los microorganismos que se encontraban en la superficie. Incrementa aún más la contaminación el hecho de utilizar cortes cárnicos con mayor exposición a la contaminación (como los del cuarto anterior) durante el procesado de faena.

Los grupos microbianos utilizados para evaluar la higiene de los procesos consisten en microbiota aerobia mesófila (30 °C) total, coliformes, *Escherichia coli* y *Enterobacteriaceae*. Para asegurar una adecuada vida útil se recurre al análisis sensorial, recuentos de bacterias psicrótrofas aerobias y recuentos de grupos específicos de microorganismos alteradores (*Pseudomonas*, *Brochothrix thermosphacta*, bacterias acidolácticas, clostridios psicrótrofos y mohos y levaduras) (Gill, 1986; Mead, 2000).

El grupo de bacterias coliformes (capaces de crecer a 37 °C y fermentar la lactosa con producción de gas) incluye tanto a mesófilas como a psicrotrofas. Entre los coliformes mesófilos se encuentra *E. coli* que es un indicador aceptado de contaminación fecal como también lo son las enterobacterias (Gill, 2000; ICMSF, 2005). El ácido L-láctico producido durante los procesos *post mortem* es utilizado por las bacterias alteradoras durante el almacenamiento de la carne fresca en aerobiosis. A su vez, ciertas bacterias anaerobio-facultativas, como las bacterias lácticas, son responsables de la producción de ácido D-láctico en productos envasados en condiciones reductoras (por ejemplo, bajo vacío); estas metabolizan los hidratos de carbono y producen ácido láctico, isobutanoico, isopentanoico y acético, esto hace que la carne presente olores y sabores descritos como “ácidos”, “agrios”, “a queso”, “amargos”.

Escherichia coli O157 es un bacilo no esporulado, anaerobio facultativo, casi siempre móvil (Orskov, 1984). Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, con crecimiento óptimo a 37 °C y pH 7,0 (FDA/CFSAN, 1992b). *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno de transmisión alimentaria, que representa un

grave problema para la salud pública, ya que da lugar a enfermedades entéricas y/o sistémicas. Aunque no es muy frecuente, la infección puede ser muy grave y derivar en colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) o púrpura trombótica trombocitopénica. El principal reservorio de las cepas de *E. coli* O157 productoras de toxina Shiga es el intestino del ganado bovino, (Chapman y col., 1992). Esta bacteria no es patógena para el ganado, con excepción de casos en neonatos bovinos (Dean-Nystrom y col., 1997; Chapman y col., 1992). El serotipo de STEC mayormente asociado a enfermedad humana es O157:H7, pero existen más de 100 serotipos no-O157 capaces de causar enfermedad en el hombre. Durante la faena se contamina la superficie de la res por patógenos presentes en el tracto intestinal y en el procesamiento se transfiere la contaminación bacteriana al interior de la carne, donde los microorganismos pueden resistir si la cocción es insuficiente. La principal vía de transmisión de STEC está dada por los alimentos contaminados, como, por ejemplo, carne picada, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada ni hervida, yogur, quesos, papas, lechuga, brotes de soja y rábano, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros (Kaper y col., 2004; Caprioli y col., 2005). *E. coli* O157 no es termorresistente, se destruye durante la cocción de los alimentos. En este sentido el consumo de carne picada o hamburguesas mal cocidas es la principal causa de infección por STEC.

El período de incubación de la enfermedad suele ser de 3 a 8 días, (FDA/CFSAN, 1992b). La dosis infectiva es muy baja, entre 10 y 100 unidades formadoras de colonia (UFC), por lo que no se requiere la multiplicación de la bacteria en los alimentos. Los síntomas de la infección son diversos: diarrea acuosa y colitis hemorrágica, acompañada de dolor abdominal agudo y a veces de vómitos, pudiendo progresar a SUH, con fallo renal, leucopenia y anemia (Nataro y Kaper, 1998). Los niños tienen mayor probabilidad de desarrollar el SUH, que normalmente dura varios días o semanas y requiere hospitalización, incluyendo transfusiones de sangre y diálisis. Otras consecuencias más graves (coma) o fatales pueden afectar a grupos de población más susceptibles como niños o ancianos (Nataro y Kaper, 1998).

1.7. Alta presión hidrostática

La alta presión hidrostática (APH) también denominada pascalización o presurización, es una tecnología de gran interés en la industria de los alimentos debido a que es efectiva en la preservación de estos. El procesamiento habitual con APH consiste en la aplicación, a alimentos envasados en envases flexibles y herméticos, de

una presión constante entre 100 y 900 MPa por tiempos cortos (<10 min) y temperaturas en el rango de -40 a 110 °C. Estas condiciones son las que se utilizan en equipos de laboratorio o planta piloto mientras que a nivel industrial la máxima presión que se aplica es 600 MPa, a temperatura ambiente o de refrigeración. A modo de ejemplo se puede decir que la aplicación de 110 MPa equivale a la presión encontrada en la máxima profundidad oceánica (Fosa de la Islas Marianas, Océano Pacífico, 11 km) y que por lo tanto en un equipo APH industrial se alcanzan aproximadamente 6 veces ese valor (600 MPa).

1.7.1 Desarrollo histórico de la tecnología de APH

Se le denomina también pascalización en honor a Blaise Pascal, quién descubrió su papel como conservador en fluidos en el siglo XVII. La tecnología de APH comenzó a utilizarse en el siglo XIX y fue aplicada inicialmente en materiales de cerámica, acero y producción de aleaciones, extrusión y materiales sintéticos (Hoover y col., 1989; de Lamballerie-Anton y col., 2002). El potencial de la tecnología para preservar alimentos se conoce desde finales del siglo XIX, cuando en 1899 Hite esterilizó leche mediante presurización (689 MPa), demostrando la reducción de la población microbiana, prolongando la vida útil de la leche bovina después del procesamiento. En 1914, Bridgman informó la coagulación de la albúmina de huevo por la alta presión y determinaron diferentes propiedades del producto en comparación con los geles obtenidos por coagulación térmica. Años más tarde, desde principios de la década de los 80, el tratamiento con APH se ha evaluado como una alternativa de procesamiento de alimentos a las tecnologías clásicas (Knorr y col., 1998), además quedó demostrado que la aplicación de esta tecnología proporciona diferentes propiedades de textura en los alimentos, sin embargo, debido a las limitaciones en el campo de la ciencia de los materiales, esta tecnología no comenzó a desarrollarse con fines comerciales hasta finales del siglo XX. En Japón, la mermelada fue el primer producto comercializado a partir de 1990 por la compañía japonesa Meidi-Ya Food Co (Rastogi y col., 2007). Estados Unidos inició en 1998 la comercialización de guacamole tratado por alta presión. Países como Francia y España adoptaron posteriormente esta tecnología.

1.7.2 Principios básicos del sistema de presurización

La presión se define como la fuerza ejercida por un líquido o un gas por unidad de superficie, y su unidad de medida en el Sistema Internacional es el Pascal (Pa = N/m²). Esta es una unidad muy pequeña para medir presiones altas. En la

actualidad se utilizan muchas unidades por lo que es útil conocer los factores de conversión de estas, pues según las aplicaciones y los países se emplean unas u otras (Crossland, 1995; Farkas y Hoover, 2000):

$$100 \text{ MPa} = 1 \text{ kbar} = 10,2 \text{ kgf/mm}^2 = 987 \text{ atm} = 14504 \text{ lbf/in}^2 \text{ (psi)} = 6,475 \text{ tonf/in}^2.$$

La tecnología de APH se basa en tres principios fundamentales (Cheftel, 1991; Earnshaw, 1996):

- El principio de moderación de Le Châtelier. Este principio fue enunciado en 1884, e indica que los fenómenos que van acompañados de una disminución de volumen son favorecidos por un aumento de presión y viceversa. Según este principio, la aplicación de altas presiones desplaza el equilibrio de un proceso hacia el estado que ocupa menos volumen. Ello implica que procesos como la formación de macromoléculas proteicas, la ruptura de interacciones hidrofóbicas y de pares de iones, y la formación de puentes de hidrógeno se verían favorecidos por la presión pues van acompañados de disminución de volumen, aunque algunos estudios indican que los puentes de hidrógeno no son afectados por la presión (Gross y Jaenicke, 1994; Mozhaev y col., 1996). El volumen de agua disminuye un 4 % a 100 MPa y un 15 % a 600 MPa (Cheftel, 1995).

- La ley de Pascal o ley de la transmisión isostática. Establece que la presión es instantánea y uniformemente transmitida al producto, ya sea que la muestra permanezca en contacto directo con el medio de presurización o en un envase sellado herméticamente que transmita la presión, independientemente del tamaño o la geometría del producto (Knorr, 1993). En contraste con el procesamiento térmico en el que se producen gradientes de temperatura, todas las moléculas contenidas en el recipiente de APH se someten a la misma presión exactamente al mismo tiempo debido a este principio (Rastogi y col., 2007; Heinz y Buckow, 2010).

- El principio de reordenamiento microscópico. Este principio se basa en el reordenamiento microscópico y postula que, a temperatura constante, un incremento de presión induce un aumento del grado de ordenamiento de las moléculas de una sustancia dada (Heremans, 1992).

Si un producto alimenticio contiene suficiente humedad, la presión no lo dañará a nivel macroscópico, siempre y cuando la presión se aplique de manera uniforme en todas las direcciones. Debido a ello, la presión no produce daño en la mayoría de los alimentos procesados por alta presión, siempre que el alimento no

tenga una estructura porosa. Las burbujas de aire colapsan por efecto de la presión debido a las diferencias entre la compresibilidad del aire y el agua, y a menos que el alimento sea perfectamente elástico y contenga al aire, este no recuperará su tamaño y forma originales (Balasubramaniam y Farkas, 2008).

1.7.3 Descripción del equipo de APH

Un equipo típico de APH consiste en una cámara de presurización, un sistema generador de la presión y un sistema de control de la temperatura y de la presión. Los sistemas APH disponibles a nivel industrial pueden ser de discontinuos (*batch*) o semi-continuos.

El procesamiento *batch* es el que se utiliza mayoritariamente, este se aplica en el tratamiento de alimentos sólidos, envasados en envases flexibles y herméticos y alimentos líquidos en botellas o empaques de material plástico. Estos sistemas utilizan la compresión indirecta ya que utilizan intensificadores de alta presión para presurizar un fluido el cual es introducido mediante bombas inyectoras (en equipos industriales es agua potable y en los equipos para investigación son mezclas de alcoholes y agua, aceite de siliconas, etc.). El fluido transmite la presión al producto envasado durante un tiempo. Por último, para la descompresión, se vacía el equipo mediante la apertura de una válvula. El producto estaría listo para consumir o almacenar/refrigerar. Entre las principales ventajas de este sistema está la reducción de los problemas de contaminación con lubricantes y contaminación cruzada, son de construcción más simple, y tiene la posibilidad de utilizar múltiples cilindros o recipientes. (Daoudi, 2004; Welti-Chanes y col., 2005; Mor-Mur, 2010).

El sistema semi-continuo se utiliza exclusivamente en la pasteurización de alimentos líquidos como jugos de productos frutihortícolas, los alimentos están en contacto con el acero de la cámara de compresión. En estos sistemas la presión es generada por la compresión de un pistón, el cual es desplazado mediante un fluido impulsado por una bomba de baja presión, y se los denomina de compresión directa. Una vez realizado el tratamiento, el producto saldría por otro conducto estéril y se procedería al envasado. Tiene la ventaja de alcanzar rápidamente presiones elevadas, pero puede presentar problemas con el sello pistón-cilindro generando una contaminación del producto con lubricantes o partículas de desgaste del sistema. Además, tienen mayor complejidad para su fabricación y por lo tanto menos aplicación industrial. En la Figura 1.5 se presentan los esquemas de equipos de APH de compresión directa e indirecta (Daoudi, 2004).

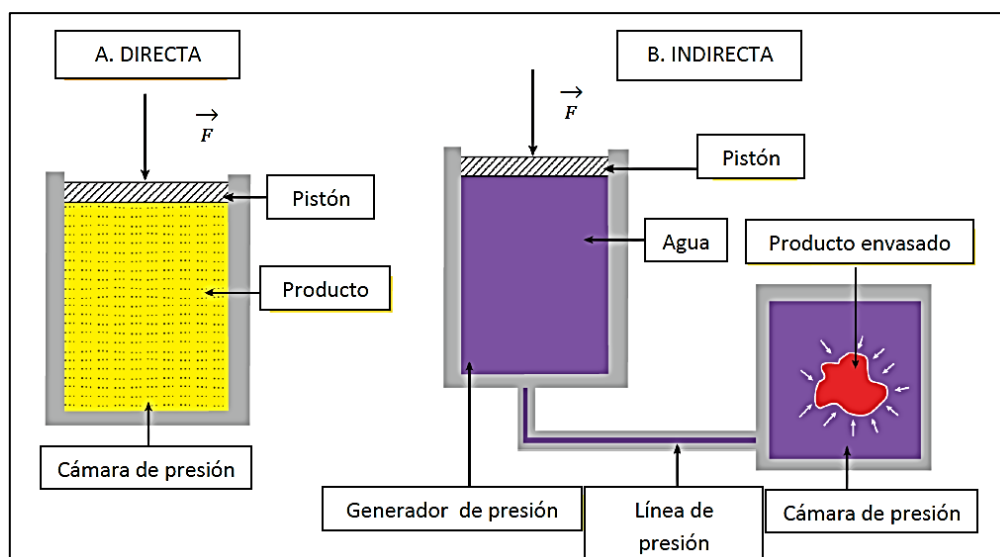


Figura 1.5. Compresión directa e indirecta en un equipo de APH (Daoudi, 2004).

El sistema de APH utilizado en el presente trabajo de investigación fue un equipo Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System, modelo FPG9400:922 (Stansted, Reino Unido) de escala laboratorio, que opera en forma discontinua y dispone de cuatro partes. Cada una de las ellas se describe a continuación:

a) Módulo de control

El módulo de control está conformado por una computadora que dispone de un controlador lógico programable (PLC) y el sistema/software *Supervisory Control And Data Acquisition* (SCADA) para el control automático del equipo. En la interfase del sistema SCADA se ingresan las condiciones de operación tales como la velocidad de compresión, la presión de trabajo, el tiempo de mantenimiento de la presión y los datos de identificación de la muestra. El sistema también controla la operación de los módulos de refrigeración y de calefacción, permitiendo acondicionar la temperatura del cilindro, ya que este dispone de una camisa de intercambio de calor, y la temperatura del fluido de presurización al ingresar al cilindro. El sistema SCADA también controla el funcionamiento de cada parte del equipo, la apertura y cierre de válvulas, monitorea las principales variables del proceso y las almacena en el disco rígido de la computadora. El procesamiento posterior de esos datos permite obtener gráficos presión-tiempo y temperatura-tiempo.



Figura 1.6. Módulo de control del equipo APH Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System modelo FPG9400:922.

b) Módulo del cilindro de alta presión

El módulo del cilindro de alta presión dispone de un cilindro encamisado (capacidad de 2 L) en el cual ingresa el fluido de transmisión de la presión (agua, silicona, mezclas de agua y alcoholes o agua y aceites). El fluido de presurización utilizado en el presente trabajo de Tesis Doctoral fue una mezcla de propilenglicol:agua en proporciones de 70:30.

Además, en la camisa de intercambio también circula una mezcla de agua y propilenglicol. En el interior del cilindro se coloca la canasta de aluminio (6 cm de diámetro y 70 cm de altura) de paredes perforadas donde se introduce el alimento envasado en un envase flexible. La presión máxima de operación del equipo es de 900 MPa y el rango de temperatura de trabajo entre -20 y 120 °C.

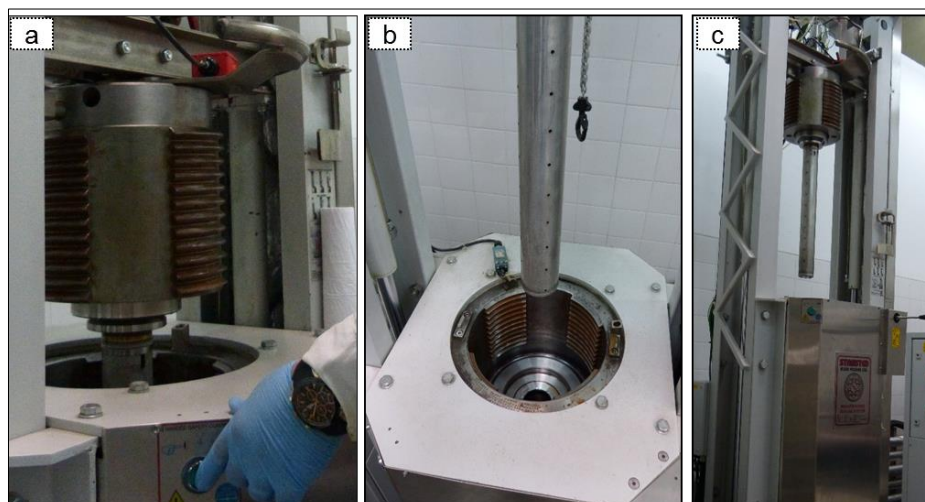


Figura 1.7. a: cilindro de alta presión encamisado, b: canasta de carga, c: cilindro y canasta del equipo APH Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System modelo FPG9400:922.

c) Módulo de servicio

En este módulo se encuentran las bombas de baja presión, los intensificadores de presión, las válvulas de descompresión y el tanque de acondicionamiento térmico del cilindro de alta presión. Además, están los tanques de almacenamiento del fluido de compresión y de los aceites lubricantes.



Figura 1.8. Módulo de servicio del equipo de APH Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System modelo FPG9400:922.

d) Módulo de refrigeración y sistema de calefacción

El módulo de refrigeración permite acondicionar la temperatura del cilindro a temperaturas inferiores al ambiente y sub-cero (hasta $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Por este módulo circula en reciclo una mezcla de agua y etilenglicol, la cual refrigera a través de un serpentín, el fluido de intercambio (mezcla de agua y propilenglicol) almacenado en el tanque de acondicionamiento térmico ubicado en el módulo de servicio del sistema. A su vez, el fluido de intercambio circula en circuito cerrado entre el tanque de acondicionamiento y la camisa de intercambio del cilindro de alta presión. Para trabajar a temperaturas superiores al ambiente, el fluido de intercambio se calienta mediante una resistencia ubicada en el tanque de acondicionamiento.



Figura 1.9. Módulo de refrigeración marca Euro Chiller, acoplado al equipo APH Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System modelo FPG9400:922.

El proceso típico de APH inicia al introducir el alimento envasado (envase flexible y hermético) en la canasta de aluminio, la que luego se introduce en el cilindro encamisado. Posteriormente, se cierra el contenedor del cilindro y se da inicio al proceso a través del módulo de control. En forma automática las bombas de baja presión elevan la presión del fluido de compresión hasta alrededor de 50 MPa, para luego ingresar a los intensificadores, que elevan la presión hasta alcanzar la presión de trabajo programada, y llenar el cilindro. Esta etapa de elevación de la presión se denomina etapa de presurización o compresión y el tiempo que demanda se lo denomina tiempo de presurización, compresión o *come up time*. Una vez que se alcanza la presión de trabajo se mantiene ese valor durante el tiempo establecido (tiempo de mantenimiento o *holding time*). Una vez finalizado el tiempo de mantenimiento de la presión, el equipo comienza a vaciar el líquido del cilindro descomprimiendo en dos o más etapas, hasta alcanzar la presión atmosférica. Posteriormente, cuando el sistema SCADA habilita la apertura del contenedor del cilindro, se puede retirar el cierre electrónico, abrir la tapa y retirar la canasta de aluminio con el alimento ya tratado. El tiempo total del proceso (*cycle time*) comprende: el tiempo de compresión o presurización, el tiempo de mantenimiento de la presión y el tiempo de descompresión.

La presurización puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o se puede aplicar temperatura junto con la presión (>30 °C). Dicha temperatura influirá en el efecto de las altas presiones sobre el alimento, sus componentes y los microorganismos presente en él. La compresión adiabática del agua causa un aumento de 2-3 °C por cada 100 MPa, aumento que depende de la temperatura inicial del agua, de la velocidad de compresión y del nivel de presión aplicado (Cheftel y

Culioli, 1997). Las características y parámetros del proceso a tener en cuenta y que pueden modificar el efecto de la presión son: el número de ciclos, tiempo de cada ciclo, nivel de presión aplicada, temperatura y matriz del producto.

1.8. Alta presión hidrostática como tecnología de preservación de alimentos

El Código Alimentario Argentino en el artículo 158 denomina “alimento conservado” o “alimento preservado” a aquel que, habiendo sido sometido a tratamientos apropiados de conservación o preservación, se mantiene en las debidas condiciones higiénico-sanitarias y de aceptabilidad para el consumo durante lapsos variables.

La creciente demanda de los consumidores por optar por productos seguros, mínimamente procesados y que preserven el sabor y el aroma, estimula a la industria alimentaria a la adopción de nuevas tecnologías de preservación. La tecnología de APH se destaca sobre los procesos térmicos de preservación, pues estos últimos causan inevitablemente pérdida de nutrientes y sabores. Entre los tratamientos no térmicos aplicados en la preservación de los alimentos (pulsos eléctricos de alta intensidad, campos magnéticos oscilantes, pulsos lumínicos de alta intensidad, plasma frío, homogeneización por ultra alta presión, tratamientos con ozono, tratamientos con UV, irradiación y ultrasonidos), APH alcanzó mayor aplicación comercial. APH es una tecnología de preservación poco invasiva, que produce alimentos de alta calidad nutricional y sensorial, a la vez que inocuos, ya que produce la inactivación de las células vegetativas con mínimos cambios en los componentes de los alimentos (Cheffel, 1995). Debido a ello, APH es una tecnología que muestra un gran potencial para la innovación en productos y procesos.

Actualmente, en el mercado existen más de 150 productos alimenticios tratados con APH. Esta tecnología se aplica a nivel industrial para pasteurizar diferentes productos como jugos de frutas o sus mezclas con hortalizas (jugo de naranja de marca Ultifruit en Francia; Freshafruit en Australia; Evolution Fresh, BluePrintJuices, Suja en EE. UU, etc.), mermeladas, jamón cocido/curado (España y Campofrío, España; Hormel, EE. UU.; Vismara, Italia), carnes listas para consumir (Hormel, EE. UU.; Maple Leaf, Canadá), carnes listas para cocinar (Vuelta y Vuelta, Campofrío, España), hamburguesas y salchichas (Fressure, Cargill, EE. UU.), pescados y mariscos, guacamole, salsas y aderezos (Fresherized Food, EE. UU.; Verfruco, México), etc. Los volúmenes producidos son aún bajos y el costo de

inversión (costo de compra de los equipos APH) es todavía elevado. Sin embargo, la tecnología APH genera un menor consumo de energía que las tecnologías convencionales de procesamiento térmico, por lo que los productos tratados con APH resultan competitivos a nivel comercial (Garriga y col., 2004).

Algunos proveedores de equipos APH de escala industrial son (Figura 1.10): Avure (Ohio, EE. UU.) e Hiperbaric (Burgos, España). Existen en la actualidad más de 350 equipos de escala industrial instalados a nivel internacional. La distribución de equipos (expresada en porcentajes) que se encuentran en los distintos continentes es: América 57,5 %; Europa 23,6 %; Asia 12,3 %; Oceanía 5,1 %; África 0,9 % (Hiperbaric, 2017).

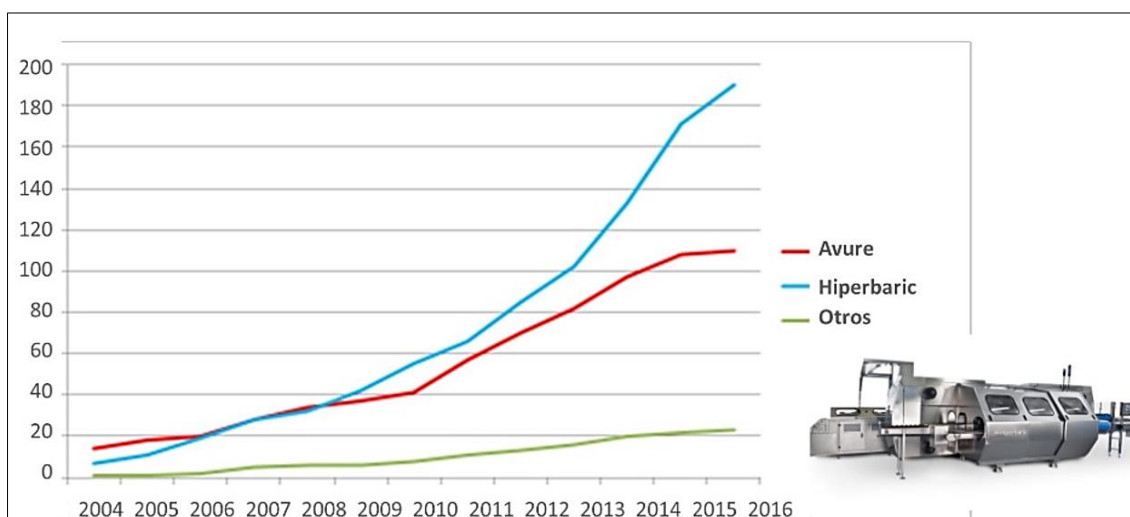


Figura 1.10. Número de equipos de APH instalados desde el año 2004 (Hiperbaric, 2016).

La tecnología de APH es una tecnología muy conveniente para la preservación de productos cárnicos. Las presiones que se aplican para la pasteurización de estos productos corresponden al rango 400-600 MPa, durante tiempos cortos (3-7 min) a temperatura ambiente (Bajovic y col., 2012). Entre las ventajas de la aplicación de APH a los productos cárnicos se pueden indicar: la inactivación de patógenos relevantes en productos cárnicos (*Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*), sobre todo en aquellos que no pueden ser tratados térmicamente (crudos fermentados, crudos curados-deshidratados, cocidos cortados en porciones/fetas, etc.). Otras ventajas son la extensión de la estabilidad del producto y la reducción de sal y aditivos en la formulación (etiquetado limpio). Además, la posibilidad de generar nuevos productos, particularmente para el mercado de los alimentos “listos para consumir”. Sin embargo, APH puede afectar el color, la textura y

el *flavor* de los productos cárnicos (Cheftel y Culioli, 1997). La pérdida del color rojo característico de la carne fresca se produce a presiones mayores de 300 MPa, necesarias para la inactivación de células vegetativas, debido a la desnaturalización y oxidación de la mioglobina, dependiendo del nivel de presión.

1.9. Efecto del procesamiento con APH en los parámetros más importantes de calidad e inocuidad de carne y productos cárnicos

Diferentes estudios previos indicaron que el tratamiento con APH de los alimentos provoca distintos efectos (deseables o indeseables) en la calidad de la carne y productos cárnicos. Además, esos efectos dependen del tipo de materia prima, condiciones de procesamiento y de los ingredientes utilizados en la elaboración de los productos cárnicos.

1.9.1 Efecto de la APH los parámetros cromáticos

Diferentes estudios informaron que las APH provocan alteraciones en el color de la carne (Carlez y col., 1995; Jung y col., 2003); las cuales se producen en el rango de presiones (>300 MPa) necesarias para inactivar microorganismos vegetativos patógenos y alteradores. Se ha observado que, a presiones superiores de 200 MPa, se incrementa el valor del parámetro luminosidad (L^*) en carne aviar, porcina y bovina, produciendo coloraciones rosáceas en la carne (Del Olmo y col., 2010; Marcos y col., 2010). Esta alteración en el color de la carne se ha relacionado con la reducción de la solubilidad de proteínas sarcoplásmicas y/o miofibrilares que afectan a la estructura y las propiedades superficiales de estas (Goutefongea y col., 1995). Además, esa decoloración fue relacionada con la desnaturalización de la globina y/o desplazamiento o pérdida del Hierro hemínico (Carlez y col., 1995). También se ha demostrado que el parámetro a^* , que se correlaciona con el color rojo, disminuye en las carnes pigmentadas cuando estas son tratadas a presiones superiores a 350-400 MPa (Carlez y col., 1995; Jung y col., 2003; Marcos y col., 2010). Esta alteración se ha atribuido a la oxidación de la mioglobina ferrosa a metamioglobina férrica (Carlez y col., 1995; Jung y col., 2003) y posiblemente a otras especies férricas de mioglobina desnaturalizada, responsable del color pardusco (Wackerbarth y col., 2009). Estas alteraciones en el color de la carne solo se observan en la carne cruda, mientras que no se observan diferencias de color entre la carne cocida proveniente de carne cruda presurizada en relación con carne cocida preparada con carne sin presurizar (Cheftel y Culioli, 1997) A su vez, en los productos cárnicos curados crudos, la alteración del color es menor, debido a la estabilidad a las APH que presenta el pigmento

nitrosomioglobina. Además, en los productos cárnicos curados cocidos, el color se estabiliza durante la cocción, con la formación del pigmento nitrosomiocromógeno, el cual no es afectado por el tratamiento con APH.

En los últimos años se han evaluado diferentes estrategias para evitar o reducir la alteración del color por efecto del tratamiento con APH. Una de ellas fue el tratamiento con APH de productos cárnicos previamente congelados. En este sentido, Vaudagna y col. (2012) y Szerman y col. (2011) estudiaron el tratamiento con APH a temperatura de congelación y de refrigeración, respectivamente, de *carpaccio* congelado. Esos autores observaron que la congelación del producto permitió minimizar el efecto del tratamiento con APH sobre los parámetros cromáticos del *carpaccio* preparado con carne bovina. Otra alternativa posible para reducir el efecto del tratamiento con APH sobre el color de la carne y de los productos cárnicos, es la incorporación de compuestos antioxidantes (Carlez y col, 1995). En este sentido, se requiere profundizar el conocimiento sobre la estabilidad del color de la carne presurizada, por efecto de la incorporación de antioxidantes, como las sales del ácido ascórbico (L-ascorbato de Sodio y Eritorbato de Sodio) y antioxidantes naturales como el extracto de romero.

1.9.2 Efecto de la APH en las proteínas de la carne

El procesamiento con APH ocasiona cambios fisicoquímicos en las proteínas cárnicas tales como la desnaturalización, solubilización y agregación (Cheftel y Culioli, 1997; Fernández-Martin y col., 2002; Jiménez-Colmenero, 2002). Estos cambios se traducen en modificaciones en la textura, retención de agua y color de los productos cárnicos y son dependientes de las condiciones de procesamiento del producto antes y después del tratamiento con APH.

La estructura nativa de las proteínas es el resultado de un balance de interacciones entre las cadenas polipeptídicas y el solvente, que suele ser agua. La estructura nativa es estable en un estrecho rango de condiciones del medio (pH, fuerza iónica, temperatura, presencia de cosolventes, etc.). La aplicación del tratamiento con APH desequilibra el balance de las interacciones intramoleculares y las interacciones entre solvente y proteína (Heremans, 2002). Las transiciones estructurales suelen ir acompañadas de importantes cambios de hidratación, así al desplegarse y disociarse la proteína se produce una disminución del volumen total del sistema, a la vez de provocar desnaturalización de la cadena polipeptídica. Además, la separación de las cargas inducida por la presurización puede afectar los puentes

salinos y las interacciones hidrofóbicas. Todo esto da lugar a cambios conformacionales y estructurales que se traducen en cambios en las propiedades fisicoquímicas y texturales de los productos cárnicos (Cheftel y Culioli, 1997).

El efecto de la APH se centra principalmente en las estructuras cuaternarias y terciarias de las proteínas, que están estabilizadas por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. La estructura secundaria es menos afectada por la presión, aunque la desestabilización de las anteriores estructuras puede dar lugar a un desplegamiento, exponiendo las regiones hidrofóbicas de la proteína al solvente. La estructura primaria estabilizada por enlaces covalentes, poco sensibles a la presión, permanece inalterada durante la presurización (Hendrickx y col., 1998).

La aplicación de presiones moderadas, menores a 150 MPa, favorece la disociación de las proteínas oligoméricas. La disociación puede ir seguida de agregación de las subunidades o de la precipitación, esto normalmente ocurre a presiones entre 150 y 200 MPa. En este intervalo de presiones la proteína oligomérica se despliega y las subunidades disociadas se reasocian. Los cambios en la estructura secundaria tienen lugar a niveles de presión más altos (aproximadamente 300-700 MPa), lo que lleva a una desnaturalización irreversible, dependiendo de la velocidad de compresión y de la extensión de los reordenamientos de la estructura secundaria (Balny y Masson, 1993). Las proteínas del tejido conectivo, como el colágeno son poco sensibles a la presión (Ma y Ledward, 2004). Sin embargo, las proteínas estructurales del músculo, actina y miosina, pueden depolimerizarse y solubilizarse con la presión (Cheftel y Culioli, 1997).

Se ha descrito un aumento de la hidrofobicidad superficial de las proteínas por el tratamiento con APH (Zhang y col., 2005). Este aumento puede originar la agregación de proteínas cuando se encuentran cerca del punto isoeléctrico y se minimizan las repulsiones electrostáticas (Toldrà y col., 2008). Los puentes disulfuro juegan un papel importante en la agregación inducida por la presión (Der Plancken y col., 2005). Los puentes de hidrogeno también tienen un papel estabilizador en la agregación promovida por la presurización (Cheftel, 1995). Por otro lado, los grupos hidrofílicos de los residuos de aminoácidos promueven la hidratación y las fuerzas de repulsión entre las moléculas de proteína, lo que conduce a la solubilidad de la proteína (Yang y Powers, 2016).

1.9.3 Efecto de la APH en los lípidos

La temperatura de fusión de los lípidos, en especial de los triacilglicéridos, aumenta reversiblemente 10 °C por cada 100 MPa (Cheftel, 1995). Es por eso que los lípidos presentes en estado líquido a temperatura ambiente se cristalizan bajo presión formando cristales más densos y estables. La disminución de la fluidez de la membrana induce a la rotura de esta y la destrucción de la bicapa lipídica (Kato y Hayashi, 1999). El componente lipídico principal de las membranas son los fosfolípidos que contienen un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, estos son más susceptibles a la oxidación por efecto de la presión.

La iniciación de la oxidación lipídica inducida por la presión en carnes se ha relacionado con diversos factores como la liberación de Hierro de las proteínas hemínicas o el daño de la membrana celular (Cheah y Ledward, 1996). Sin embargo, Orlie y col. (2000) no detectaron aumento en la liberación de iones de Hierro tras presurizar pechuga de pollo entre 500 y 800 MPa. Así la oxidación de lípidos podría ser causada por la destrucción de la membrana celular. Esta rotura contribuye a la exposición de los ácidos grasos poliinsaturados a los catalizadores endógenos (enzimas responsables de la oxidación u otras especies oxidantes) y al oxígeno activado, incrementando la oxidación del substrato (Orlie y col., 2000; Beltran y col., 2003.; Mariuti y col., 2008). La oxidación lipídica promovida por la presurización también se ha relacionado con el oxígeno disuelto y con la desnaturalización de las proteínas, que a su vez causa la liberación de iones metálicos que estaban ligados a proteínas y enzimas, los cuales a su vez actuarían como catalizadores de la oxidación de las grasas (Cheah y Ledward, 1996).

1.9.4 Efecto de la APH sobre los microorganismos

Numerosos estudios han propuesto interpretaciones respecto al efecto de las APH sobre la inactivación de las formas vegetativas microbianas. Se considera que el primer sitio que resulta dañado por el tratamiento con APH corresponde a la membrana celular. Las alteraciones de esta, inducidas por la presión, incluyen la disminución de la fluidez de lípidos y fosfolípidos de membrana, llegando a su solidificación y fragmentación de las bicapas lipídicas. A su vez, la desnaturalización de enzimas asociadas, desequilibrio osmótico, pérdida de integridad celular, y pérdida de ARN y de proteínas (Morita, 1975; Wouters y col., 1998; Ulmer y col., 2000; Casadei y col., 2002). Por otro lado, los ácidos nucleicos son estables al tratamiento con APH, aunque pueden resultar desnaturalizadas enzimas implicadas en la

replicación y transcripción del ADN. Además, en algunos casos se ha observado que el tratamiento con APH indujo la condensación del material genético nuclear (Mackey y col., 1994; Wouters y col., 1998) o también el contacto del ADN con endonucleasas, resultando así dañado (Chilton y col., 1997).

La resistencia de los microorganismos a la presión en un alimento depende de diversos factores, tales como el tipo de microorganismo (género, especie y cepa), fase de crecimiento, nivel de presión, tiempo de tratamiento, temperatura, pH, actividad de agua y composición fisicoquímica de la matriz del producto (Metrick y col., 1989; Styles y col., 1991; Carlez, 1994; Mackey y col., 1995; Patterson y col., 1997; Benito y col., 1999; Chen y col., 2006), así como la presencia de aditivos alimentarios (antimicrobianos, NaCl, TPFS, etc.). En general se considera que cuanto mayor sean el nivel de presión, el tiempo de mantenimiento de la presión y el uso de la temperatura en combinación con la presión, mayor será el efecto sobre la inactivación de los microorganismos.

Las formas vegetativas bacterianas son mucho más sensibles a la presión que sus formas de resistencia o esporas. A su vez, en la fase exponencial de crecimiento son más sensibles que en la fase de latencia (Mackey y col., 1995). Se asume que los microorganismos Gram negativos son los más sensibles a las APH; les siguen las levaduras y hongos, los Gram positivos y por último las esporas; los virus son muy resistentes a las APH, aunque dependiendo del tipo de virus se encuentran diferencias (Cheftel, 1995; Earnshaw, 1995; Mackey y col., 1995; Smelt, 1998). Por su parte, los cocos son más resistentes que los bacilos (Ludwig y Schreck, 1997). Sin embargo, existen excepciones, así por ejemplo algunas cepas de *E. coli* O157:H7 a pesar de ser Gram negativas y bacilares, son resistentes a la presión (Benito y col., 1999).

Los microorganismos son más susceptibles a la inactivación en un medio no nutritivo que en uno enriquecido. La presencia de nutrientes que afectan a la actividad acuosa, como son el azúcar y la sal en altas concentraciones puede ejercer un efecto baroprotector sobre los microorganismos. Se ha sugerido que la reducción de actividad acuosa puede resultar en encogimiento celular y engrosamiento de la membrana celular, reduciendo así la permeabilidad y fluidez de la membrana. (Knorr 1993, 1995; Oxen y Knorr 1993; Takahashi y col., 1993; Palou y col., 1997; Molina-Höppner y col., 2004).

Capítulo 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la incorporación de aditivos en combinación con distintas estrategias de aplicación de APH, en el desarrollo de hamburguesas con contenido de Sodio reducido.

2.2. Objetivos específicos

-Estudiar el efecto de los tratamientos con APH en carne picada de piezas del cuarto delantero de la carcasa bovina y su influencia sobre las propiedades tecnológicas y fisicoquímicas, textura y microestructura de hamburguesas preparadas con la materia prima presurizada.

-Estudiar el efecto de los tratamientos con APH y de la formulación con aditivos convencionales (NaCl y TPFS), enzima transglutaminasa y fibra cítrica sobre las propiedades tecnológicas, fisicoquímicas, la textura y la microestructura de hamburguesas de carne bovina.

-Estudiar el efecto de la aplicación de APH y la incorporación de compuestos antioxidantes (extracto de romero y Eritorbato de Sodio) sobre las propiedades tecnológicas, fisicoquímicas y bioquímicas, la textura y la microestructura de hamburguesas de carne bovina.

-Estudiar el efecto de los tratamientos con APH y de la formulación sobre la supervivencia de un cóctel de cepas nativas de *Escherichia coli* O157:H7 productores de toxina Shiga (STEC O157) inoculado en hamburguesas.

-Estudiar el efecto de los diferentes tratamientos aplicados a las hamburguesas, sobre el comportamiento térmico y la caracterización molecular de las proteínas cárnicas extraídas de las hamburguesas.

2.3. Hipótesis

La aplicación de APH a la materia prima y a las hamburguesas formuladas con niveles reducidos de aditivos convencionales y con la incorporación de fibras naturales y enzima transglutaminasa permitirán obtener hamburguesas con propiedades tecnológicas, fisicoquímicas y sensoriales similares a las propiedades de las preparadas con el tipo (NaCl y TPFS) y la concentración de los aditivos utilizados a nivel industrial.

La incorporación de compuestos antioxidantes (Eritorbato de Sodio, extracto de romero) en la formulación de hamburguesas disminuirá o evitará el deterioro del color de la carne producido por la presurización.

Los tratamientos optimizados permitirán inactivar un cóctel de cepas autóctonas de *Escherichia coli* O157:H7 inoculado en las hamburguesas.

Los estudios correspondientes al efecto de los diferentes tratamientos sobre el comportamiento térmico y la caracterización molecular de las proteínas cárnicas permitirán explicar los resultados obtenidos en las propiedades tecnológicas y fisicoquímicas, la textura y la microestructura de hamburguesas de carne bovina.

Capítulo 3
MATERIALES Y
MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este Trabajo de Tesis comprendió distintos estudios experimentales, en los cuales se utilizó el mismo tipo de materia prima y el procesamiento de las muestras fue similar. Dependiendo del tipo de estudio, se utilizaron diferentes aditivos y se aplicaron distintos niveles de presión con el objetivo de estudiar el efecto sobre las propiedades tecnológicas, fisicoquímicas y bioquímicas, la textura y la microestructura de las hamburguesas. A su vez, se evaluó el efecto de los tratamientos aplicados sobre el comportamiento térmico y la caracterización molecular de las proteínas miofibrilares extraídas de las hamburguesas. En el primer estudio se aplicaron tratamientos con APH a la materia prima (carne bovina picada) y se analizaron los efectos sobre esa materia prima y sobre las hamburguesas elaboradas a partir de ella. En el segundo estudio se prepararon hamburguesas elaboradas con aditivos convencionales (NaCl y TPFS) y de origen natural (fibra cítrica y enzima transglutaminasa (TG)) y posteriormente sometidas al tratamiento con APH. En el tercer estudio se analizó el efecto de la incorporación de antioxidantes (extracto de romero, Eritorbato de Sodio) y en el cuarto estudio se evaluó el efecto de la formulación y de la aplicación de tratamientos con APH sobre la inactivación de un coctel de cepas nativas de STEC O157 en hamburguesas.

3.1. Materiales y procedimientos generales

3.1.1 Materia prima

La carne bovina utilizada como materia prima para los estudios de este Trabajo de Tesis fue carnaza de paleta con marucha (Código 2307 Nomenclador Argentino de Carne Vacunas). La pieza está formada por los músculos trapecio, deltoides, dorsal ancho, infraespinoso, tríceps braquial, ancóneo interno y ancóneo externo, redondo mayor y tensor de la fascia antebraquial. Los cortes cárnicos fueron adquiridos en un frigorífico local aprobado para exportación a la Unión Europea.

Las piezas fueron desgrasadas y se eliminó el tejido conectivo. La grasa se conservó para la formulación de las hamburguesas. Posteriormente, se midió el pH de las piezas cárnicas utilizando un electrodo de punción (TESTO modelo 230, Sparta, NJ, EE. UU.) y se seleccionaron aquellas con valor de pH entre 5,4 y 5,7. Luego, la carne y la grasa fueron envasadas por separado al vacío en bolsas Cryovac BB2800CB (Sealed Air, Buenos Aires, Argentina) utilizando una envasadora de doble

campana Rapivac Modelo Maximax 800 G. Posteriormente se almacenaron en cámara de refrigeración a $1,0 \pm 1,0$ °C durante 48 h, hasta su procesamiento.

3.1.2 Aplicación de los tratamientos con APH

Los tratamientos con APH se aplicaron en el equipo marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo Iso-Lab FPG9400:922 (Stansted, Reino Unido), ubicado en el ITA-INTA Castelar. Este equipo dispone de un cilindro de alta presión de 7 cm de diámetro, con una capacidad de 2 L. Las muestras se cargan en una canasta de aluminio de 6 cm de diámetro y una altura de 70 cm, la cual presenta pequeños orificios en la pared lateral y en la base, para la circulación de fluido (Figura 3.1). La presión máxima de operación es de 900 MPa, y el rango de temperatura de trabajo entre -20 y 120 °C. El fluido de presurización utilizado fue una mezcla 70:30 (v/v) de agua y propilenglicol.

En los tres primeros estudios el tratamiento se llevó a cabo a una temperatura inicial de 5 °C y en el cuarto estudio la temperatura inicial fue de 20 °C, las cuales se modificaron debido a la compresión ejercida en contra de las fuerzas intermoleculares (calentamiento por compresión adiabática; para el agua el incremento de temperatura es 3 °C cada 100 MPa). El nivel de presión requerido se alcanzó a una velocidad de compresión de 5 MPa s^{-1} y la descompresión se realizó en cuatro etapas (cuatro válvulas de descompresión) y fue prácticamente instantánea. El equipo posee termocuplas para monitorear las temperaturas del fluido de compresión y de las muestras tratadas. A su vez, el equipo dispone de un transductor de presión para monitorear la presión de trabajo durante las distintas etapas de un ciclo (compresión, mantenimiento y descompresión).

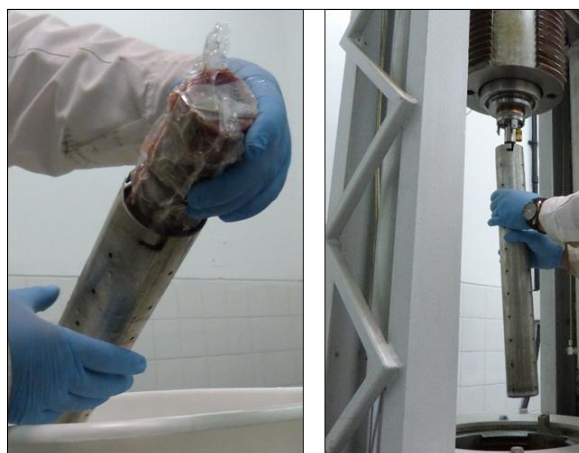


Figura 3.1. Carga de las muestras en la canasta de aluminio del equipo de APH.

3.1.3 Cocción de las muestras

Para realizar la cocción de las hamburguesas se utilizó una parrilla de doble contacto (George Foreman, EE. UU.) a una temperatura de 165-180 °C, hasta alcanzar una temperatura de 74 °C en el centro de las muestras (punto final de cocción). La temperatura en el centro de cada hamburguesa de carne fue monitoreada con una termocupla consistente en un termopar flexible tipo T, recubierto con cerámica resistente a altas temperaturas. Los datos fueron registrados con un multímetro digital marca Fluke modelo Hydra 2625A (John Fluke Mfg. Co., Inc., Everett, EE. UU.) y almacenados en el disco rígido de una *notebook* HP Compaq nx6320, conectando el multímetro digital y la *notebook* mediante una placa RS232.

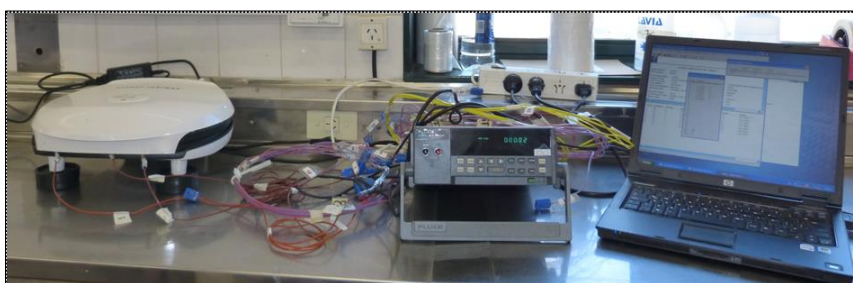


Figura 3.2. Cocción de las hamburguesas en parrilla de doble contacto (George Foreman), con control de temperatura con termocuplas, multímetro digital (Fluke modelo Hydra 2625A) y *notebook*.

A continuación, se describe el procedimiento de los ensayos experimentales realizados en este Trabajo de Tesis Doctoral.

3.2. Aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas sobre la materia prima (carne picada) para la elaboración de hamburguesas de carne bovina

En este estudio se evaluó el efecto de la aplicación de la tecnología APH sobre la carne picada, que luego fue utilizada para la elaboración de hamburguesas. Se analizó el efecto sobre las propiedades tecnológicas y fisicoquímicas, la textura y la microestructura de las hamburguesas preparadas con la carne picada presurizada. A su vez, se evaluó el efecto de los tratamientos aplicados sobre el comportamiento térmico y la caracterización molecular de las proteínas miofibrilares extraídas de las hamburguesas.

3.2.1 Materiales

Las sales utilizadas en la formulación de las hamburguesas fueron: cloruro de sodio (NaCl, Dos Anclas, Argentina) y tripolifosfato de sodio (TPFS, N 15-16 Chemische Fabrik Budenheim R.A Oetker, Alemania)

Las hamburguesas se formularon con la composición descrita en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Composición de las hamburguesas de carne bovina

Ingredientes	Contenido (% p/p)
Carne bovina	78,75
Grasa bovina	10,00
Agua	10,00
NaCl	1,00
TPFS	0,25

3.2.2 Procedimiento de preparación de las hamburguesas

La elaboración de las hamburguesas se realizó según el procedimiento que se detalla a continuación y se esquematiza en la Figura 3.3.

La carne y la grasa que se mantuvieron almacenadas en cámara de refrigeración a $1,0 \pm 1,0$ °C durante 48 h, posteriormente fueron picadas por separado, en una picadora marca Hobart (Ohio, EE. UU.) con una placa de picado con orificios de 4 mm de diámetro. Durante el picado se midieron las temperaturas de la carne y de la grasa, utilizando un termómetro de punción, controlando que las mismas no superaran los 10 °C.

La carne picada fue envasada al vacío, en bolsas Cryovac BB2800CB (Sealed Air, Buenos Aires, Argentina), con aproximadamente 800 g cada bolsa. Las dimensiones de las bolsas fueron 5 cm de ancho y 60 cm de largo; se realizó de esta manera para que cada bolsa cupiera en la canasta de aluminio del equipo de APH (diámetro 6 cm). Posteriormente las muestras fueron tratadas con APH, con niveles de presión de 150 o 300 MPa, aplicando un tiempo de mantenimiento de 1 o 5 min.

Luego del tratamiento con APH la carne y la grasa picadas se mezclaron en las proporciones mencionadas en la Tabla 3.1, la mezcla resultante fue picada nuevamente en la misma picadora indicada en los párrafos previos.

Posteriormente a la mezcla de carne y grasa se agregó el TPFS y se procedió al mezclado manual. Finalmente, se disolvió el NaCl en agua fría (temperatura <10 °C)

y la salmuera resultante se incorporó a la pasta, esta mezcla fue amasada manualmente durante 5 min.

La pasta resultante se embutió en tripas de colágeno (5 cm de diámetro y 50 cm de largo aprox.) utilizando una embutidora manual de 8 L (Scarpatti modelo SF8L, Argentina), los embutidos se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*freezer* Neba S400, Argentina) durante 24 h.

Transcurridas las 24 h, se cortó el embutido, utilizando una cortadora de fiambre (Berkel 834 Slicer - Rotterdam, Holanda) para obtener hamburguesas de 1,5 cm de espesor y 5 cm de diámetro.

Posteriormente, las hamburguesas fueron envasadas al vacío en bolsas Cryovac BB2800CB (Sealed Air, Buenos Aires, Argentina), luego un grupo de hamburguesas fue almacenado a $1,0 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h para el análisis de muestras crudas y otro grupo se almacenó a $-40 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*ultra freezer* Righi, EE. UU.) hasta el análisis de muestras crudas y cocidas.

Se elaboraron también hamburguesas control, que fueron elaboradas con el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero sin el tratamiento con APH de la materia prima.

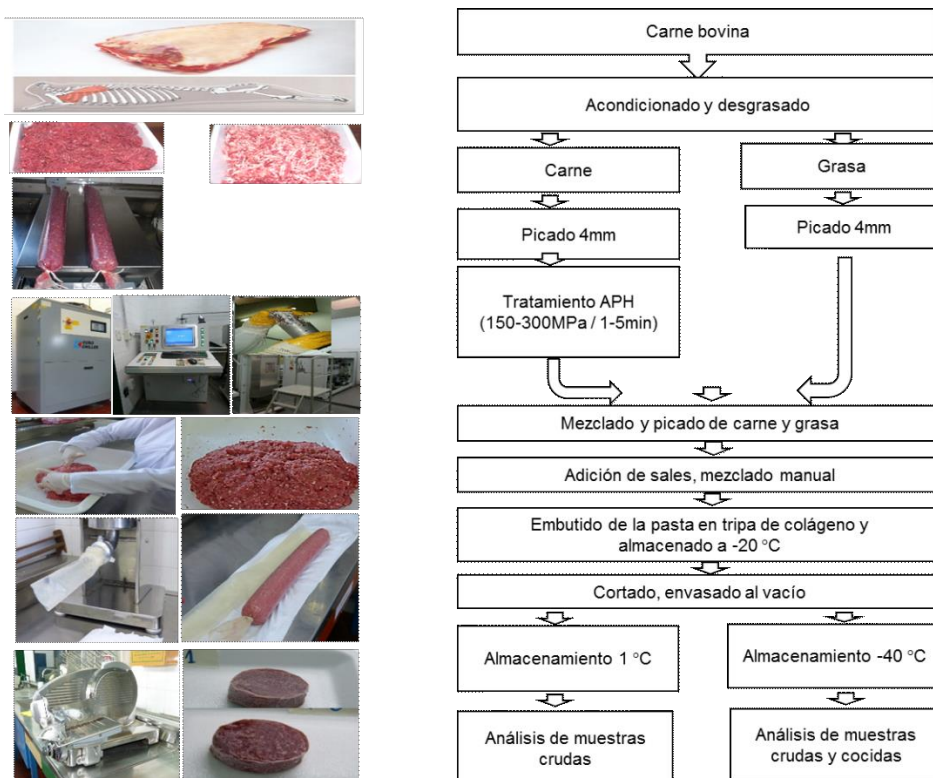


Figura 3.3. Esquema del proceso de preparación de hamburguesas en el estudio correspondiente a la aplicación de APH sobre la materia prima.

3.2.3 Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial 2x2 (Tabla 3.2): El primer factor (presión) con dos niveles (150 y 300 MPa) y el segundo factor (tiempo de mantenimiento de la presión) con dos niveles (1 y 5 min), se realizaron 3 repeticiones. Además, se elaboraron muestras controles (hamburguesas sin tratamiento con APH). La selección de estas condiciones de procesamiento se basó en estudios previos (Crehan y col., 2000), informándose a esos niveles de presión y tiempos de mantenimiento efectos favorables sobre los parámetros fisicoquímicos y tecnológicos de emulsiones cárnicas.

En el análisis estadístico de los resultados se aplicaron Análisis de Varianza (ANOVA) y Test de Tukey como procedimiento de comparación múltiple ($P < 0,05$). Para el análisis de datos se usó el *software* SPSS® Inc. Estadistics V12.

Tabla 3.2. Arreglo factorial: identificación de los tratamientos en el estudio correspondiente a la aplicación de APH sobre la materia prima

Tiempo de mantenimiento de la presión (min)	Nivel de Presión (MPa)	
	150	300
1	T1 P150	T1 P300
5	T5 P150	T5 P300

3.3. Aplicación de APH a hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales y con enzima transglutaminasa y fibra cítrica

3.3.1 Materiales

Los aditivos convencionales utilizados en la formulación de las hamburguesas fueron: Cloruro de Sodio (NaCl, Dos Anclas, Argentina) y Tripolifosfato de Sodio (TPFS, N 15-16 Chemische Fabrik Budenheim R.A Oetker, Alemania). Además, se incorporó enzima transglutaminasa (TG, SAPRONA TG 2S) y fibra cítrica (CEAMFIBRE 7000 F).

3.3.2 Diseño experimental

La metodología de superficie respuesta (RSM) es una herramienta estadística para optimizar procesos (Ferreira y col., 2007), permite evaluar la influencia de diferentes factores en las características de un producto.

Los diseños de optimización permiten obtener datos experimentales que luego se ajustan en un modelo polinomial de regresión lineal múltiple con el propósito de caracterizar una superficie de respuesta. Una de las mayores ventajas de la curva de respuesta es que con ella se pueden visualizar las respuestas para todos los niveles de los factores en el experimento (Kuehl, 2000).

El diseño Box-Behnken (BBD) tiene tres niveles (bajo, medio y alto, codificados como -1, 0 y +1) para cada factor, lo que permite una estimación eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden del modelo matemático (Box y Behnken, 1960; Ferreira y col., 2007).

En el presente estudio para evaluar el efecto de los factores (concentraciones de NaCl, TG, fibra cítrica y nivel de presión) se empleó el diseño de optimización Box-Behnken de cuatro factores con tres niveles cada uno (Tabla 3.3). Las concentraciones de los aditivos y los niveles de presión se establecieron según estudios previos (Trespacios y Pla, 2007; Grossi y col., 2011); estos autores informaron la mejora de la textura con la incorporación de TG y fibra de zanahoria, respectivamente, en productos cárnicos tratados con APH.

Se evaluaron 27 tratamientos que incluyeron tres puntos centrales para considerar el error experimental (Tabla 3.4), donde cada tratamiento fue una combinación de factores, que describen la relación entre las variables independientes estudiadas y las respuestas de interés.

Las variables respuestas (parámetros medidos) fueron analizadas mediante un diseño cuadrático completo conteniendo 15 términos, el cual se ajustó a la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Donde Y es la variable respuesta, β_0 es la constante, β_i , β_{ii} , y β_{ij} son los coeficientes correspondientes a los términos lineales, cuadráticos y a las interacciones, respectivamente, y X_i son las variables independientes codificadas, relacionadas linealmente con los factores del diseño (concentraciones de NaCl, TG y fibra cítrica y nivel de presión).

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0,05 ($p < 0,05$). Para el análisis de datos se usó el *software* Statistica V 12.

Tabla 3.3. Niveles de los factores utilizados en el diseño Box-Behnken del estudio correspondiente a la aplicación de APH en hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales, con enzima transglutaminasa (TG) y fibra cítrica

Factores	Nivel bajo (-1)	Nivel Medio (0)	Nivel Alto (1)
Concentración de NaCl (% p/p)	0,0	1,0	2,0
Concentración de enzima TG (% p/p)	0,0	0,3	0,6
Concentración de fibra cítrica (% p/p)	0,0	1,0	2,0
Nivel de Presión (MPa)	100	200	300

Tabla 3.4. Valores codificados y reales de las concentraciones de aditivos y del nivel de presión según el diseño Box-Behnken del estudio correspondiente a la aplicación de APH en hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales, con enzima transglutaminasa (TG) y fibra cítrica

N° de tratamiento	Valores codificados				Valores reales			
	Conc. NaCl	Conc. TG	Conc. Fibra	Nivel de Presión	Conc. NaCl % p/p	Conc. TG % p/p	Conc. Fibra% p/p	Nivel de Presión (MPa)
1	-1	-1	0	0	0,0	0,0	1,0	200
2	1	-1	0	0	2,0	0,0	1,0	200
3	-1	1	0	0	0,0	0,6	1,0	200
4	1	1	0	0	2,0	0,6	1,0	200
5	0	0	-1	-1	1,0	0,3	0,0	100
6	0	0	1	-1	1,0	0,3	2,0	100
7	0	0	-1	1	1,0	0,3	0,0	300
8	0	0	1	1	1,0	0,3	2,0	300
9	0	0	0	0	1,0	0,3	1,0	200
10	-1	0	0	-1	0,0	0,3	1,0	100
11	1	0	0	-1	2,0	0,3	1,0	100
12	-1	0	0	1	0,0	0,3	1,0	300
13	1	0	0	1	2,0	0,3	1,0	300
14	0	-1	-1	0	1,0	0	0,0	200
15	0	1	-1	0	1,0	0,6	0,0	200
16	0	-1	1	0	1,0	0	2,0	200
17	0	1	1	0	1,0	0,6	2,0	200
18	0	0	0	0	1,0	0,3	1,0	200
19	-1	0	-1	0	0,0	0,3	0,0	200
20	1	0	-1	0	2,0	0,3	0,0	200
21	-1	0	1	0	0,0	0,3	2,0	200
22	1	0	1	0	2,0	0,3	2,0	200
23	0	-1	0	-1	1,0	0	1,0	100
24	0	1	0	-1	1,0	0,6	1,0	100
25	0	-1	0	1	1,0	0	1,0	300
26	0	1	0	1	1,0	0,6	1,0	300
27	0	0	0	0	1,0	0,3	1,0	200

3.3.2.1 Función deseabilidad

Harrington (1965) desarrolló por primera vez la función de deseabilidad y fue posteriormente modificada por Derringer y Suich (1980). La aplicación de la función de deseabilidad permite inspeccionar la superficie de respuesta producida ajustando las respuestas observadas, utilizando una ecuación basada en los niveles de las variables independientes.

La función de deseabilidad primero convierte la respuesta en una función de deseabilidad individual en una escala adimensional (d_i) cuyos valores están

comprendidos entre 0 y 1, $d = 0$ para un valor de respuesta inaceptable y $d = 1$ para una completamente deseable.

Luego se utiliza una ecuación según se quiera, minimizar, maximizar o designar un valor a la respuesta. A continuación, se presentan la ecuación en la cual se quiere minimizar una respuesta:

$$d_i = \frac{Y_{max} - Y_i}{Y_{max} - Y_{min}}$$

En el caso que se quiera maximizar una respuesta se utiliza la siguiente ecuación:

$$d_i = \frac{Y_i - Y_{min}}{Y_{max} - Y_{min}}$$

En el caso que se quiera asignar un valor objetivo que no sea el máximo o mínimo se utiliza las siguientes ecuaciones:

$$d_i = \frac{Y_i - Y_{min}}{C_i - Y_{min}}$$

$$Y_{min} \leq Y_i \leq C_i$$

$$d_i = \frac{Y_i - Y_{max}}{C_i - Y_{max}}$$

$$C_i < Y_i \leq Y_{max}$$

Donde Y_{max} es el valor máximo deseado para la respuesta, Y_{min} es el valor mínimo deseado para la respuesta, Y_i es el resultado experimental, y C_i es la media del límite superior e inferior para las respuestas de dos lados.

Después de las transformaciones de todos los puntos de deseabilidad individuales, estos se convierten en la función de deseabilidad general "D" calculando su media geométrica. Entonces, $D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m)^{1/m}$, donde m es número de variables. Luego se aplica un algoritmo a la función D para determinar el conjunto de valores variables que lo maximizan (Ferreira y col., 2007).

3.3.3 Procedimiento de preparación de las hamburguesas

Las hamburguesas se formularon con la siguiente composición: 80 % de carne bovina; 10 % de grasa bovina; 10 % de agua; 0,5 % de TPFS y las concentraciones de aditivos (NaCl, TG, fibra) establecidas en el diseño experimental (Tabla 3.4). La proporción de carne en la formulación se modificó según las concentraciones de los aditivos incorporados.

La carne y la grasa fueron picadas por separado, en una picadora marca Hobart (Ohio, EE. UU.) con una placa de picado con orificios de 4 mm de diámetro (ver Figura 3.4). Durante el picado se midieron las temperaturas de la carne y de la grasa, utilizando un termómetro de punción, controlando que las mismas no superaran los 10 °C. La carne y la grasa se mezclaron y esta pasta fue picada nuevamente. A continuación, se agregó el TPFS y se mezcló manualmente.

Luego se agregó el NaCl disuelto en el agua (temperatura < 10 °C), también se agregaron el TG y fibra (incorporados directamente a la pasta), en las cantidades establecidas por el diseño experimental (Tabla 3.4) y posteriormente se procedió al mezclado manual durante 5 min.

La pasta resultante se embutió en tripas de colágeno (5 cm de diámetro y 50 cm de largo) y se congeló a -20 °C durante 24 h (*freezer* Neba, Argentina). El diámetro de la tripa de colágeno fue de 5 cm para que las hamburguesas tengan ese mismo diámetro y puedan ser colocadas sin inconveniente en la canasta de aluminio del equipo de APH. Transcurridas las 24 h, este embutido fue cortado con una cortadora de fiambre marca Berkel modelo 834 Slicer (Rotterdam, Holanda) formando hamburguesas de 5 cm de diámetro con 1,5 cm de espesor. Luego las hamburguesas fueron envasadas al vacío en bolsas Cryovac BB2800CB (Sealed Air, Buenos Aires, Argentina) y almacenadas en cámara de $1,0 \pm 1,0$ °C durante 24 h, hasta el procesamiento con APH.

Posteriormente, las hamburguesas fueron sometidas a tratamiento con APH, a los niveles establecidos en el diseño experimental (Tabla 3.4) y durante un tiempo de mantenimiento de 5 min y en las condiciones indicadas en el ítem 3.1.2. Luego del tratamiento un grupo de hamburguesas fueron almacenadas a $1,0 \pm 1,0$ °C durante 24 h para el análisis de muestras crudas y otro grupo se almacenó a $-40,0 \pm 1,0$ °C (*ultra freezer* Righi, EE. UU.), hasta el análisis de muestras crudas y cocidas.

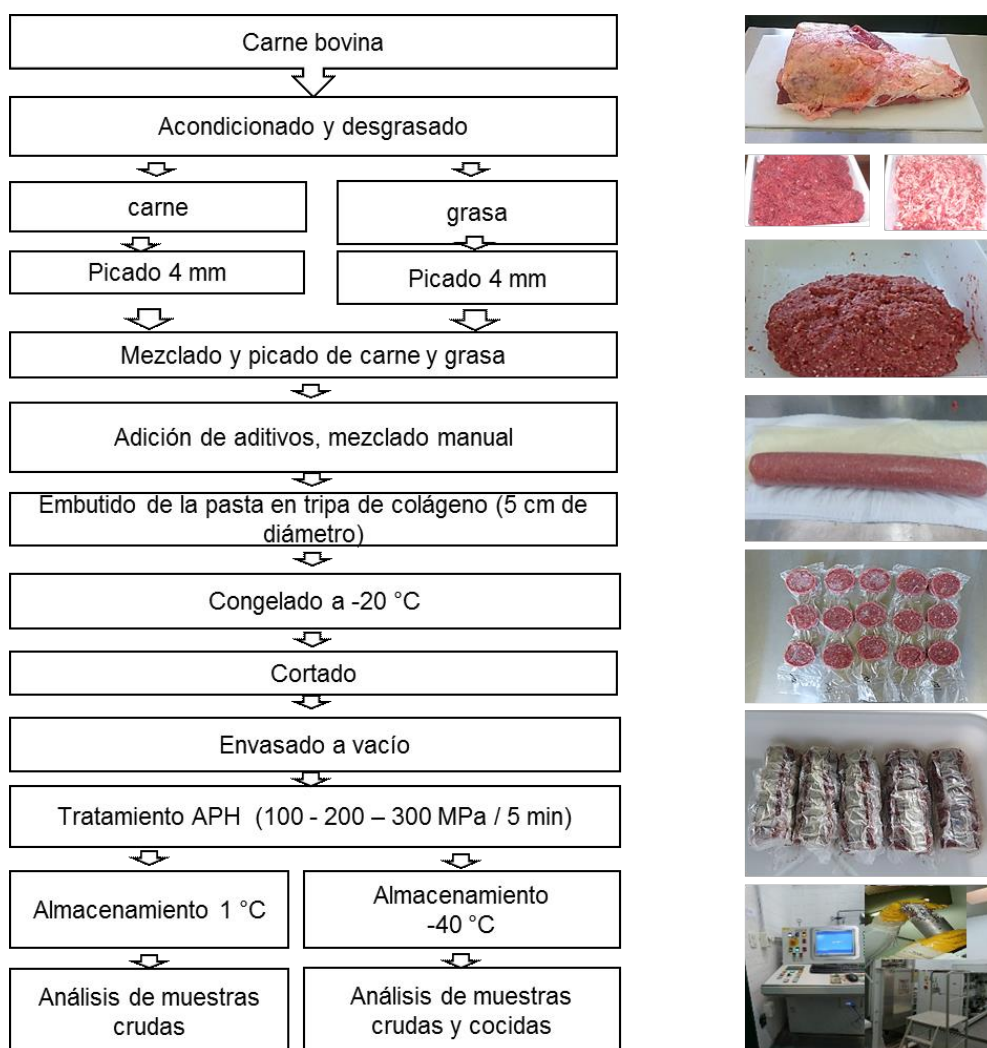


Figura 3.4. Esquema del proceso de preparación de hamburguesas y tratamiento con APH de las mismas.

3.4. Aplicación de tratamientos con APH a hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales y con compuestos antioxidantes

3.4.1 Materiales

Los aditivos convencionales utilizados en la formulación de las hamburguesas fueron: Cloruro de Sodio (NaCl, Dos Anclas, Argentina) y Tripolifosfato de Sodio (TPFS, N 15-16 Chemische Fabrik Budenheim R.A Oetker, Alemania). Se incorporó extracto de romero acuoso (Laboratorio BASEL, Argentina) y Eritorbato de Sodio (Tecnoalimenti, Argentina).

3.4.2 Diseño experimental

En este estudio se realizaron dos ensayos. Se aplicaron dos diseños Box-Behnken, cada uno de tres factores con tres niveles y tres puntos centrales. Este diseño experimental permite la obtención de 13 puntos experimentales de las tres variables, en comparación con el diseño original 3^3 con 27 experimentos. Por lo tanto, este diseño es más económico y eficiente.

Se seleccionaron las condiciones del procesamiento con APH y las concentraciones de los aditivos utilizados, según los resultados de los ensayos correspondientes a los ítems 3.2 y 3.3. El rango de concentraciones de extracto de romero se fijó mediante análisis sensorial, según se describe en el ítem 3.6.11.

Para el primer diseño los factores evaluados fueron: las concentraciones de NaCl y de extracto de romero y el nivel de presión (Tablas 3.5 y 3.6). Para el segundo diseño los factores fueron: las concentraciones de extracto de romero y de Eritorbato de Sodio y el nivel de presión (Tablas 3.7 y 3.8).

En cada diseño se aplicó un total de 15 tratamientos. Se denominó tratamiento a una determinada combinación de factores.

Las variables respuestas (parámetros medidos) fueron analizadas mediante un diseño cuadrático completo conteniendo 9 términos, el cual se ajustó a la siguiente ecuación

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Donde Y es la variable respuesta, β_0 es la constante, β_i , β_{ii} , y β_{ij} son los coeficientes correspondientes a los términos lineales, cuadráticos y a las interacciones, respectivamente, y X_i son las variables independientes codificadas, relacionadas linealmente con los factores del diseño.

Los resultados fueron analizados por el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de 0,05 ($p < 0,05$). Para el análisis de datos se usó el *software* Statistica V 12.

Tabla 3.5. Niveles de los factores utilizados en el diseño Box-Behnken correspondiente al estudio de aplicación de APH en hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales y con extracto de romero

Factores	Nivel Bajo (-1)	Nivel Medio (0)	Nivel Alto (1)
Concentración de NaCl (% p/p)	0,0	1,0	2,0
Concentración de extracto de romero (% p/p)	0,0	0,1	0,2
Nivel de Presión (MPa)	200	400	600

Tabla 3.6. Niveles codificados y reales de los factores utilizados en el diseño Box-Behnken correspondiente al estudio de aplicación de APH en hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales y con extracto de romero

Nro. Tratamiento	Valores codificados			Valores reales		
	Conc. NaCl	Conc. ext. de romero	Nivel de Presión	Conc. NaCl (% p/p)	Conc. ext. de romero (% p/p)	Nivel de Presión (MPa)
1	-1	-1	0	0,0	0,0	400
2	1	-1	0	2,0	0,0	400
3	-1	1	0	0,0	0,2	400
4	1	1	0	2,0	0,2	400
5	-1	0	-1	0,0	0,1	200
6	1	0	-1	2,0	0,1	200
7	-1	0	1	0,0	0,1	600
8	1	0	1	2,0	0,1	600
9	0	-1	-1	1,0	0,0	200
10	0	1	-1	1,0	0,2	200
11	0	-1	1	1,0	0,0	600
12	0	1	1	1,0	0,2	600
13	0	0	0	1,0	0,1	400
14	0	0	0	1,0	0,1	400
15	0	0	0	1,0	0,1	400

Tabla 3.7. Niveles de los factores utilizados en el diseño Box-Behnken correspondiente al estudio de aplicación de APH en hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales, extracto de romero y eritorbato de sodio

Factores	Nivel Bajo (-1)	Nivel Medio (0)	Nivel Alto (1)
Concentración extracto de romero (% p/p)	0,0	0,1	0,2
Concentración Eritorbato de Sodio (% p/p)	0,0	0,15	0,3
Nivel de Presión (MPa)	200	400	600

Tabla 3.8. Niveles codificados y reales de los factores utilizados en el diseño Box-Behnken correspondiente al estudio de aplicación de APH en hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales, extracto de romero y eritorbato de sodio

Nro. Tratamiento	Valores codificados			Valores reales		
	Conc. Ext. de romero	Conc. Eritorbato de Sodio	Nivel de Presión	Conc. ext. de romero (% p/p)	Conc. Eritorbato de Sodio (% p/p)	Nivel de Presión (MPa)
1	-1	-1	0	0,0	0,00	400
2	1	-1	0	0,2	0,00	400
3	-1	1	0	0,0	0,30	400
4	1	1	0	0,2	0,30	400
5	-1	0	-1	0,0	0,15	200
6	1	0	-1	0,2	0,15	200
7	-1	0	1	0,0	0,15	600
8	1	0	1	0,2	0,15	600
9	0	-1	-1	0,1	0,00	200
10	0	1	-1	0,1	0,30	200
11	0	-1	1	0,1	0,00	600
12	0	1	1	0,1	0,30	600
13	0	0	0	0,1	0,15	400
14	0	0	0	0,1	0,15	400
15	0	0	0	0,1	0,15	400

3.4.3 Procedimiento de preparación de las hamburguesas

Las hamburguesas se formularon con la siguiente composición: carne magra, 80 %; grasa bovina; 10 %; agua, 10 %, TPFS; 0,5 %; y las concentraciones de aditivos establecidas en el diseño experimental (NaCl, extracto de romero y Eritorbato de Sodio). Cabe destacar que en el segundo ensayo de este estudio (diseño indicado en la Tabla 3.8) se utilizó 1,5 % de NaCl, porque la concentración de esta sal no fue un factor de en este diseño. La cantidad de carne en las formulaciones se modificó según las concentraciones de los aditivos incorporados.

La carne y la grasa fueron picadas por separado, en una picadora marca Hobart (Ohio, EE. UU.) con una placa de picado con orificios de 4 mm de diámetro (Figura 3.5). Durante el picado se midieron las temperaturas de la carne y de la grasa, utilizando un termómetro de punción, controlando que las mismas no superaran los 10 °C. La carne y la grasa se mezclaron y esta pasta fue picada nuevamente. A continuación, se agregó TPFS y se mezcló manualmente.

Seguidamente se agregaron: NaCl disuelto en agua (temperatura < 10 °C), el extracto de romero y/o Eritorbato de Sodio se agregaron directamente a la pasta en las concentraciones establecidas por el diseño experimental (Tablas 3.6 y 3.8) y se procedió al mezclado manual durante 5 min.

La pasta de carne se embutió en tripas de colágeno (5 cm de diámetro y 50 cm de largo aproximadamente), los embutidos se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h (*freezer* Neba S400, Argentina).

Transcurridas las 24 h, el embutido se cortó con una cortadora de fiambre marca Berkel modelo 834 Slicer (Rotterdam, Holanda), para obtener hamburguesas de 5 cm de diámetro y 1,5 cm de espesor.

Las hamburguesas se envasaron al vacío en bolsas Cryovac BB2800CB (Sealed Air, Buenos Aires, Argentina) y almacenaron en cámara de $1,0 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, hasta el tratamiento con APH.

Las hamburguesas fueron sometidas a tratamiento con APH, aplicando los niveles de presión establecidos según el diseño experimental, durante un tiempo de mantenimiento de 5 min y en las condiciones indicadas en el ítem 3.1.2. Luego un grupo de hamburguesas fueron almacenadas a $1,0 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h para el análisis de las muestras crudas y otro grupo se almacenó a $-40,0 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*ultra freezer* Righi, EE. UU.), hasta el análisis de muestras crudas y cocidas.

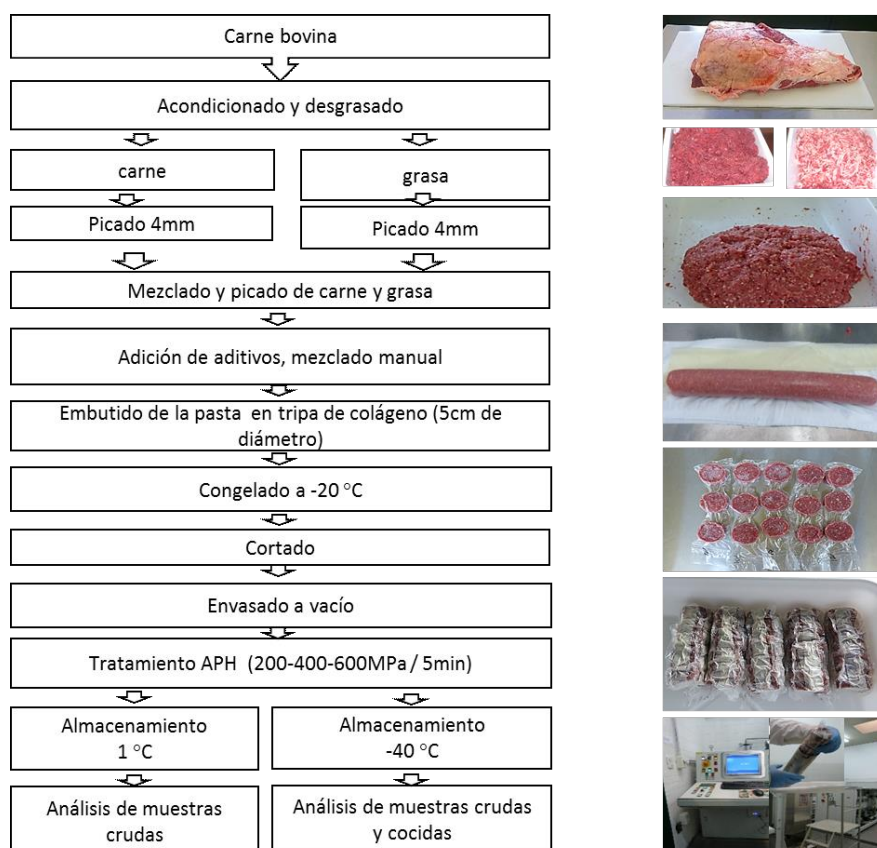


Figura 3.5. Esquema del proceso de elaboración de hamburguesas correspondiente al estudio de aplicación de APH en hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales, extracto de romero y Eritorbato de Sodio.

3.5. Evaluación del efecto del tratamiento con APH y de la formulación sobre la inactivación de un coctel de cepas nativas de STEC O157 inoculado en hamburguesas de carne bovina

3.5.1 Materiales

En este estudio se evaluó el efecto del tratamiento con APH y de la formulación sobre la inactivación de un coctel de cepas nativas de STEC O157 inoculado en hamburguesas, así como sobre la inactivación de la microbiota alteradora. Estudios previos informaron que el tipo y concentración de aditivos incorporados y el contenido de grasa utilizado en la formulación de productos cárnicos, posteriormente tratados mediante APH, tendrían un rol importante en la eficacia de los tratamientos sobre la inactivación de los microorganismos. En este estudio se modificó, en la formulación de las hamburguesas, el contenido de los componentes

(grasa y NaCl) que mayor efecto tendrían sobre la inactivación de cepas nativas de STEC O157.

Los aditivos utilizados en la formulación de las hamburguesas fueron: cloruro de sodio (NaCl, Dos Anclas, Argentina) y tripolifosfato de sodio (TPFS, N 15-16 Chemische Fabrik Budenheim R.A Oetker, Alemania).

Las hamburguesas se formularon con la siguiente composición.

Tabla 3.9. Composición de las hamburguesas correspondientes al estudio de evaluación del efecto de APH sobre la inactivación de un coctel de cepas nativas de STEC O157 inoculado en hamburguesas de carne bovina preparadas con distintas formulaciones

Tratamientos	Carne magra (% p/p)	Grasa (% p/p)	Agua (% p/p)	NaCl (% p/p)	TPFS (% p/p)
A	78,5	10	10	1	0,5
B	77,5	10	10	2	0,5
C	68,5	20	10	1	0,5
D	67,5	20	10	2	0,5

3.5.2 Control de la materia prima

Con el objeto de garantizar que la materia prima esté libre de STEC O157, inmediatamente después de adquirirla se realizó un control de dicho microorganismo. Para ello se agregaron 25 mL de agua peptona (AP) 0,1 % a una bolsa de Stomacher conteniendo 1 esponja deshidratada. Se escurrió la esponja presionando la bolsa externamente y se la extrajo con guantes. Se realizó el esponjado en toda la superficie del corte de carne bovina, realizando aproximadamente 10 barridos, cubriendo el área de un lado, 5 veces en sentido izquierdo-derecho-izquierdo, se invirtió la esponja y 5 veces sentido arriba-abajo-arriba. Finalmente, se colocó la esponja en la bolsa de Stomacher, se agregó 125 mL de TSBm (*Modified tryptone soy broth*) y se incubó a 42,0 °C. Luego de 18 h de incubación se tomó 1 mL del caldo de enriquecimiento, se centrifugó durante 5 min a 10000 rpm, se retiró el sobrenadante, el pellet se suspendió nuevamente en 150 µL de Tritón al 1 %, se hirvió durante 15 min y se centrifugó 10000 rpm durante 5 min. Para la obtención del ADN templado de las cepas control se procedió de la misma manera partiendo de un caldo de cultivo puro. Los ADN templados obtenidos se mantuvieron a $-20,0 \pm 2,0$ °C (*freezer* Frare, Argentina) hasta el análisis. Para la búsqueda del gen *stx* se realizó un análisis PCR MK cuyos cebadores, secuencias, gen target y condiciones de PCR se detallan en el anexo (anexo 2 y 3).

3.5.3 Preparación de las hamburguesas con diferentes formulaciones

Todo el proceso se realizó higiénicamente. La carne y la grasa fueron picadas por separado, en una picadora (*cutter* Hobart Ohio, EE. UU.) con una placa de picado con orificios de 4 mm de diámetro. Durante el picado se midieron las temperaturas de la carne y de la grasa, utilizando un termómetro de punción, controlando que las mismas no superaran los 10 °C. La carne y la grasa se mezclaron y esta pasta fue picada nuevamente. A continuación, se agregó TPFS y se mezcló manualmente. Seguidamente se agregó NaCl disuelto en agua (temperatura menor a 10 °C) y se continuó con el mezclado manual durante 5 min. Para cada formulación los ingredientes y aditivos se incorporaron según la composición descrita en la Tabla 3.9. Posteriormente, cada pasta cárnica con una formulación específica se separó en dos partes, una para la preparación de hamburguesas en las cuales se realizaría el análisis de la microbiota alteradora (hamburguesas no inoculadas) y la otra para la preparación de hamburguesas que serían inoculadas con un coctel de cepas nativas de STEC O157 (hamburguesas inoculadas).

3.5.4 Preparación de hamburguesas no inoculadas

La preparación de las hamburguesas correspondientes a cada formulación se realizó manualmente con un molde de 5 cm. Posteriormente, las hamburguesas fueron envasadas al vacío en bolsas Cryovac BB2800CB (Sealed Air, Buenos Aires, Argentina), utilizando una envasadora al vacío de doble campana (Rapivac modelo Maximax 800G) y luego fueron almacenadas a $1,0 \pm 1,0$ °C durante 24 h hasta el procesamiento con APH. Luego del procesamiento con APH, las hamburguesas fueron almacenadas a $1,0 \pm 1,0$ °C durante 48 h hasta el análisis de las muestras.

3.5.5 Preparación de inóculo

Para preparar el inóculo se utilizaron 5 cepas de STEC 0157: la cepa de referencia EDL 933 y cuatro aislamientos salvajes denominados I-014, I-015, I-104 e I-105 pertenecientes a la colección ITA-INTA. Las cepas conservadas a -80 °C fueron repicadas en agar sorbitol Mac Conkey (SMAC, Oxoid, Reino Unido) e incubada a $37,0 \pm 1,0$ °C durante 24 h (incubadora Sanyo MIR253, Japón). Una colonia aislada de cada cepa fue transferida a caldo Trypticase Soja (TSB, Oxoid, Reino Unido), el cual fue incubado a $37,0 \pm 1,0$ °C por 20 h, para obtener células en fase estacionaria. La preparación del inóculo se realizó centrifugando 1 mL de cada suspensión de cepa a

10000 rpm durante 5 min (Centrífuga Eppendorf 5417R, Alemania) y el pellet obtenido se suspendió en igual volumen de buffer fosfato salino (PBS, Bio-Rad, EE. UU.). Este procedimiento fue repetido otra vez con la diferencia de que el pellet final se suspendió en 100 μ L de PBS. Luego, se preparó un coctel de cepas mezclando volúmenes iguales de cada suspensión. El coctel permaneció refrigerado a $4,0 \pm 1,0$ °C (heladera Gafa, Argentina) hasta su inoculación.

3.5.6 Preparación de hamburguesas inoculadas con STEC O157

Para el procedimiento de inoculación de hamburguesas, se pesó una porción de 30 g de pasta y se colocó en bolsas Cryovac BB2800CB (Sealed Air, Buenos Aires, Argentina). Luego, se realizó la inoculación con 50 μ L del coctel preparado según se indica en el ítem 3.5.5 y se procedió al mezclado manual, presionando la bolsa externamente. Finalmente, se utilizó un molde que permitió formar una hamburguesa a partir de la pasta inoculada, sin retirar la bolsa. Luego de 15 min se realizó el envasado al vacío utilizando una envasadora al vacío (Sergio Catalan SC200, Argentina). Por razones de bioseguridad se utilizó una segunda bolsa que fue utilizada para envolver la primera bolsa que contenía la hamburguesa, envasando el conjunto al vacío. Las muestras inoculadas permanecieron en cámara de refrigeración ($1,0 \pm 1,0$ °C) durante 24 h hasta su procesamiento con APH. Luego del procesamiento las hamburguesas fueron almacenadas (24 h a 1 ± 1 °C) hasta su análisis.

3.5.7 Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (4x3). Los factores del diseño fueron: la formulación de las hamburguesas (Tabla 3.9) y el nivel de presión de APH aplicado en los tratamientos (0,1; 400 y 600 MPa) (Tabla 3.10). Para todos los niveles de presión, el tiempo de mantenimiento aplicado fue de 5 min, con las condiciones indicadas en el ítem 3.1.2. Tanto para las hamburguesas inoculadas como para las no inoculadas, se consideraron 2 unidades experimentales (réplicas) por cada tratamiento aplicado con tres repeticiones.

El análisis de los datos se realizó con el *software* Statistica V 12. SPSS Inc. Se realizó el análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia de 0,05 ($p < 0,05$).

Tabla 3.10. Arreglo factorial de la formulación y nivel de presión aplicada correspondiente al estudio de evaluación del efecto de APH sobre la inactivación de un coctel de cepas nativas de STEC O157 inoculado en hamburguesas de carne bovina preparadas con distintas formulaciones

Formulación	Nivel de Presión (MPa)		
	0,1	400	600
A	TA 0,1	TA 400	TA 600
B	TB 0,1	TB 400	TB 600
C	TC 0,1	TC 400	TC 600
D	TD 0,1	TD 400	TD 600

3.6. Determinaciones analíticas

3.6.1 pH

La medición del pH se realizó, por cada tratamiento, en 2 hamburguesas crudas y en 2 hamburguesas cocidas. En las hamburguesas crudas, se tomó una muestra de 5 g, la cual se colocó en una bolsa para Stomacher y se mezcló con 25 mL de agua destilada (pH corregido a 7). Luego la mezcla se homogeneizó 30 s en Stomacher (Lab Blender 400, Reino Unido). En el caso de las hamburguesas cocidas, las muestras fueron picadas con una procesadora Minipimer Braun modelo MR 5550. Luego se prepararon los homogenatos, mezclando en una bolsa para Stomacher 5 g de muestra procesada con 25 mL de agua destilada (pH corregido a 7). Luego la mezcla se homogeneizó 30 s en Stomacher. La medición de pH se realizó con un pH-metro (Thermo Orion modelo 710A+, Beverly MA, EE. UU.) equipado con un electrodo de pH (Thermo Orion modelo 8102BN ROSS Electrode, Beverly MA, EE. UU.) y una sonda ATC (Thermo Orion, Beverly MA, EE. UU.).



Figura 3.6. pH-metro Thermo Orion, con electrodo y sonda ATC.

3.6.2 Parámetros cromáticos

Los parámetros cromáticos fueron medidos en 3 hamburguesas crudas y en 3 hamburguesas cocidas correspondientes a cada tratamiento. Las muestras fueron analizadas con un colorímetro portátil marca Minolta modelo CR400, utilizando un iluminante D65 y un ángulo de observación de 2 °. Las muestras fueron colocadas sobre una bandeja de poliestireno expandido de color blanco. Las determinaciones (sistema CIEL*a*b*) se realizaron, en cada hamburguesa en 4 puntos ubicados a 0,5 cm del borde y a 90 ° entre sí y se promediaron los valores de los parámetros medidos en los 4 puntos.



Figura 3.7. Colorímetro portátil Minolta modelo CR 400.

3.6.1 Análisis del perfil de textura

El análisis del perfil de textura (TPA) se realizó en 8 muestras cilíndricas (1,5 cm de diámetro y 1,5 cm de altura) obtenidas de 2 hamburguesas cocidas correspondientes a cada tratamiento evaluado. Los cilindros se obtuvieron con sacabocados de las muestras cocidas y fueron equilibrados a temperatura ambiente (25 °C). Los parámetros de textura fueron determinados mediante una prueba de doble compresión, utilizando un analizador de textura marca Stable Micro Systems modelo TA.XTplus (Surrey, Reino Unido), equipado con una celda de carga de 50 kg. Los ensayos de compresión se realizaron con un accesorio cilíndrico (35 mm de diámetro). Las muestras fueron comprimidas al 50 %, se aplicaron las siguientes condiciones de velocidad: pre-ensayo 3 mm s⁻¹, ensayo 0,5 mm s⁻¹, post-ensayo 3 mm s⁻¹.



Figura 3.8. Izquierda: sacabocado para el corte de cilindros de las hamburguesas cocidas. Centro: muestras para análisis de textura obtenidas con el sacabocado. Derecha: accesorio cilíndrico y analizador de textura Stable Micro Systems modelo TA.XTplus.

Los parámetros que se evaluaron fueron: dureza, elasticidad, cohesividad y masticabilidad. La dureza se define como el valor de fuerza correspondiente al máximo del primer ciclo de compresión y tiene unidades de fuerza (N). El parámetro elasticidad indica la velocidad a la cual el material deformado vuelve a su condición original luego de aplicada una fuerza de deformación dada (Szczeniak, 1963) y se calcula como el tiempo transcurrido durante la segunda compresión en relación con el transcurrido durante la primera, por lo que no posee unidades. Con respecto al parámetro cohesividad, Szczeniak (1963) lo definió como la fuerza de las uniones internas que dan estructura al producto. La cohesividad se calcula como la relación entre el área de fuerza positiva obtenida durante la segunda compresión y el área de fuerza positiva obtenida durante la primera compresión. Este parámetro es una relación entre áreas por lo que no posee unidades. La masticabilidad se define como el producto de la dureza x cohesividad x elasticidad (posee unidades de fuerza N). Para el cálculo de parámetros mencionados se utilizó el *software Texture Exponent 32* (v 5.1.1.0), provisto por Stable Micro Systems.

3.6.2 Esfuerzo de corte y trabajo de corte mediante celda de Kramer

El esfuerzo de corte y el trabajo de corte se determinaron en 3 hamburguesas cocidas por cada tratamiento evaluado. Las hamburguesas cocidas y equilibradas a temperatura ambiente (25 °C), fueron cortadas por la mitad de su espesor, obteniéndose 2 discos de 5 cm de diámetro y con una altura de 0,75 cm cada disco. Luego, cada uno de esos discos fue pesado en una balanza granataria (Vibra AJ, Shinko Denshi Co. Ltd., Japón). El esfuerzo de corte y el trabajo de corte se determinaron utilizando una Celda de Kramer de 10 cuchillas acoplada a un analizador de textura marca Stable Micro Systems modelo TA.XTplus (Surrey, Reino Unido), equipado con una celda de carga de 50 kg . En las determinaciones se aplicaron las

siguientes condiciones de velocidad: pre-ensayo 1 mm s⁻¹, ensayo 1 mm s⁻¹, post-ensayo 10 mm s⁻¹. Los resultados fueron expresados como N g⁻¹ (fuerza por gramo) y mJ g⁻¹ (trabajo por gramo). Mayores detalles de esta determinación se presentan en Vaudagna y col. (2009).

3.6.3 Humedad expresable

Para la determinación de la humedad expresable (HE) se tomó una muestra (1,5 ± 0,2 g) utilizando una balanza analítica (Ohaus Explorer E12140, EE. UU.) de cada hamburguesa cocida y se colocó en un tubo de centrifuga de 50 mL, que contenía un capirote de papel de filtro Munktell 1003 (tamaño de retención de partícula: 6 µm) rodeado con un segundo papel de filtro Munktell 1F (tamaño de retención de partícula: 3 µm). Luego, las muestras fueron centrifugadas a 4800 xg por 20 min a 4 °C, utilizando una centrifuga Sorvall Modelo RC3C (Sorvall Instruments, EE. UU.). La HE se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$HE = \left[\frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \right] \times 100$$

Donde m_1 y m_2 son las masas de las porciones antes y después de la centrifugación, respectivamente. Mayores detalles de esta determinación se presentan en Szerman y col. (2011). Este parámetro fue evaluado en tres muestras por cada hamburguesa, se evaluaron 2 hamburguesas cocidas por cada tratamiento.

3.6.4 Pérdida de peso por cocción

La determinación de la pérdida de peso por cocción (PPC) se realizó pesando las hamburguesas antes y después de la cocción utilizando una balanza granataria (Vibra AJ, Shinko Denshi Co. Ltd., Japón), según se informa en Szerman y col. (2008). Las hamburguesas cocidas fueron secadas con papel absorbente para retirar el exceso de grasa y jugos liberados durante el tratamiento térmico. Luego se calculó la PPC mediante la siguiente relación:

$$PPC = \left[\frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \right] \times 100$$

Donde m_1 es la masa de la hamburguesa antes de la cocción y m_2 es la masa de la hamburguesa luego de la cocción. La PPC se determinó en 10 hamburguesas por cada tratamiento.

3.6.5 Determinación de Sustancias Reactivas al ácido 2-Tiobarbitúrico

El método del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) es uno de los procedimientos más antiguos y frecuentemente utilizados para evaluar la oxidación lipídica en alimentos. El malondialdehído (MDA) es un producto de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) que reacciona con el TBA para producir un complejo coloreado. Otros aldehídos tales como alquenes y 2,4-alcadienos también reaccionan por lo que es más adecuado utilizar la denominación “sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico” (TBARS).

En esta determinación se evaluó 3 hamburguesas crudas por cada tratamiento, se tomó una porción de 5 g de cada muestra. Las muestras pesadas se colocaron en bolsas para Stomacher, se les agregaron 10 mL de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % p/p en solución de ácido meta fosfórico al 1,6 % p/p. Las bolsas se colocaron en Stomacher (LabBlender 400, Seward Medical, UK) y se homogeneizó el contenido durante 2 min. Luego, se agregaron 10 mL de agua destilada y se homogeneizó por 30 s más. El homogenato se filtró inmediatamente a través de un papel de filtro Whatman N°1. El filtrado se colectó en probetas y cuando fue necesario se ajustó el volumen a 20 mL con agua destilada. A continuación, 2 mL se colocaron en tubos de ensayo (3 por cada muestra: blanco y duplicado del extracto), se mantuvieron refrigerados hasta el momento de agregar 2 mL de solución recién preparada de TBA 0,02 M en agua destilada. Los tubos se taparon y se colocaron en baño de agua a $25,0 \pm 2,0$ °C en oscuridad durante toda la noche.

El desarrollo de color fue medido en un espectrofotómetro (Lambda Bio 20, Perkin Elmer, EE. UU.) a 530 nm. Al mismo tiempo, se realizó una curva de calibración para cada ensayo utilizando como patrón una solución de TEP 10^{-3} M (1,1,3,3-tetraetoxipropano). El número de TBARS se define como mg de MDA por kg de muestra.

3.6.6 Determinación de la actividad antioxidante mediante la técnica de capacidad de reducción del ion férrico

Para determinar la capacidad antioxidante se utilizó la técnica denominada capacidad de reducción del ion Hierro (III) o ion férrico (la denominación en inglés es *ferric reducing/antioxidant power* -FRAP-). Este método determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. Los resultados son obtenidos por el aumento de absorbancia a 593 nm y expresados como equivalente $\mu\text{molar Fe}^{2+}$. Así, cuanto mayor poder antioxidante presenta la sustancia en estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} y, en consecuencia, más alta la señal de absorbancia.

El reactivo FRAP se preparó mezclando Buffer acetato (300 mM), TPTZ (10 mM en HCl 40 mM) y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM en agua) preparados en proporciones 10:1:1.

Para la preparación de la muestra, se tomaron 10 g de muestra de hamburguesa cruda + 20 mL de buffer fosfato de potasio 0,05 M; pH 7,7. Se homogeneizó a 3000 rpm durante 2 min y se mantuvo en baño de hielo. Se tomaron 2 mL del homogenato en eppendorf y se centrifugó (Centrífuga Beckman Coulter 22R, EE.UU.) a 10000 xg a 4 °C durante 30 min. Se usó el sobrenadante para la reacción con FRAP.

El desarrollo del color se midió en espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda Bio 20, Waltham, MA, EE. UU.) en cubeta de 1 cm de paso a 593 nm. Para ello se colocaron 2,5 mL de reactivo FRAP + 83 mL del sobrenadante de la muestra y se agitó, tomándose el valor de absorbancia final. Se determinó los equivalentes de Fe haciendo la curva de calibración con FeSO_4 (para el Fe^{2+}) de 0 a 1000 mM. En este parámetro se analizó por triplicado para cada tratamiento en hamburguesas crudas.

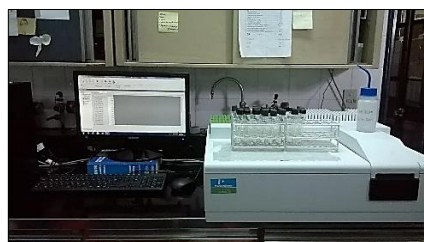


Figura 3.9. Equipo Perkin Elmer Lambda Bio 20 (Waltham, MA, EE. UU.)

3.6.7 Determinación del contenido de proteína

El contenido de proteína de las hamburguesas se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990, utilizando 6,25 como factor de conversión de N a proteínas. Se utilizó un equipo marca Foss Tecator modelo 2200 Kjeltex Auto Destilación (Hillerod, Dinamarca). Para cada tratamiento se evaluaron 3 hamburguesas.

3.6.8 Análisis térmico mediante calorimetría diferencial de barrido

Las propiedades térmicas de las proteínas de las hamburguesas se estudiaron utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC) marca Perkin-Elmer modelo Pyris-1 (Waltham, MA, EE. UU.). Se utilizó Indio (punto de fusión 156,6 °C, entalpía de fusión 28,46 J g⁻¹) como estándar para la calibración de temperatura y flujo de calor.

Para realizar el análisis térmico, se pesaron muestras de 27,0 ± 2,0 mg de cada hamburguesa cruda (balanza analítica, Mettler Toledo H54, ± 0,01 mg) en cápsulas de aluminio (capacidad máxima 50 µL), las que fueron selladas herméticamente. Se usó como referencia una cápsula vacía. Se programó una rampa de temperatura en aumento de 20,0 a 90,0 °C a 5 °C min⁻¹. El cambio de entalpía de desnaturalización térmica (ΔH_d) de las proteínas totales se estimó a partir del área (integral de flujo de calor en función del tiempo) y del contenido de proteínas de cada muestra. La temperatura de máxima absorción de calor (T_d) y el ΔH_d se determinaron mediante el *software* Origin Pro-8 (Northampton, MA, EE. UU.); ΔH_d se expresó como J g⁻¹ de proteína. Se usó el programa Peak Fit V4.0 (*Jandel Scientific Software*, Chicago, IL, EE. UU.) para realizar la deconvolución de las curvas y el cálculo del porcentaje de ΔH_d correspondiente a cada transición individual. El grado de desnaturalización se calculó de la siguiente manera:

$$GD = \left(1 - \frac{\Delta H_{d1}}{\Delta H_{d2}} \right) \times 100$$

Donde ΔH_{d1} fue el ΔH_d después del tratamiento APH y/o incorporación de aditivos y ΔH_{d2} fue el ΔH_d correspondiente a la hamburguesa control (con la incorporación de aditivos y sin presurizar). El análisis de DSC se llevó a cabo por cuadruplicado para cada tratamiento.

3.6.9 Caracterización molecular de proteínas cárnicas mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida

Las muestras de hamburguesas fueron analizadas mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (PAGE). Con este método las proteínas son puestas en contacto con el tensioactivo aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS), formando complejos desnaturalizados con carga negativa. El complejo proteína-SDS formado permite que la relación carga/masa de las proteínas de la muestra sea similar, por lo que la separación en gel queda determinada principalmente por las diferencias de peso molecular, con menor movilidad para los polipéptidos de mayor peso molecular y viceversa.

3.6.9.1 Extracción de proteínas

Se realizó la extracción de proteínas de muestras crudas siguiendo el procedimiento informado por Wang, Smith y Steffe (1990) con modificaciones. La extracción se realizó con un procedimiento de dos pasos:

El primer paso consistió en agregar 0,8 mL de tampón 0,1 M NaCl; 0,05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,5) a 0,2 g de carne (B0,1), se homogeneizó en vórtex, se agitó a 4 °C durante 20 min. A continuación, se llevó a cabo la centrifugación (13000×g durante 15 min, 10 °C, centrífuga Aircooled de microlitros Z 233 MK- 2 Herme, Gosheim, Alemania). El sobrenadante que contenía las proteínas solubles se utilizó para el análisis SDS-PAGE (B0,1).

El segundo paso de extracción consistió en exponer el sedimento obtenido después de la centrifugación realizada en el primer paso (B0,1) a 0,8 mL de tampón 0,6 M NaCl, 0,05 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, (B0,6) y se homogeneizó en vórtex. La segunda extracción también se llevó a cabo durante 20 min a 4 °C seguida por una centrifugación a 13000 × g durante 15 min, 10 °C. El sobrenadante que contenía las proteínas solubles en B0,6, se utilizó para análisis SDS-PAGE.

3.6.9.2 Preparación de los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y sembrado de las muestras

El procedimiento se realizó de acuerdo con Laemmli (1970). Se prepararon geles de concentración continua (concentrador 4 % p/p de acrilamida y separador 12 % p/p de acrilamida) para las muestras extraídas con B0.1. Además, se prepararon geles de concentración de acrilamida creciente (gradiente de 5 a 15 % p/p), mediante

el bombeo de soluciones de acrilamida a partir de dos vasos comunicantes. Se emplearon marcadores de peso molecular estándar para estimar los pesos moleculares de las proteínas (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

La electroforesis se llevó a cabo durante aproximadamente 90 min a corriente constante de 30 mA (Sistema Mini Protean III Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant solución de colorante azul (0,2 % p/p de azul brillante Coomassie, Etanol 42 % p/p, y Ácido Acético 17 % p/p en agua destilada).

Para el análisis de los geles, se obtuvieron las imágenes mediante un scanner. El análisis del perfil electroforético se evaluó por duplicado.

3.6.10 Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico se prepararon homogenatos para la siembra en profundidad. Para ello cada hamburguesa fue extraída de su envase de manera aséptica y depositada en una bolsa estéril con filtro (Nasco, Fort Atkinson, Wis., EE. UU.), a la cual se agregó un volumen de agua de peptona 0,1 % (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) suficiente para constituir una dilución inicial 1/10. A partir de allí se realizaron diluciones decimales sucesivas, el análisis fue en tres hamburguesas por cada tratamiento. Los recuentos que se analizaron en las hamburguesas fueron los siguientes:

3.6.10.1 Hamburguesas inoculadas:

STEC O157 en agar Sorbitol MacConkey (SMAC; Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD) incubado a 37 °C por 24 h. Este medio selectivo, no permite la recuperación de células injuriadas por los tratamientos, por lo tanto, se recuentan solamente células viables.

STEC O157 en Agar Tripticasa Soya (TSA; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) con agregado de Extracto de Levadura y Piruvato de Sodio al 1 % (TSAYP) incubado a 37 °C por 24 h. Este medio general también permite recuperar células injuriadas, por lo tanto, se recuentan tanto células sanas como injuriadas.

3.6.10.2 Hamburguesas no inoculadas:

Aerobios Mesófilos en PlateCount Agar (PCA; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) incubado a 37 °C por 48 h (incubadora Sanyo MIR253, Japón).

Aerobios Psicrótrofos en PlateCount Agar (PCA; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) incubado a 4 °C por 10 días (heladera Gafa, Argentina).

Enterobacterias en agar VioletRed BileDextrose (VRBD; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) incubado a 37 °C por 24 h (incubadora Sanyo MIR253, Japón).

Bacterias ácido lácticas en agar ManRogosa Sharp (MRS; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) incubado a 30 °C por 48 h (incubadora Dalvo, Argentina).

En el caso de los tratamientos correspondientes a las hamburguesas inoculadas, en los cuales no se detectaron células viables por recuento en placa directo, los homogenatos fueron enriquecidos en caldo TSB por una noche y analizados por aislamiento en placas SMAC para verificar la ausencia de STEC O157.

3.6.11 Análisis sensorial

Se elaboraron hamburguesas con distintas concentraciones de extracto de romero, para evaluar la percepción de este compuesto. Esta prueba se realizó como paso previo a la utilización de este extracto, como posible antioxidante en hamburguesas. Se utilizaron 2 tipos de extractos de romero: seco y acuoso (Laboratorio BASEL, Argentina).

El ensayo se realizó en 2 etapas. En la primera se sometieron a prueba las hamburguesas elaboradas con extracto de romero seco y en la segunda las hamburguesas elaboradas con extracto acuoso. Participaron 12 evaluadores en cada evaluación.

Para cada una de las etapas, la presentación de las muestras consistió en cuadrados de 1 x 1 cm, habiendo cortado los bordes de las hamburguesas y obtenido 9 cuadrados de cada una.

Inicialmente se solicitó a los evaluadores que olieran el extracto de romero (codificado como referencia) contenido en un recipiente de vidrio tapado y que identificaran y recordaran su olor. Posteriormente se les ofrecieron 6 muestras de hamburguesas en recipientes térmicos con tapa codificados con un número de 3 dígitos. Las primeras tres muestras fueron controles, y de la cuarta a la sexta correspondieron a muestras con concentraciones crecientes de extracto de romero (0,05- 0,1- 0,2 %). A cada evaluador se le solicitó que entre muestras bebiera agua y

que en la primera muestra que percibiera olor, gusto, sabor, aroma, *flavor* al extracto de romero de referencia, lo remarcara con una cruz.

En la evaluación de las hamburguesas elaboradas con extracto de romero seco y acuoso, el 75 % de los evaluadores no percibió el romero en las muestras. De acuerdo con estos resultados se concluyó que la adición de extracto seco o acuoso de romero, en las concentraciones utilizadas, no interfirió con las características sensoriales de las muestras.

3.6.12 Análisis de microestructura mediante observación con microscopio electrónico de barrido

El análisis de la microestructura se realizó mediante la observación con microscopio electrónico de barrido (MEB).

A partir de las hamburguesas almacenadas a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*ultra freezer* Righi, EE. UU.), se obtuvieron muestras en forma de disco de 0,5 mm de espesor, extraídas mediante un sacabocado.

Las muestras se fijaron con solución de 2,5 % de glutaraldehído en buffer Millonig a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Luego del período de fijación, se realizaron 3 lavados con buffer Millonig por 30 min cada uno.

La deshidratación se realizó con soluciones en concentraciones crecientes de acetona (30 x 2, 50, 70, 96 y 100 %). Se realizaron inmersiones de 30 min cada una. Posteriormente las muestras se secaron bajo campana durante 24 h y luego fueron montadas en una platina y recubiertas con oro.

Las muestras metalizadas se observaron al microscopio electrónico de barrido (FEI - QUANTA 250). La observación mediante MEB se realizó con aumentos de 60X, 250X, 1000X.

Capítulo 4

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas sobre la materia prima (carne picada) para la elaboración de hamburguesas de carne bovina

La aplicación de APH provoca cambios en la estructura y en la textura de la carne y de los productos cárnicos, estas modificaciones dependen de las condiciones de procesamiento y de los ingredientes agregados antes o después del tratamiento con APH. Los tratamientos con APH provocan cambios fisicoquímicos en las proteínas de la carne, como la despolimerización de la actina F, disociación de la actomiosina, solubilización de las proteínas miofibrilares e incluso agregación a presiones entre 100 y 300 MPa (Buckow y col., 2013). Estos cambios pueden favorecer las propiedades de unión de las partículas cárnicas, por lo tanto, su aplicación permitiría el desarrollo de nuevos productos. Distintos estudios evaluaron la aplicación del tratamiento con APH sobre diferentes productos cárnicos (salchichas, hamburguesas), como etapa previa al tratamiento térmico de los mismos (Mandava y col., 1994; Jiménez-Colmenero y col., 1998; Fernández-Martín y col., 2002; Sikes y col., 2009; Szerman y col., 2011; Ferrari y col., 2012; Speroni y col., 2014) o a la materia prima (carne picada), antes de preparar los productos (Crehan y col., 2000). Así, Crehan y col. (2000) observaron efectos favorables del tratamiento con APH de la materia prima sobre las propiedades de textura de las salchichas. Si bien varios trabajos previos estudiaron los efectos de los tratamientos con APH sobre las propiedades fisicoquímicas y tecnológicas de diferentes productos cárnicos, son escasas las investigaciones sobre la presurización de la materia prima para la elaboración de los productos. En este sentido se puede indicar que no existen estudios previos sobre la aplicación de APH a la materia prima para la elaboración de hamburguesas.

El objetivo de este estudio fue aplicar tratamientos con APH a la materia prima (carne picada), para la elaboración de hamburguesas de carne bovina y analizar el efecto del nivel de presión y del tiempo de mantenimiento de la presión sobre las propiedades tecnológicas, y fisicoquímicas, la textura y la microestructura. Además de realizar el análisis del comportamiento térmico y la caracterización molecular de las proteínas cárnicas miofibrilares extraídas de las hamburguesas para explicar los efectos observados sobre las propiedades tecnológicas y fisicoquímicas.

En este estudio se aplicó el diseño experimental y la preparación de las hamburguesas indicadas en el ítem 3.2 del Capítulo 3 “Materiales y Métodos”. Todos los parámetros se evaluaron en las hamburguesas elaboradas con materia prima tratada con APH y en hamburguesas control, excepto en el caso del análisis térmico, perfil electroforético y análisis de microestructura, los cuales se evaluaron en muestras de materia prima y muestras de hamburguesas.

4.1.1 pH

La Tabla 4.1 presenta los resultados del análisis del pH de muestras de hamburguesas crudas y cocidas preparadas con carne picada sometida a diferentes tratamientos con APH. Los resultados indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en las muestras de hamburguesas crudas, pero no en las correspondientes a las hamburguesas cocidas ($p > 0,05$).

Tabla 4.1. Resultados del análisis de pH de hamburguesas crudas y cocidas con diferentes tratamientos

Nivel de Presión (MPa)	Tiempo (min)		Hamburguesas crudas	Hamburguesas cocidas
150	1	(T1P150)	6,00(0,08) ^{bB}	6,17(0,07)
	5	(T5P150)	6,05(0,07) ^{bA}	6,15(0,10)
300	1	(T1P300)	6,07(0,05) ^{aB}	6,15(0,06)
	5	(T5P300)	6,12(0,07) ^{aA*}	6,18(0,09)
Valor p del modelo				
Modelo	Nivel de Presión		0,004	0,852
	Tiempo		0,045	0,866
	Nivel Presión x Tiempo		0,913	0,356
	CME		0,050	0,071
0,1 MPa (Control)			Hamburguesas crudas	Hamburguesas cocidas
			5,99 (0,06)	6,15 (0,07)

Nota: ^{a, b}: en la misma columna indica efecto significativo del nivel presión ($p < 0,05$). ^{A, B}: en la misma columna indica efecto significativo del tiempo de mantenimiento de la presión ($p < 0,05$). *: Indica diferencia significativa con la muestra control ($p < 0,05$). CME: Cuadrado medio del error.

En hamburguesas crudas el pH aumentó significativamente ($p < 0,05$) con el incremento del nivel de presión y del tiempo de mantenimiento de la presión. En el caso de las hamburguesas tratadas a 300 MPa durante 5 min se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) de 0,13 unidades con respecto al control. A su vez, se observó que el tratamiento a 300 MPa durante 1 min y los tratamientos a 150 MPa, no mostraron diferencias significativas con el control. Ma y Ledward (2004) informaron un aumento del pH de 0,14 unidades ($5,44 \pm 0,01$ a $5,58 \pm 0,02$) en carne bovina presurizada a 200 MPa por 20 min a 20 °C. A su vez, Szerman y col. (2011) informaron resultados similares en hamburguesas crudas tratadas a 100 o 300 MPa

por tiempos de 1 o 5 min. Cabe mencionar que estos autores aplicaron APH directamente sobre hamburguesas, por lo que, tanto en carne picada como en hamburguesas tratadas con APH, el efecto sobre el pH sería similar. El aumento del pH de la carne por parte del incremento de la presión se puede atribuir a la reducción de la cantidad de protones libres debido al aumento de la ionización que se produce en las proteínas miofibrilares a presiones elevadas (Macfarlane y col., 1981; McArdle y col., 2011) o a la disminución de grupos ácidos como consecuencia de los cambios de conformación debido a la desnaturalización de las proteínas (Mandava y col., 1994).

Estos resultados sugieren que el aumento del pH en las hamburguesas crudas por efecto del tratamiento con APH de la carne picada podría afectar otros parámetros fisicoquímicos de las hamburguesas crudas (capacidad de retención de agua, parámetros cromáticos, textura, etc.)

Los valores de pH de las hamburguesas cocidas fueron mayores que los valores de las hamburguesas crudas, pero no presentaron efecto de los factores estudiados (Tabla 4.2). Szerman y col. (2011) tampoco observaron cambios en el pH de hamburguesas cocidas a 72 °C en el punto de mínimo tratamiento, las cuales fueron tratadas crudas a 100 o 300 MPa por tiempos de 1 o 5 min. La ausencia del efecto de la presión sobre el pH de las hamburguesas cocidas se debería a que la influencia principal sobre el mismo la presentaría el tratamiento térmico (cocción), debido a su efecto sobre la desnaturalización de las proteínas miofibrilares. La desnaturalización térmica de las proteínas de la carne aumenta los valores de pH como consecuencia de la exposición en la superficie de residuos de los aminoácidos hidrófobos, disociación e ionización que se produce durante el calentamiento (Ledward, 1979).

4.1.2 Parámetros cromáticos

Los valores de los parámetros cromáticos de hamburguesas crudas y cocidas se presentan en la Tabla 4.2, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tratamientos con APH, además de diferencias con el control.

Tabla 4.2. Resultados del análisis de los parámetros cromáticos de hamburguesas crudas y cocidas con diferentes tratamientos

Nivel de Presión (MPa)	Tiempo (min)		Hamburguesas crudas			Hamburguesas cocidas		
			L*	a*	b*	L*	a*	b*
150	1	(T1P150)	43,31 (2,02) ^z	18,57 (3,46) ^a	11,31 (0,61) ^b	53,48 (0,79) ^b	10,63 (1,46) ^a	12,07 (0,38) ^b
	5	(T5P150)	43,57 (3,50) ^z	15,29 (4,38) ^a	11,06 (0,54) ^b	53,03 (1,17) ^b	10,42 (1,85) ^a	11,84 (0,47) ^b
300	1	(T1P300)	48,45 (2,39) ^{y*}	14,41 (2,96) ^b	11,90 (0,84) ^{a*}	55,55 (1,14) ^{a*}	9,22 (2,02) ^b	12,79 (0,52) ^{a*}
	5	(T5P300)	52,37 (1,98) ^{x*}	13,56 (2,98) ^{b*}	12,30 (0,81) ^{a*}	56,44 (1,25) ^{a*}	8,34 (0,86) ^b	12,91 (0,42) ^{a*}
Valor p del modelo								
Modelo	Nivel de Presión		0,001	0,017	0,001	0,001	0,003	0,001
	Tiempo		0,019	0,085	0,747	0,549	0,318	0,729
	Nivel de Presión x Tiempo		0,039	0,305	0,179	0,078	0,540	0,248
	CME		3,404	2,818	0,301	0,452	2,319	0,205
0,1 MPa (Control)			Hamburguesas crudas			Hamburguesas cocidas		
			L*	a*	b*	L*	a*	b*
			43,50 (2,13)	17,79 (1,72)	10,92 (0,80)	53,02 (1,43)	10,16 (1,33)	12,17 (0,45)

Nota: ^{a, b}: en la misma columna indica efecto significativo del nivel de presión ($p < 0,05$).
^{x, y, z}: en la misma columna indica efecto significativo de la interacción Presión x Tiempo ($p < 0,05$). *: Indica diferencia significativa con la muestra control ($p < 0,05$). CME: Cuadrado medio del error.

En hamburguesas crudas se observó que las muestras preparadas con carne picada tratada a 150 MPa no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los parámetros cromáticos en comparación con el control (0,1 MPa), pero si en las hamburguesas preparadas con carne picada tratada a 300 MPa a los tiempos evaluados (1 y 5 min). Estas presentaron valores de luminosidad significativamente mayores ($p < 0,05$) que las hamburguesas control. La interacción Presión x Tiempo, afectó significativamente ($p < 0,05$) el parámetro L*, mostrando que cuando la carne picada fue tratada al mayor nivel de presión y tiempo de mantenimiento (T5P300), las hamburguesas presentaron el mayor valor de L*. Asimismo, las hamburguesas preparadas con materia prima procesada con este tratamiento presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con las correspondientes al tratamiento T1P300. Además, las hamburguesas correspondientes a ambos tratamientos a 300 MPa presentaron valores de luminosidad significativamente diferentes ($p < 0,05$) comparados con las hamburguesas preparadas con carne picada tratada a 150 MPa (Tabla 4.2).

El valor del parámetro a* de hamburguesas crudas disminuyó y el valor de b* aumentó significativamente ($p < 0,05$), con el incremento del nivel de presión a 300 MPa. La aplicación de APH a 150 MPa a la carne picada, con independencia del tiempo de mantenimiento aplicado, no tuvo efecto significativo ($p > 0,05$) tanto en los valores del parámetro a* como de b*, con respecto a los valores de la muestra control

(Tabla 4.2). En cambio, cuando la carne picada fue tratada a 300 MPa, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) del parámetro a^* de las hamburguesas crudas para el tiempo de mantenimiento de la presión de 5 min. A su vez, se observó un aumento significativo del parámetro b^* para ese nivel de presión (300 MPa) y los dos tiempos de mantenimiento evaluados (1 y 5 min).

Los resultados encontrados concuerdan con estudios previos, así Ferrari y col. (2012) informaron que el valor de L^* de hamburguesas crudas aumentó con la aplicación de la presión en el rango de 100 a 300 MPa. Carlez y col. (1995) observaron incrementos significativos de L^* en el rango de 200 a 350 MPa en carne bovina picada, tornándose una coloración “rosácea”. Estos autores mencionan que este efecto de decoloración por la presurización se debió a tres fenómenos: (1) desnaturalización de la molécula de globina y/o desplazamiento del grupo hemo; (2) modificación del anillo de porfirina con una liberación del átomo de Hierro; (3) oxidación de la mioglobina. Por otra parte, Jung y col. (2003) mencionan que el aumento de la concentración de metamioglobina causó la disminución del parámetro a^* y el incremento del color marrón de la carne bovina presurizada a niveles mayores a 300 MPa. En cuanto al incremento del parámetro b^* , Goutefongea y col. (1995) indicaron que este efecto estaría relacionado con la oxidación de mioglobina.

En cuanto a las hamburguesas cocidas, las muestras elaboradas con la carne tratada a 150 MPa no difirieron de las hamburguesas control para ninguno de los parámetros evaluados. Sin embargo, cuando el nivel de presión se incrementó a 300 MPa, las hamburguesas cocidas mostraron un aumento significativo en L^* y b^* en comparación con el control, mientras el parámetro a^* no difirió significativamente de este (Tabla 4.2). A su vez, las hamburguesas cocidas, preparadas con carne picada tratada a 150 MPa, presentaron parámetros cromáticos significativamente diferentes de las hamburguesas cocidas preparadas con carne picada tratada a 300 MPa. Efectos similares se encontraron en salchichas de carne bovina (Sikes y col., 2009) y salchichas de cerdo (O'Flynn y col., 2014), tratadas directamente con APH. El efecto del tratamiento con APH sobre el color de las hamburguesas cocidas fue de menor magnitud que en las crudas, ya que el tratamiento térmico causa desnaturalización de la mioglobina, produciendo el color marrón característico de la carne cocida.

4.1.3 Análisis del perfil de textura

Se evaluaron los parámetros de dureza, elasticidad, cohesividad y masticabilidad de hamburguesas cocidas. Los valores de esos parámetros y los resultados del análisis estadístico correspondiente se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Resultados del análisis de los parámetros de perfil de textura de hamburguesas cocidas

Nivel de Presión (MPa)	Tiempo (min)		Dureza (N)	Elasticidad	Cohesividad	Masticabilidad (N)
150	1	(T1P150)	19,99(1,90) ^a	0,757(0,024)	0,592(0,016) ^{aA}	8,98(0,86) ^a
	5	(T5P150)	18,64(2,04) ^a	0,774(0,025)	0,587(0,038) ^{aB}	8,48(1,14) ^a
300	1	(T1P300)	17,65(3,15) ^{b*}	0,775(0,027)	0,585(0,019) ^{bA}	8,08(1,59) ^b
	5	(T5P300)	16,51(1,82) ^{b*}	0,776(0,041)	0,552(0,025) ^{bB*}	7,14(1,13) ^{b*}
Valor p del modelo						
Modelo	Nivel de Presión		0,006	0,334	0,021	0,009
	Tiempo		0,112	0,383	0,036	0,083
	Nivel de Presión x Tiempo		0,893	0,405	0,131	0,583
	CME		2,290	0,016	0,010	1,210
0,1 MPa (Control)			Dureza (N)	Elasticidad	Cohesividad	Masticabilidad (N)
			21,04 (3,74)	0,75 (0,016)	0,60 (0,016)	9,50 (1,69)

Nota: ^{a, b}: en la misma columna indica efecto significativo del nivel de presión ($p < 0,05$). ^{A, B}: en la misma columna indica efecto significativo del tiempo de mantenimiento de la presión ($p < 0,05$). *: indica diferencia significativa con la muestra control ($p < 0,05$). CME: Cuadrado medio del error.

Los valores de dureza y masticabilidad no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras tratadas a 150 MPa y el control. El incremento de presión a 300 MPa disminuyó significativamente ($p < 0,05$) los valores de dureza y masticabilidad (Tabla 4.3). Crehan y col. (2000) realizaron un estudio similar, en el cual trataron carne picada bovina para la elaboración de salchichas. Estos autores, al igual que en el presente trabajo, informaron la disminución de los valores de dureza y masticabilidad, cuando las salchichas fueron preparadas con carne picada sometida a 300 MPa. A su vez, Sikes y col. (2009) observaron un aumento de la dureza y masticabilidad en salchichas tratadas con APH a 200 MPa durante 2 min al compararlas con las muestras sin presurizar. Sin embargo, estos autores informaron que al incrementar la presión a 400 MPa aquellos parámetros disminuyeron, mencionando que el NaCl utilizado para la elaboración de las salchichas indujo el ablandamiento, lo que probablemente se debería al incremento de la capacidad de retención de agua por efecto del NaCl.

Szerman y col. (2011) y Ferrari y col. (2012), en hamburguesas de carne bovina, encontraron efectos opuestos a los observados en el presente trabajo,

informando que los valores de esos parámetros incrementaron con el aumento del nivel de presión. Es importante indicar que aquellos autores aplicaron condiciones similares de nivel presión y de tiempo de mantenimiento que, en el presente trabajo, pero trataron con APH las hamburguesas crudas y no la carne picada.

Con respecto a los valores de cohesividad, se observó que los valores de este parámetro disminuyen significativamente ($p < 0,05$) por efecto del nivel de presión y del tiempo de mantenimiento. Además, el tratamiento T5P300 disminuyó significativamente el valor de este parámetro en comparación con el control. Similares efectos fueron informados por Sikes y col. (2009) en salchichas presurizadas. Sin embargo, Ferrari y col. (2012), observaron que el aumento de la presión produjo un incremento la cohesividad en hamburguesas de carne bovina tratadas con APH.

El parámetro de elasticidad no fue afectado significativamente ($p > 0,05$) por los factores evaluados.

En función de estos resultados se inferiría que la aplicación de APH en hamburguesas tendría efecto distinto sobre la estructura del producto, cuando se trata con APH a la carne picada (materia prima) o al producto final. La textura de las hamburguesas está íntimamente relacionada con su microestructura, la cual depende de la conformación de las proteínas miofibrilares en las partículas de carne (Szerman y col., 2011). Por lo tanto, el efecto del tratamiento con APH sobre la modificación de la estructura de las proteínas miofibrilares influiría directamente sobre la textura del producto. En el caso del tratamiento con APH de la carne picada, se podría considerar que la modificación de las proteínas miofibrilares por efecto de la presurización y posterior incorporación de NaCl y TPFS disminuiría la interacción inter-partículas de carne, determinando una reducción de la dureza y masticabilidad de las hamburguesas. Este efecto será analizado con mayor detalle en los ítems 4.1.6, 4.1.7 y 4.1.8 correspondientes al análisis térmico y molecular de las proteínas miofibrilares y al análisis de la microestructura de las hamburguesas, respectivamente.

4.1.4 Esfuerzo y trabajo de corte

En la Tabla 4.4 se muestran los valores del esfuerzo de corte y del trabajo de corte de hamburguesas cocidas y los resultados del análisis estadístico correspondiente.

El nivel de presión aplicado a la carne picada afectó significativamente ($p < 0,05$) el esfuerzo de corte y el trabajo de corte de las hamburguesas cocidas. El mayor nivel de presión (300 MPa) produjo valores significativamente menores ($p < 0,05$) de estos parámetros en comparación con las hamburguesas tratadas a 150 MPa y con el control (Tabla 4.4). A su vez, los valores del esfuerzo y del trabajo de corte correspondientes a las hamburguesas preparadas con carne picada tratada a 150 MPa y los correspondientes al control, no difirieron significativamente ($p > 0,05$). El tiempo de mantenimiento de la presión no tuvo efecto significativo ($p > 0,05$) sobre estos parámetros.

Tabla 4.4. Resultados del análisis de los parámetros de esfuerzo y trabajo de corte

Nivel de Presión (MPa)	Tiempo (min)		Esfuerzo de corte (N/g)	Trabajo de corte (mJ/g)
150	1	(T1P150)	25,97(4,62) ^a	0,076(0,02) ^a
	5	(T5P150)	27,53(4,94) ^a	0,080(0,01) ^a
300	1	(T1P300)	22,21(2,80) ^{b*}	0,060(0,01) ^{b*}
	5	(T5P300)	19,90(1,68) ^{b*}	0,059(0,01) ^{b*}
Valor p del modelo				
Modelo	Nivel de Presión		0,001	0,001
	Tiempo		0,767	0,994
	Nivel de Presión x Tiempo		0,133	0,336
	CME		3,759	0,002
0,1 MPa (Control)			Esfuerzo de corte (N/g)	Trabajo de corte (mJ/g)
			28,51 (4,99)	0,08 (0,01)

Nota: ^{a, b}: en la misma columna indica efecto significativo del nivel de presión ($p < 0,05$).

*: Indica diferencia significativa con la muestra control ($p < 0,05$). CME: Cuadrado medio del error.

En estudios previos, en los que la aplicación de APH (similares niveles de presión y tiempo de mantenimiento de la presión que los utilizados en el presente trabajo) fue sobre hamburguesas crudas y no sobre la carne picada, se observó un efecto opuesto al presente trabajo. En esos trabajos se informaron valores significativamente mayores del esfuerzo de corte y del trabajo de corte con el incremento del nivel de presión (Szerman y col., 2011; Ferrari y col., 2012).

Realizando una comparación del esfuerzo de corte y del trabajo de corte con los parámetros de textura (dureza y masticabilidad) descritos en el ítem 4.1.3, observamos efectos similares de la presión. A su vez, como fue observado en los parámetros correspondientes al perfil de textura, se puede inferir que la aplicación de APH en hamburguesas tendría efecto distinto, sobre la microestructura y la textura del producto, cuando se trata con APH a la carne picada o al producto final.

4.1.5 Pérdida de peso por cocción y humedad expresable

Los valores de la pérdida de peso por cocción y de la humedad expresable de las hamburguesas cocidas y los resultados del análisis estadístico correspondiente se muestran en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Resultados del análisis de pérdida de peso por cocción y humedad expresable de muestras de hamburguesas cocidas

Nivel de Presión (MPa)	Tiempo (min)		Pérdida de peso por cocción (%)	Humedad expresable (%)
150	1	(T1P150)	31,38(2,00) ^{bB}	17,20(2,76) ^{xy*}
	5	(T5P150)	33,27(3,84) ^{bA}	17,53(0,60) ^{xy*}
300	1	(T1P300)	37,52(2,77) ^{aB*}	18,03(1,89) ^{x*}
	5	(T5P300)	43,19(3,51) ^{aA*}	15,32(1,86) ^{y*}
Valor p del modelo				
Modelo	Nivel de Presión		0,001	0,29
	Tiempo		0,001	0,074
	Nivel de Presión x Tiempo		0,078	0,025
	CME		3,114	1,939
0,1 MPa (Control)			Pérdida de peso por cocción (%)	Humedad expresable (%)
			29,90 (4,27)	20,09 (2,31)

Nota: ^{a, b}: en la misma columna indica efecto significativo del nivel de presión ($p < 0,05$). ^{A, B}: en la misma columna indica efecto significativo del tiempo de mantenimiento de la presión ($p < 0,05$). ^{x, y, z}: en la misma columna indica efecto significativo de la interacción Presión x Tiempo ($p < 0,05$). *: Indica diferencia significativa con la muestra control ($p < 0,05$). CME: Cuadrado medio del error.

La pérdida de peso por cocción (PPC) fue afectada significativamente ($p < 0,05$) por el nivel de presión y por el tiempo de mantenimiento de la presión. Los valores de PPC más altos se observaron en las hamburguesas correspondientes a los tratamientos T1P300 y T5P300, que fueron significativamente diferentes a las muestras de los tratamientos a 150 MPa y a las hamburguesas correspondientes al tratamiento control. A su vez el tratamiento control no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) con las muestras tratadas a 150 MPa (Tabla 4.5).

Ferrari y col. (2012) aplicaron tratamientos con APH en condiciones de presión y tiempo similares al presente trabajo, pero los tratamientos los aplicaron directamente a las hamburguesas, lo cual fue distinto a este estudio, en el que se aplicó APH a la carne picada antes de la preparación de las hamburguesas. Sin embargo, en ambos estudios se observaron efectos similares del tratamiento con APH sobre la PPC de las muestras. Crehan y col. (2000) aplicaron APH a la materia prima (carne picada bovina y de cerdo) para elaboración de salchichas, no obstante, estos autores no encontraron efecto significativo del tratamiento con APH (300 MPa - 5 min) sobre la pérdida de peso por cocción de las salchichas.

Con respecto al parámetro humedad expresable, se encontró efecto significativo ($p < 0,05$) de la interacción Presión x Tiempo, obteniendo el menor valor de humedad expresable en muestras sometidas a T5P300. A su vez, las muestras correspondientes a todos los tratamientos con APH presentaron valores de humedad expresable significativamente menores ($p < 0,05$) que las correspondientes al tratamiento control (Tabla 4.5).

El efecto del tratamiento con APH sobre la retención de agua de las proteínas cárnicas y en consecuencia sobre los parámetros PPC y HE presenta controversia entre diferentes publicaciones relacionados a este tema. Macfarlane y col. (1984) y Villamonte y col. (2013) informaron menores valores de PPC en hamburguesas de carne bovina y pastas de carne de cerdo, respectivamente, formuladas con concentraciones de NaCl entre 1 y 3% y tratadas con APH (niveles entre 100 y 350 MPa). A su vez, Szerman y col. (2011) y Ferrari y col. (2012) informaron que la aplicación de APH incrementó la PPC de las hamburguesas de carne bovina. Así mismo, Hayes y col. (2014) realizaron un análisis sensorial de hamburguesas tratadas con APH (400 MPa, 1 min, 4 °C) e informaron que las hamburguesas presurizadas presentaron menor jugosidad que las hamburguesas control. Beltran y col. (2003) propusieron que ese aumento de la PPC puede deberse al daño de la membrana celular que ocurre debido al tratamiento con alta presión. Otros autores postulan que el efecto del tratamiento con APH sobre la PCC y la HE podría deberse a la modificación de las interacciones intra e intermoleculares débiles, incluidas las interacciones proteína-agua, por efecto de la presión. Las proteínas miofibrilares, la miosina y la actina, y en cierta medida la tropomiosina, son los componentes principales que se unen al agua en el tejido muscular (Zayas, 1997). En este sentido, Chapleau y col. (2003) indicaron que la presurización modificó la estructura de las proteínas miofibrilares conduciendo a la aparición de sitios hidrofóbicos, este efecto explicaría parte de la disminución de la capacidad de retención de agua en las hamburguesas.

4.1.6 Análisis del comportamiento térmico de las proteínas cárnicas de la materia prima y las hamburguesas

En la Figura 4.1 se observa un termograma de una muestra control (carne picada sin adición de sales ni tratamientos con APH), el cual muestra 4 transiciones correspondientes a la desnaturalización de miosina, proteínas sarcoplásmicas, colágeno y actina. Este termograma es típico de carne bovina cruda, con características similares a las informadas por otros autores. Dependiendo de las

condiciones de pH, fuerza iónica y velocidad de calentamiento, estas proteínas pueden presentar distintas transiciones térmicas, así la miosina presenta dos transiciones, la primera entre 45 y 54 °C, que corresponde a la desnaturalización de su cabeza y la segunda entre 54 y 65 °C que corresponde a la desnaturalización de su cola. La desnaturalización de las proteínas sarcoplásmicas también puede presentar dos transiciones, la primera entre 54 y 62 °C y la segunda entre 68 y 70 °C, mientras que la desnaturalización del colágeno muestra una transición alrededor de 67 °C. La desnaturalización de actina se produce entre 75 y 82 °C (Stabursvik y Martens, 1980; Wright y Wilding, 1984; Yamamoto y col., 1994; Lorinczy y Belagyi, 1995, Fernández-Martín y col., 2000; Sikes y col., 2009; Speroni y col., 2014).

Si bien el grado de solapamiento de los picos fue importante, las transiciones correspondientes a la cabeza de miosina y a actina pudieron ser aisladas por deconvolución y los valores de sus áreas se usaron para estimar el grado de desnaturalización de estas proteínas.

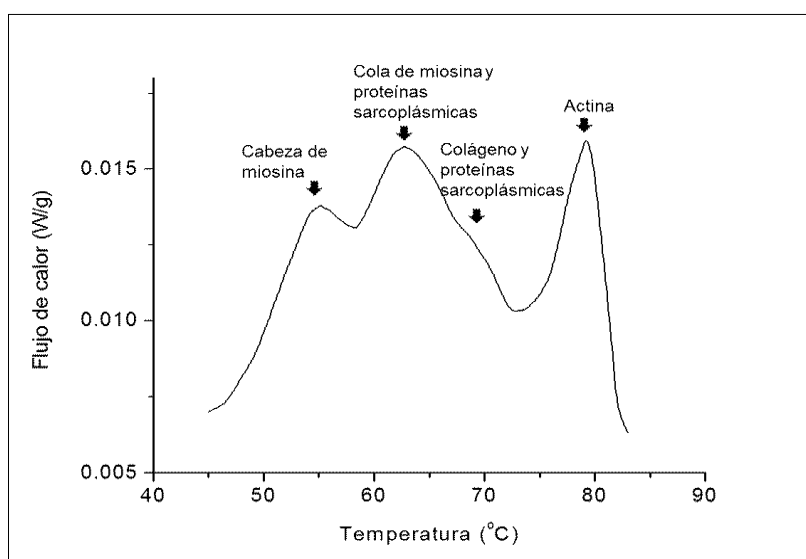


Figura 4.1. Termograma de una muestra control (carne picada sin adición de sales ni aplicación con APH).

4.1.6.1 Comportamiento térmico de las proteínas de la materia prima tratada con APH

La Figura 4.2 presenta los termogramas de muestras de carne picada tratadas con APH a distintos niveles de presión y tiempos de mantenimiento, además del control que fue una muestra de carne picada sin presurizar. A su vez, en la Tabla 4.6 se presentan las entalpías de desnaturalización (ΔH_d) del total de proteínas,

cabeza de miosina y actina, correspondientes a muestras de carne picada tratadas con APH y muestra control.

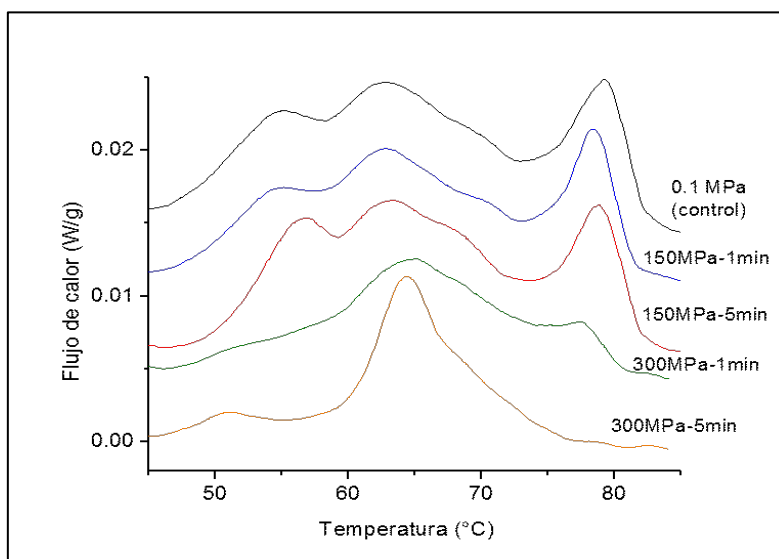


Figura 4.2. Termogramas de una muestra de carne picada control y muestras de carne picada tratadas con distintos niveles de presión y tiempos de mantenimiento.

Tabla 4.6. Entalpías de desnaturalización (ΔH_d) del total de proteína, cabeza de miosina y actina (J/g de proteína), correspondientes a muestras de carne picada tratadas con APH y muestra control

Nivel de Presión (MPa)	Tiempo (min)		ΔH_d total (J/g)	ΔH_d cabeza de miosina (J/g)	ΔH_d actina (J/g)
150	1	(T1P150)	12,16(0,87) ^x	3,00(0,02) ^a	2,45(0,25) ^x
	5	(T5P150)	13,31(0,80) ^x	2,86(0,29) ^a	2,47(0,22) ^x
300	1	(T1P300)	8,11(0,50) ^{y*}	0,74(0,14) ^{b*}	0,70(0,03) ^{y*}
	5	(T5P300)	6,47(0,50) ^{z*}	0,64(0,06) ^{b*}	0,28(0,03) ^{z*}
Valor p del modelo					
Nivel de Presión			0,001	0,001	0,001
Tiempo			0,487	0,168	0,033
Modelo	Nivel de Presión x Tiempo		0,002	0,802	0,023
CME			0,535	0,022	0,030
0,1 MPa (Control)			ΔH_d total (J/g)	ΔH_d cabeza de miosina (J/g)	ΔH_d actina (J/g)
			13,60(1,08)	2,80(0,08)	2,40(0,20)

Nota: ^{a, b}: en la misma columna indica efecto significativo del nivel de presión ($p < 0,05$). ^{x, y, z}: en la misma columna indica efecto significativo de la interacción Presión x Tiempo ($p < 0,05$). *: Indica diferencia significativa con la muestra control ($p < 0,05$). CME: Cuadrado medio del error.

El tratamiento con APH a 150 MPa no produjo efecto significativo ($p > 0,05$) en el ΔH_d del total de proteínas en comparación con el control (Tabla 4.6). En cambio, los tratamientos a 300 MPa disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) los valores del ΔH_d del total de proteínas en relación con el tratamiento control. A su vez, la interacción

Presión x Tiempo tuvo efecto significativo sobre la desnaturalización del total de proteínas. T1P300 y T5P300 fueron significativamente diferentes entre sí y los grados de desnaturalización para el conjunto de proteínas alcanzados en estos tratamientos fueron 40 y 52 %, respectivamente. Luego del tratamiento a 300 MPa la transición con mayor área correspondió a la desnaturalización del colágeno (Figura 4.2). El colágeno es resistente al tratamiento con APH debido a su estructura secundaria de α -hélice que está estabilizada principalmente por enlaces de hidrógeno (Gekko y Koga, 1983). Suzuki y col. (1993) informaron que el pico de colágeno (aislado de la carne luego que la misma fuera tratada a 300 MPa) no se vio afectado por la presión. A su vez, en la Figura 4.2 se observó la aparición de un pico a $51,44 \pm 0,21$ °C (T1P300) o a $51,34 \pm 0,31$ °C (T5P300). Este pico correspondería a agregados formados por proteínas parcialmente desnaturalizadas que estarían estabilizados por puentes de hidrógeno (Ma y col., 2004; Villamonte y col., 2013; Speroni y col., 2014).

Los tratamientos a 150 MPa (1 o 5 min) no promovieron desnaturalización en la cabeza de miosina ni en actina, pero luego del tratamiento a 300 MPa estas proteínas alcanzaron grados de desnaturalización significativamente diferentes a las muestras control. El nivel de presión afectó significativamente el ΔH_d de la cabeza de miosina y en el caso de la actina, ésta fue afectada por la interacción Presión x Tiempo. Por efecto del nivel de presión, la cabeza de miosina en el caso el tratamiento T5P300 alcanzó un grado de desnaturalización cercano al 80 %. A su vez, la desnaturalización de actina fue de 71 y 88 % para los tratamientos T1P300 y T5P300, respectivamente, siendo estos porcentajes significativamente diferentes ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que las proteínas miofibrilares son más sensibles al tratamiento con APH que otras proteínas cárnicas, como el colágeno (Tabla 4.6 y Figura 4.2).

Con respecto a la estabilidad térmica, la T_d de la cabeza de miosina aumentó ligeramente, ca. $1,15$ °C desde $55,31 \pm 0,11$ °C (control) con los tratamientos T5P150, T1P300 y T5P300 (Figura 4.2 pico 2 y Tabla 4.8). Por su parte, la T_d de actina disminuyó desde $78,99 \pm 0,29$ °C (control) hasta $76,39 \pm 0,36$ (T5P300) (Figura 4.2 pico 6 y Tabla 4.8). Estos resultados sugieren que la miosina y la actina respondieron de manera diferente al tratamiento con APH a pesar de que ambas proteínas alcanzaron altos grados de desnaturalización.

4.1.6.2 Comportamiento térmico de proteínas de hamburguesas elaboradas con materia prima tratada con APH

En la Figura 4.3 se presentan los termogramas de muestras de hamburguesas crudas elaboradas con carne picada tratada con APH y adicionadas con 1 % de NaCl y 0,25 % de TPFS. Además, se presenta un termograma del control, que correspondió a una muestra de hamburguesa elaborada con carne picada sin presurizar, adicionada con las sales indicadas previamente.

La presencia de sales disminuyó significativamente ($p < 0,05$) el ΔH_d del total de proteínas en el caso de las muestras control, de $13,60 \pm 1,08$ J/g (Tabla 4.6) a $9,51 \pm 0,84$ J/g (Tabla 4.7). Este efecto fue equivalente a un 30,1 % de desnaturalización y fue más evidente en el pico 3 (cola de miosina y proteínas sarcoplásmicas). Las T_d disminuyeron, como ejemplo, para la cabeza de miosina de $55,31 \pm 0,11$ a $54,29 \pm 0,28$ °C y para actina de $78,99 \pm 0,29$ a $73,49 \pm 0,25$ °C (Tabla 4.8, controles 0,1 MPa carne picada y hamburguesas). La desnaturalización parcial de las proteínas cárnicas y la desestabilización térmica se deberían fundamentalmente al efecto del NaCl y en menor medida al TPFS (Villamonte y col., 2013 y Speroni y col., 2014).

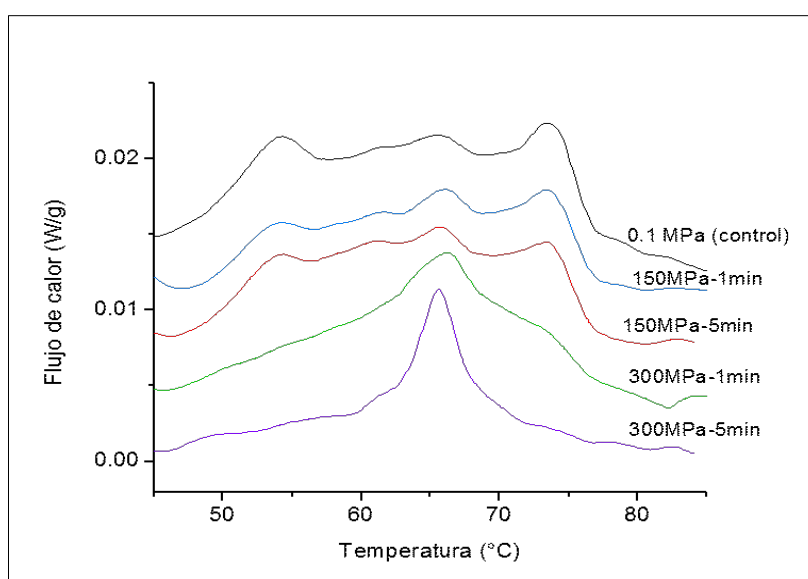


Figura 4.3. Termogramas de una muestra de hamburguesa control (elaborada con carne picada sin presurizar) y muestras de hamburguesas elaboradas con carne picada tratada con APH

Tabla 4.7. Entalpías de desnaturalización (ΔH_d) del total de proteína, cabeza de miosina, y actina (J/g de proteína), correspondientes a muestras de hamburguesas elaboradas con carne picada tratadas con APH y muestra control

Nivel de Presión (MPa)	Tiempo (min)		ΔH total (J/g)	ΔH cabeza de miosina (J/g)	ΔH actina (J/g)
150	1	(T1P150)	8,98(0,93) ^x	2,01(0,05) ^x	1,96(0,23) ^{aA}
	5	(T5P150)	10,28(0,54) ^x	2,37(0,21) ^w	1,72(0,29) ^{aB}
300	1	(T1P300)	6,50(1,74) ^{y*}	0,73(0,08) ^{y*}	0,75(0,02) ^{bA*}
	5	(T5P300)	4,11(1,15) ^{y*}	0,37(0,02) ^{z*}	0,31(0,01) ^{bB*}
Valor p del modelo					
Nivel de Presión			0,000	0,000	0,000
Tiempo			0,373	0,979	0,000
Nivel de Presión x Tiempo			0,009	0,000	0,984
CME			1,243	0,014	0,034
0,1 MPa (Control)			ΔH total (J/g)	ΔH cabeza de miosina (J/g)	ΔH actina (J/g)
			9,51(0,84)	2,19(0,32)	1,98(0,17)

Nota: ^{a, b, c}: en la misma columna indica efecto significativo del nivel de presión ($p < 0,05$). ^{A, B}: en la misma columna indica efecto significativo del tiempo de mantenimiento de la presión ($p < 0,05$). ^{x, y, z}: en la misma columna indica efecto significativo de la interacción Presión x Tiempo ($p < 0,05$). *: Indica diferencia significativa con la muestra control ($p < 0,05$). CME: Cuadrado medio del error.

El ΔH_d del conjunto de proteínas de las muestras de hamburguesas no fue afectado significativamente ($p > 0,05$) por los tratamientos a 150 MPa en relación con la muestra control (Tabla 4.7). Sin embargo, ese parámetro disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con los tratamientos a 300 MPa, con relación al control. Los valores de ΔH_d fueron afectados significativamente ($p < 0,05$) por la interacción Presión x Tiempo. El menor valor se observó en las muestras tratadas con el mayor nivel de presión y el mayor tiempo (T5P300), aunque no presento diferencias significativas ($p > 0,05$) con el valor correspondiente al tratamiento T1P300. El grado de desnaturalización fue de 32 % (T1P300) y 57 % (T5P300).

Los valores de ΔH_d de la cabeza de miosina fueron afectados significativamente ($p < 0,05$) por la interacción Nivel de Presión x Tiempo. A su vez, los valores de ΔH_d de actina presentaron efectos significativos de la presión y del tiempo de mantenimiento. En todos los casos, los valores de ΔH_d disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) para ambas proteínas. Los grados de desnaturalización con el tratamiento T5P300 para la cabeza de miosina y actina fueron de 83 y 84 %, respectivamente.

La aparición de una nueva transición a $50,78 \pm 0,27$ y $50,47 \pm 0,11$ °C en hamburguesas elaboradas a partir de carne picada tratada a T1P300 y T5P300 (Figura 4.3), respectivamente, se corresponde con lo observado en las muestras de carne

picada (Figura 4.2). Este comportamiento indica que dichas estructuras no se desensamblaron por la presencia de sales ni por el proceso de elaboración de las hamburguesas.

Tabla 4.8. Temperaturas de desnaturalización de los picos de proteínas de la materia prima (carne picada) y de hamburguesas

	Presión (MPa)	Tiempo (min)	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6
carne picada	0,1			55,31 (0,11)	63,17 (0,58)	69,52 (0,32)		78,99 (0,29)
		150	1		55,27 (0,22)	62,89 (0,53)	69,91 (0,52)	
	5			56,46 (0,45)	63,18 (0,35)	68,63 (0,12)		78,87 (0,18)
	300	1	51,44 (0,22)	56,39 (0,22)	64,53 (0,43)	68,78 (0,10)		76,89 (0,46)
		5	51,34 (0,31)	56,46 (0,44)	64,56 (0,21)	68,87 (0,27)		76,39 (0,36)
	hamburguesas	0,1			54,29 (0,28)	61,47 (0,14)	65,55 (0,05)	
150			1		54,19 (0,06)	61,41 (0,18)	66,06 (0,76)	
		5		54,60 (0,42)	61,31 (0,19)	65,76 (0,16)		73,73 (0,56)
300		1	50,78 (0,27)	54,67 (0,55)	60,81 (0,22)	65,31 (0,46)	70,47 (0,11)	72,71 (0,16)
		5	50,47 (0,11)	55,20 (0,48)	60,81 (0,55)	65,41 (0,17)	70,16 (0,09)	72,75 (0,13)

La incorporación de sales (1 % NaCl y 0,25 % TPFS) a muestras de carne picada tratada previamente con 300 MPa durante 5 min generó un aumento del grado de desnaturalización de 52 a 70 % (calculado en base al ΔH_d del total de proteínas sin sales y no presurizadas). Este resultado indica que estas sales modificaron la estructura de las proteínas previa y parcialmente desnaturalizadas por APH. Esta observación contribuiría a explicar las diferencias en el efecto del tratamiento con APH sobre la textura observado en este trabajo para las hamburguesas preparadas con carne picada presurizada y lo informado por otros autores para hamburguesas crudas tratadas con APH.

4.1.7 Análisis del perfil electroforético de las proteínas

El efecto de los distintos tratamientos sobre la solubilidad y la agregación de las proteínas se evaluó analizando geles de electroforesis (SDS-PAGE). Se utilizaron dos buffers para la extracción de las proteínas: B0,1 para las sarcoplásmicas y B0,6 para las miofibrilares. El perfil electroforético se evaluó en muestras de carne picada

tratada con APH y hamburguesas elaboradas con la carne tratada con APH adicionadas con 1 % de NaCl y 0,25 % de TPFS.

4.1.7.1 Análisis de la solubilidad de las proteínas de carne picada tratada con APH

La Figura 4.4 presenta los perfiles electroforéticos de las proteínas sarcoplásmicas de una muestra control y muestras de carne picada tratada con distintos niveles y tiempos de mantenimiento de la presión.

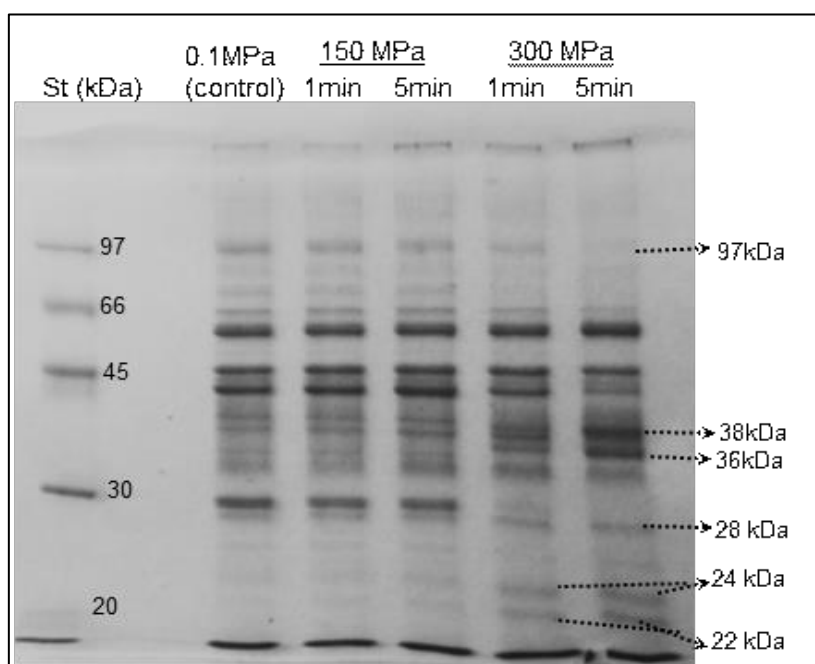


Figura 4.4. Perfil electroforético de proteínas sarcoplásmicas de muestras de carne picada tratada con distintos niveles y tiempos de presión. St: muestra estándar con pesos moleculares definidos.

Los perfiles electroforéticos de la muestra control y de las tratadas con 150 MPa fueron similares, lo que sugiere que estos tratamientos no afectaron la solubilidad ni la agregación de las proteínas sarcoplásmicas. Cuando el nivel de presión fue 300 MPa los perfiles fueron diferentes, con una disminución en la intensidad de las bandas de 97, 43 y 30 kDa. En el caso de los polipéptidos de 97 y 30 kDa, el tratamiento T1P300 produjo disminución de la intensidad y el tratamiento T5P300 la desaparición de sus bandas. Esto podría deberse a la desnaturalización y formación de agregados insolubles de estas proteínas, debido a enlaces disulfuro intermoleculares o interacciones hidrofóbicas formadas como consecuencia de la aplicación de la presión a 300 MPa, dando como resultado agregados insolubles resistentes a la extracción con el B0,1 (Grossi y col., 2014). La aplicación de 300 MPa aumentó la intensidad de las bandas de 38, 36, 28, 24 y 22 kDa. Este efecto se debería a la disociación de

proteínas en polipéptidos más pequeños y/o a la solubilización de proteínas. Similares resultados fueron informados por Speroni y col. (2014), en hamburguesas de carne bovina tratadas a 200 o 300 MPa durante 5 min y por Marcos y col. (2010), en muestras de carne bovina tratadas a 200 o 400 MPa durante 20 min. Al relacionar estos resultados con los correspondientes a la Figura 4.2 y a la Tabla 4.6 concluimos que las proteínas sarcoplásmicas mostraron cambios en sus perfiles electroforéticos cuando alcanzaron cierto grado de desnaturalización. La interacción Nivel de Presión x Tiempo detectada para el ΔH_d del total de proteínas se manifestó en estos ensayos como una mayor magnitud de los efectos en los perfiles electroforéticos cuando las muestras estuvieron sometidas a 300 MPa durante el mayor tiempo estudiado.

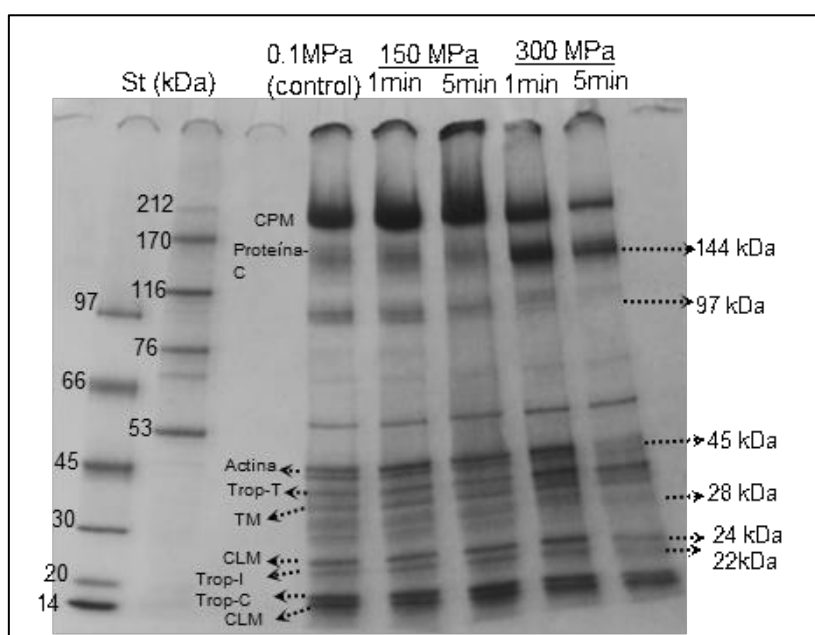


Figura 4.5. Perfil electroforético de proteínas miofibrilares de muestras de carne picada tratada con distintos niveles y tiempos de presión. St: muestra estándar con pesos moleculares definidos.

Los perfiles electroforéticos de las proteínas miofibrilares extraídas de las muestras tratadas con 150 MPa fueron indistinguibles de los correspondientes a las muestras control (Figura 4.5). El aumento del nivel de presión hasta 300 MPa provocó cambios cuyas magnitudes fueron función del tiempo de mantenimiento de la presión en ciertas bandas. Las bandas correspondientes a la proteína-C (144 kDa) y a tropomiosina (32 kDa) aumentaron en intensidad con ambos tratamientos T1P300 y T5P300. Las bandas correspondientes al polipéptido de 97 kDa, a actina, al polipéptido de 28 kDa y a la cadena liviana de miosina (CLM, 24 kDa) disminuyeron en intensidad con el tratamiento T5P300, pero no con T1P300. Este efecto diferencial entre T1P300 y T5P300 sugiere una interacción entre Nivel de Presión y Tiempo,

como se había encontrado para el ΔH_d para el total de proteínas y para actina en el ítem 4.1.6.1. En el caso de la cadena pesada de miosina (CPM), la disminución de intensidad de banda se detectó para ambos tiempos, con un efecto mayor en T5P300. Como en el caso de las proteínas sarcoplásmicas, la agregación e insolubilización de proteínas miofibrilares se verificó cuando estas se encontraron desnaturalizadas por la aplicación de APH. Similares resultados fueron informados por Speroni y col. (2014).

4.1.7.2 Análisis de la solubilidad de las proteínas extraídas de hamburguesas elaboradas con carne picada tratada con APH

Los perfiles electroforéticos de las proteínas sarcoplásmicas de muestras de hamburguesas elaboradas con carne picada tratada con APH, adicionadas con 1 % de NaCl y 0,25 % de TPFS, se presentan en la Figura 4.6, además de un control correspondiente a hamburguesas elaboradas con carne picada sin presurizar y con sales.

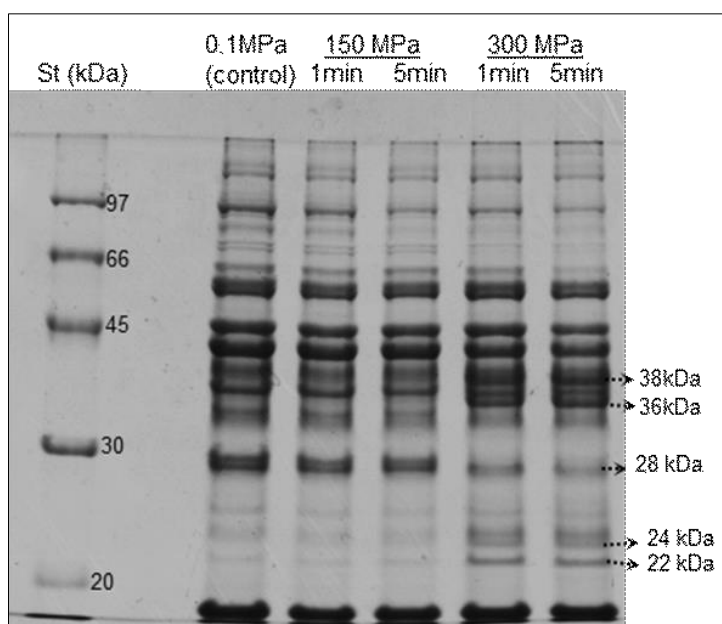


Figura 4.6. Perfil electroforético de proteínas sarcoplásmicas de muestras de hamburguesas elaboradas con 1 % de NaCl y 0,25 % de TPFS. St: muestra estándar con pesos moleculares definidos.

La incorporación de sales promovió la aparición de bandas de peso molecular mayores a 97 kDa que tuvieron intensidad similar en todas las condiciones de tratamientos. Las muestras tratadas con 150 MPa exhibieron perfiles similares a los de la muestra control. De manera similar a lo observado en las muestras correspondientes a la carne picada, el incremento de la presión hasta 300 MPa (para ambos tiempos) promovió el aumento de la intensidad de las bandas de 38, 36, 28, 24

y 22 kDa y la disminución de la intensidad de la banda de 30 kDa. Sin embargo, la presencia de sales redujo la disminución de la intensidad de las bandas de 97 y 43 kDa observado en la Figura 4.4. Esto sugiere que los agregados en que se habrían involucrado estos polipéptidos fueron desensamblados por las sales incorporadas en la formulación de las hamburguesas. A su vez, la presencia de sales canceló las diferencias entre T1P300 y T5P300 observadas en la Figura 4.4, lo que sugiere que las sales completarían un efecto solubilizante sobre ciertas proteínas sarcoplásmicas cuando son incorporadas luego de un tratamiento con APH.

La Figura 4.7 presenta los perfiles electroforéticos de las proteínas miofibrilares de muestras de hamburguesas elaboradas con carne picada tratada con APH y adicionada con sales, junto a su respectivo control.

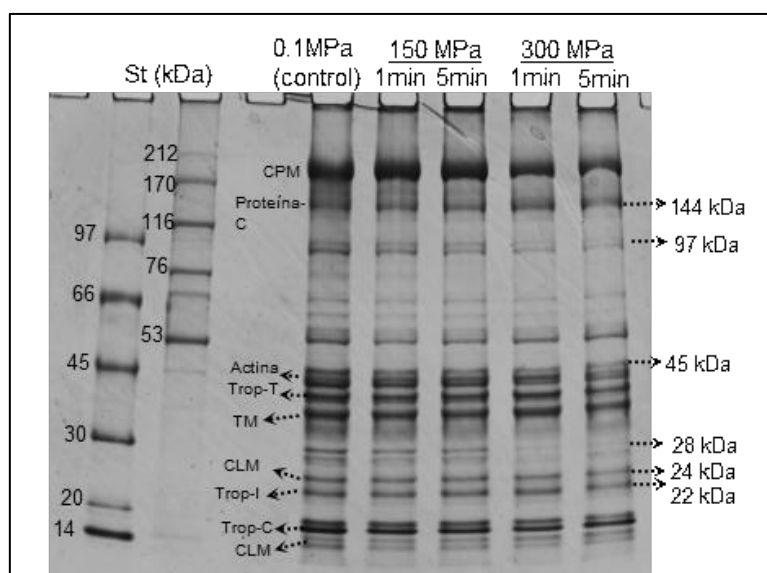


Figura 4.7. Perfil electroforético de proteínas miofibrilares de muestras de hamburguesas elaboradas con 1 % de NaCl y 0,25 % de TPFS. St: muestra estándar con pesos moleculares definidos.

Los tratamientos con 150 MPa no mostraron diferencias con respecto al control. En las muestras de hamburguesas en las que la carne picada fue tratada a 300 MPa, se observó una ligera disminución (más notable con el tratamiento de mayor tiempo) de las bandas correspondientes a la cadena pesada de miosina (CPM), polipéptido de 97 kDa, actina (42 kDa) y cadena liviana de miosina (CLM, 24 kDa). Dado que estas disminuciones fueron más pronunciadas en los perfiles de la carne picada (Figura 4.5), estos resultados indicarían que los agregados inducidos por APH fueron parcialmente desensamblados por la presencia de las sales. El polipéptido de 28 kDa sufrió una disminución importante de intensidad tanto en T1P300 como con T5P300, este efecto fue mayor que el observado en la carne picada (Figura 4.5). La

proteína-C (144 kDa) mostró un leve incremento de intensidad con el tratamiento a 300 MPa con respecto a las muestras no tratadas o tratadas a 150 MPa (Figura 4.7). Este efecto fue de menor magnitud que el observado en las muestras de carne picada (Figura 4.5), lo que sugiere que los aditivos favorecieron su insolubilización. Los datos obtenidos de los perfiles electroforéticos de las proteínas miofibrilares fueron similares a los informados por Yang y col. (2015), quienes indicaron que la miosina y la actina tuvieron menor solubilidad en muestras de salchichas con 1 % de NaCl tratadas a 300 MPa que en las no presurizadas. Así mismo, Speroni y col. (2014) informaron la agregación de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares de hamburguesas elaboradas con 1 % de NaCl y 0,25 % de TPFS y tratadas a 300 MPa, a diferencia del presente trabajo en el cual se aplicó APH a la materia prima.

Los resultados de estos ensayos indican que los tratamientos con 150 MPa no modificaron la agregación o solubilidad de las proteínas cárnicas de manera detectable por SDS-PAGE. Los tratamientos con 300 MPa promovieron la agregación y formación de especies insolubles que involucraron tanto a proteínas sarcoplásmicas como miofibrilares desnaturalizadas. Los agregados inducidos por APH fueron parcialmente desensamblados por la presencia de 1 % NaCl y 0,25 % TPFS. Estos fenómenos de desnaturalización e insolubilización detectados luego de los tratamientos a 300 MPa, en los que se favorecería la interacción proteína-proteína dentro de la fibra en lugar de la interacción proteína-agua y de la interacción proteína-proteína fuera de la fibra, serían en parte responsables de las disminuciones en los parámetros de dureza, esfuerzo y trabajo de corte, humedad expresable y del aumento de pérdidas por cocción. A su vez, la incorporación de aditivos luego del tratamiento APH canceló parte de las diferencias entre T1P300 y T5P300 que se habían detectado en las muestras de carne picada. Este efecto de las sales explicaría la falta de efecto del tiempo de tratamiento en parámetros como dureza, esfuerzo y trabajo de corte (Tablas 4.3 y 4.4).

4.1.8 Análisis de la microestructura de muestras de carne picada y de hamburguesa mediante microscopía electrónica de barrido

El análisis de la microestructura mediante microscopía electrónica de barrido nos proporcionó información de las características topológicas de las muestras analizadas, la que contribuirá a la interpretación del efecto de los tratamientos aplicados sobre los parámetros tecnológicos y fisicoquímicos de las hamburguesas de carne bovina. Las micrografías mostradas en la Figura 4.8, corresponden a muestras

de carne picada tratadas con distintos niveles de presión y tiempo de mantenimiento de la presión.

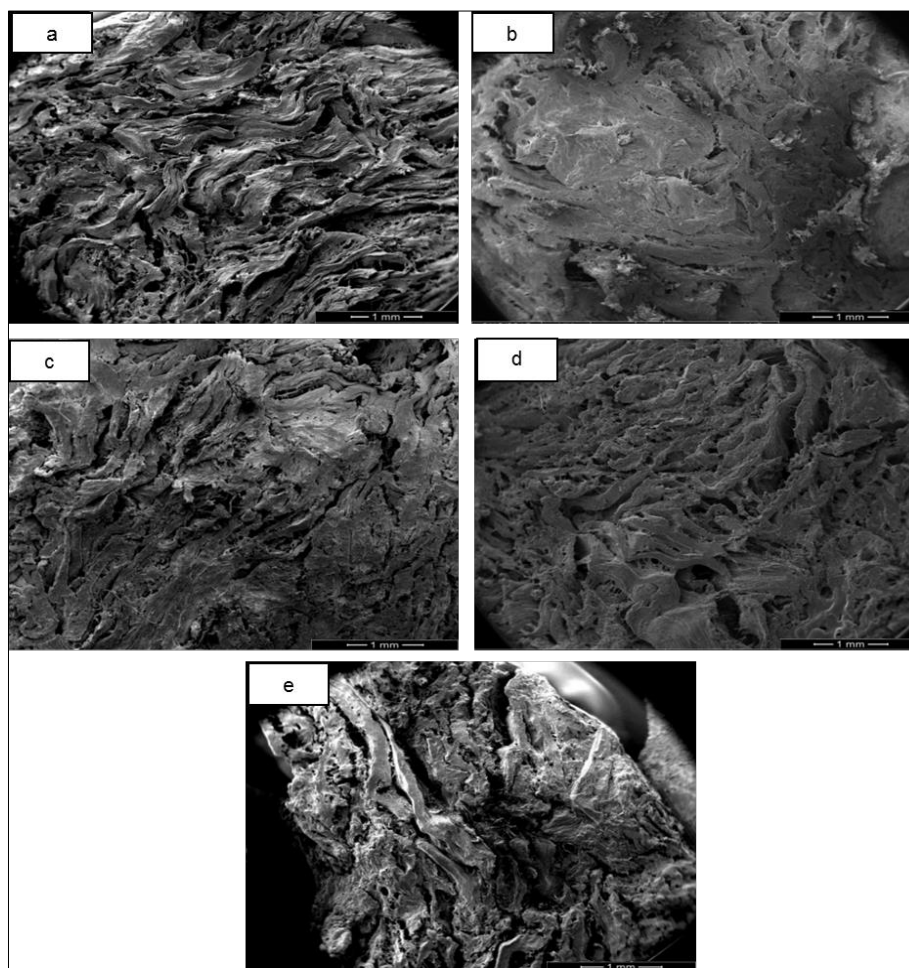


Figura 4.8. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (60X), de muestras de carne picada, a: control (sin tratamiento con APH), b: T1P150, c: T5P150, d: T1P300, e: T5P300

En la muestra control (a) se observa una estructura heterogénea, siendo evidente el efecto del picado de la carne, confirmado por el grado de mezclado de cortes transversales y longitudinales de los haces de fibras, y la disrupción del tejido. Cuando la muestra fue tratada con T1P150 (b), se observa que las partículas de carne y los haces de fibras están más próximos, por lo que la estructura se presenta más compacta. A su vez, con un tratamiento de T5P150 (c) también se observa mayor compactación de las partículas y de los haces de fibras musculares en comparación al control. Con la aplicación del tratamiento T1P300 (d), la compactación de las partículas y de los haces de fibras fue menor que en las muestras tratadas a 150 MPa y con la aplicación del tratamiento T5P300 (e) la separación de las partículas y de los haces de fibras (cortes longitudinales y transversales) fue más notoria. Al incrementar el tiempo de mantenimiento de la presión de 1 a 5 min para el nivel de presión 300

MPa, se observó mayor separación de las partículas y de los haces de fibras musculares. Esto se debería a la conformación y estructura de los haces de fibras que están recubiertos por membranas de tejido conectivo (perimio), las cuales al someterlas al picado sufren disrupción y luego con el tratamiento con APH se separan aún más.

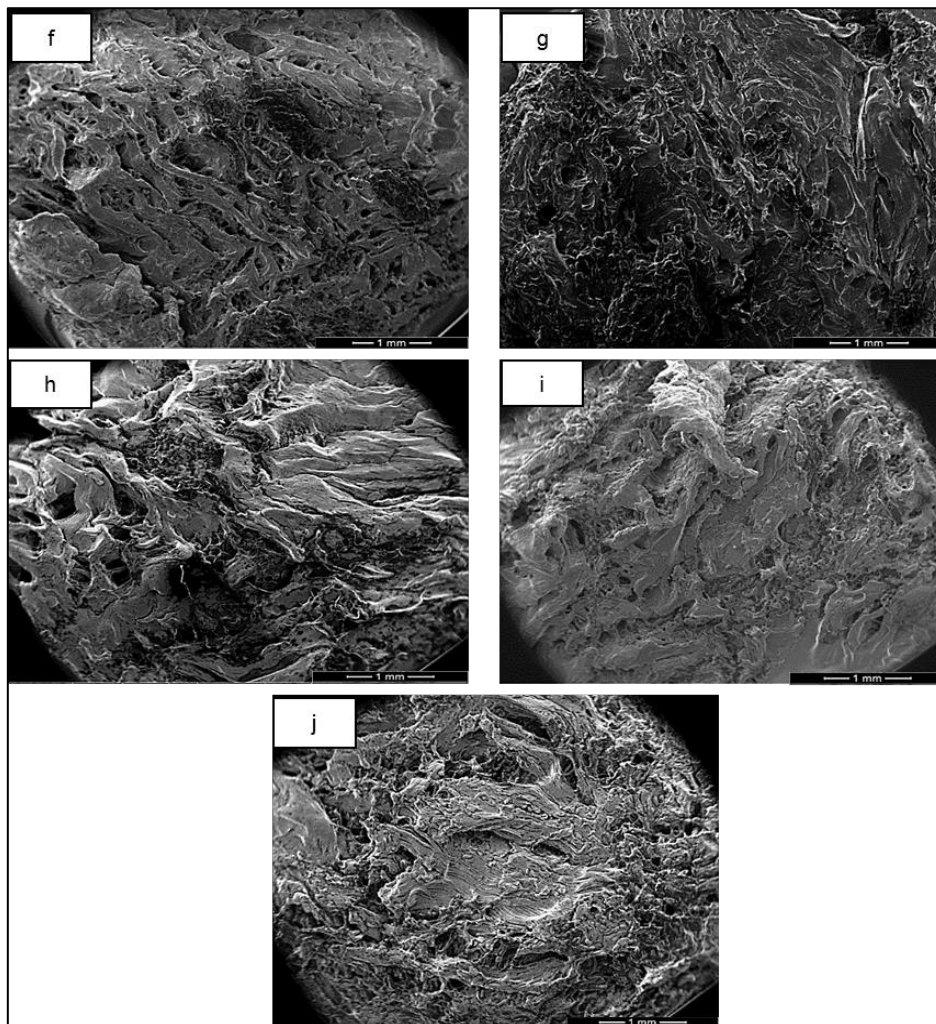


Figura 4.9. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (60X), de muestras de hamburguesas elaboradas con NaCl (1 %) y TPFS (0,25 %) y tratadas con APH. Muestra de hamburguesa control (f). T1P150 (g). T5P150 (h). T1P300 (i). T5P300 (j).

En la Figura 4.9, la micrografía “f” corresponde a una muestra de hamburguesa que fue preparada con carne picada que no fue tratada con APH (muestra control). La adición de las sales y el posterior amasado de la carne para la elaboración de las hamburguesas facilitan la extracción y solubilización de las proteínas cárnicas. Esto permite una mayor interacción entre las fibras y los haces de fibras, observándose que estas muestras presentaron una estructura más homogénea y compacta que las correspondientes a carne picada (Figura 4.8). Además de estas

características, la extracción y solubilización de las proteínas de la carne se observó en las micrografías a través de su efecto sobre la topografía de la muestra, la cual presentó un aspecto de mayor rugosidad, que correspondería a agregados proteicos en la superficie de las partículas.

Las micrografías “g” y “h” correspondientes a las muestras de hamburguesas elaboradas con carne picada tratada a 150 MPa presentaron una estructura más homogénea y compacta, tipo pasta, que la muestra sin presurizar (micrografía “f”).

En las micrografías “i” y “j” de las muestras de hamburguesas elaboradas con carne picada tratada a 300 MPa, además de observarse el efecto de las sales (extracción y solubilización de las proteínas) se observa mayor separación de las partículas y de los haces de fibras, lo cual se debería al tratamiento de la carne picada a 300 MPa, lo que aún fue mayor cuando el tiempo de mantenimiento fue de 5 min.

El efecto del tratamiento a 300 MPa de la carne picada para la elaboración de las hamburguesas no favorecería la cohesión de las partículas y de los haces de fibras, sino por el contrario, incrementaría su separación, como se observó en las micrografías. Este efecto sería dependiente del nivel de presión y del tiempo de mantenimiento de la presión en los rangos evaluados.

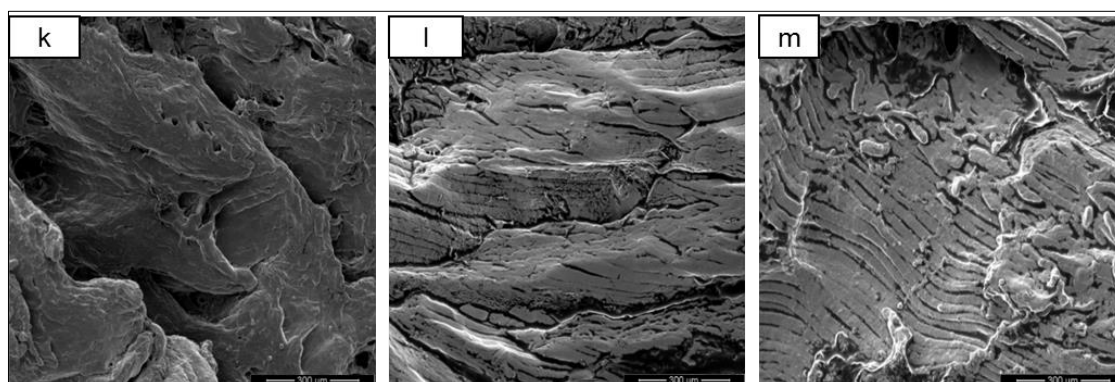


Figura 4.10. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (250X). Muestras de hamburguesas elaboradas con NaCl (1 %) y TPFS (0,25 %) y tratadas con APH. k: muestra de hamburguesa control. l: T5P150. m: T5P300.

Con un aumento mayor (250X), se corroboraría lo que se describió para las micrografías obtenidas con aumento a 60X. En muestras de hamburguesas, a 300 MPa, se observó mayor separación de las fibras del tejido cárnico (Figura 4.10). Otro efecto importante que se observó fue la modificación de la topografía de los haces de fibras por depósito de proteínas extraídas por acción de las sales y de la APH, luego agregadas.

En general, el nivel de presión y el tiempo de mantenimiento aplicados a la carne picada, y la posterior adición de sales, afectaron la estructura de los haces de fibras de la carne. Se observó que, a mayor nivel de presión y tiempo de mantenimiento, se produjo mayor separación de estos. Este efecto se debería al menor nivel de extracción proteica por acción de las sales debido a que el tratamiento con APH produjo agregación e insolubilización de las proteínas miofibrilares dentro de las fibras. Estos efectos se demostraron y describieron en los análisis del comportamiento térmico y del perfil electroforético de las proteínas. Mediante SDS-PAGE se observó la agregación e insolubilización de proteínas miofibrilares cuando estas se encontraron desnaturalizadas por la aplicación del tratamiento con APH a 300 MPa. Estos fenómenos de desnaturalización e insolubilización observados en las muestras tratadas a 300 MPa, en los que se favorecería la interacción proteína-proteína dentro de la fibra en lugar de la interacción proteína-agua y de la interacción proteína-proteína fuera de la fibra explicarían la mayor separación de los haces de fibra.

4.1.9 Conclusión

La aplicación de tratamientos con alta presión sobre la materia prima para la elaboración de hamburguesas presentó diversos efectos en los parámetros evaluados. El nivel de presión fue determinante ya que el tratamiento a 300 MPa tuvo efectos sobre la mayoría de los parámetros evaluados mientras que el tratamiento a 150 MPa solo tuvo efecto significativo sobre la humedad expresable. El tiempo de mantenimiento de la presión fue un factor que generó efectos significativos en la luminosidad de hamburguesas crudas, la pérdida por cocción, la humedad expresable, el grado de desnaturalización proteica (en carne picada y en hamburguesas) y en la solubilización y agregación proteica (efecto más notable en carne picada que en hamburguesas). Los parámetros cromáticos en hamburguesas crudas se vieron afectados negativamente por el tratamiento a 300 MPa, sin embargo, en las hamburguesas cocidas los efectos fueron mínimos, posiblemente no detectables por el consumidor.

Los valores de pérdida de peso por cocción más altos se observaron en las hamburguesas preparadas con carne picada tratada a 300 MPa, que fueron significativamente diferentes a las hamburguesas correspondientes al tratamiento control y a las preparadas con carne picada tratada a 150 MPa.

Las hamburguesas elaboradas con carne picada tratada a 300 MPa tuvieron menores valores de dureza, masticabilidad y esfuerzo y trabajo de corte que las hamburguesas control y las preparadas con carne picada tratada a 150 MPa. A su vez se infirió que la aplicación de APH durante la elaboración de hamburguesas tendría efecto distinto sobre la estructura del producto, cuando se trata con APH a la carne picada (materia prima) o al producto final. El análisis de la microestructura de las hamburguesas mostró mayor separación de los haces de fibras en las muestras preparadas con carne picada tratada a 300 MPa, lo que explicaría los efectos del tratamiento con APH sobre los parámetros de textura.

Con respecto al comportamiento térmico, el tratamiento a 300 MPa produjo desnaturalización parcial de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares de carne picada y de hamburguesas. Por su parte, la adición de sales produjo desestabilización térmica de actina y de la cabeza de miosina y su desnaturalización parcial. Tanto en la carne picada como en las hamburguesas el tratamiento a 300 MPa indujo la aparición de un nuevo pico con T_d cercana a 51 °C que correspondería a las proteínas solubilizadas, extraídas y probablemente asociadas por interacciones tipo puente de Hidrógeno fuera de la fibra muscular.

Los tratamientos a 300 MPa solubilizaron algunas proteínas de la carne picada a la vez que indujeron la insolubilización y agregación de otras, este efecto se detectó tanto en las proteínas sarcoplásmicas como en las miofibrilares. Estos fenómenos de desnaturalización e insolubilización observados en las muestras tratadas a 300 MPa, en los que se favorecería la interacción proteína-proteína dentro de la fibra en lugar de la interacción proteína-agua y de la interacción proteína-proteína fuera de la fibra explicarían la mayor separación de los haces de fibra. La incorporación de NaCl y TPFS revirtió parcialmente la insolubilización inducida por las APH.

Por otra parte, el tiempo de tratamiento de 1 min (comparado con el de 5 min) modificaría en menor grado algunos parámetros fisicoquímicos y tecnológicos cuando las muestras fueron sometidas a 300 MPa.

En conjunto estos resultados sugieren que el tratamiento de la carne picada con APH previo a la incorporación de aditivos no sería beneficioso ya que algunas características importantes como la textura o la pérdida por cocción fueron afectadas negativamente.

4.2. Aplicación de APH a hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales y con enzima transglutaminasa y fibra cítrica

La ingesta actual de sodio en la población a nivel mundial supera las necesidades fisiológicas y los límites recomendados por la OMS. Sin embargo, existe un interés creciente de los consumidores por alimentos con bajo contenido de sodio, como parte de una tendencia asociada al consumo de alimentos más saludables. El consumo excesivo de la sal de mesa o cloruro de sodio (NaCl) está asociado a problemas de salud, principalmente a la hipertensión arterial, relacionado a su vez con enfermedades cardiovasculares. Desde 2013 en Argentina existe una normativa cuyo objetivo es reducir el consumo de sodio en los alimentos, entre ellos los productos cárnicos. En consecuencia, las empresas procesadoras de alimentos comenzaron a implementar modificaciones para reducir el contenido de sodio en sus productos. No obstante, la reducción del uso de sales que contienen sodio implica desafíos tecnológicos importantes para la industria cárnica. Según lo indicado en el capítulo correspondiente a antecedentes, el NaCl y el TPFS intervienen en la extracción y solubilización de las proteínas miofibrilares, las cuales gelifican durante el tratamiento térmico, mejorando la capacidad de retención de agua y las propiedades sensoriales del producto. En el caso de las hamburguesas, luego de la cocción, se obtiene un producto compacto y uniforme debido a la adhesión de las de las partículas cárnicas.

La aplicación de la tecnología APH es una alternativa interesante para el desarrollo de productos preparados en base a carne bovina. Los tratamientos con APH pueden inducir efectos específicos en la textura y estructura de los alimentos, por lo tanto, su aplicación permite el desarrollo de nuevos productos y la optimización de procesos convencionales de la industria alimentaria (Hugas y col., 2002). Por lo que APH ha sido propuesta como una tecnología para la preparación de productos cárnicos reducidos en Sodio (Iwasaki y col., 2006; Sikes y col., 2009; Villamonte y col., 2013). Otra alternativa para reducir el contenido de sales en pastas y emulsiones cárnicas es la adición de la enzima transglutaminasa (TG). Esta enzima se ha utilizado en la producción de productos cárnicos reestructurados. La TG cataliza la polimerización y el entrecruzamiento de las proteínas a través de la formación de enlaces covalentes, aún a bajas temperaturas. En cuanto a la aplicación de APH sobre productos formulados con TG existen escasos antecedentes. Trespalacios y Pla (2007) informaron que la aplicación simultánea de TG y APH a 40 °C sobre un chacinado elaborado con carne de pollo y proteínas de huevo, con contenido reducido

en NaCl (1 %) y sin TPFS, produjo geles con propiedades de textura mejoradas con respecto a las muestras solo sometidas a APH o elaboradas de la manera tradicional. En relación con la incorporación de otros aditivos, las fibras alimentarias son deseables no sólo por sus propiedades con relación a la salud, sino también por sus propiedades funcionales y tecnológicas. En este caso también son escasos los estudios que analizaron la combinación del tratamiento con APH y la incorporación de fibras. Grossi y col., (2011) han informado un efecto sinérgico entre el tratamiento con APH y la incorporación de fibra alimentaria, en la mejora de la textura y los atributos sensoriales de salchichas preparadas con carne de cerdo.

El objetivo de este ensayo fue estudiar el efecto de la aplicación de tratamientos con APH sobre las propiedades tecnológicas y fisicoquímicas y la microestructura de hamburguesas elaboradas con carne bovina, formuladas con aditivos convencionales (NaCl y TPFS), con TG y con fibra cítrica. A su vez se estudió el efecto de los tratamientos sobre el comportamiento térmico y la caracterización molecular de las proteínas cárnicas correspondientes a las hamburguesas.

A continuación, se presentan los resultados de los parámetros analizados en el presente estudio.

4.2.1 pH

En la Tabla 4.9 se presentan el análisis de varianza y los coeficientes de regresión estimados para el pH de muestras de hamburguesas crudas y cocidas, obtenido por el análisis de regresión lineal múltiple.

El modelo fue significativo ($p < 0,05$) para el pH de muestras de hamburguesas crudas, explicando el 79,0 % de las respuestas observadas (Tabla 4.9). La presión incrementó significativamente el valor de dicho parámetro. El término que resultó significativo fue el lineal, con un coeficiente de regresión de 0,23 (Tabla 4.9). En el rango de presión estudiado, el incremento del pH de las hamburguesas crudas fue aproximadamente 0,45 unidades (Figura 4.11). Este efecto se atribuye al aumento de la ionización que se produce en las proteínas miofibrilares por efecto de la presión (McArdle y col., 2011) y ya fue observado y discutido en el estudio previo (ítem 4.1.1), Ferrari y col. (2012) y Szerman y col. (2011), quienes evaluaron hamburguesas de carne bovina aplicando los mismos rangos de presión y tiempo de mantenimiento, encontraron efectos similares. Las concentraciones de los aditivos (NaCl, TG, fibra)

considerados en este estudio no tuvieron efectos significativos sobre el pH de las hamburguesas crudas; el efecto de la presión sobre el pH fue predominante.

Con relación al pH de las hamburguesas cocidas, los valores fueron más elevados en comparación con las hamburguesas crudas, pero ese parámetro no fue afectado por los factores estudiados (Tabla 4.9). Las proteínas de la carne se desnaturalizan por el tratamiento térmico y como consecuencia los valores de pH aumentan (Ledward, 1979).

Tabla 4.9 Coeficientes de regresión y análisis de varianza para los modelos de regresión correspondientes al pH de hamburguesas crudas y cocidas

Términos	Hamburguesas crudas	Hamburguesas cocidas
Constante	6,05	6,30
Lineales		
NaCl	0,14	-0,03
TG	0,01	0,01
Fibra	0,02	0,01
Presión	0,23*	0,01
Cuadráticos		
NaCl ²	0,02	0,02
TG ²	0,01	0,01
Fibra ²	-0,01	0,01
Presión ²	0,03	0,01
Interacciones		
NaCl x TG	0,05	0,01
NaCl x Fibra	-0,02	-0,02
NaCl x Presión	-0,11	-0,01
TG x Fibra	-0,01	-0,01
TG x Presión	-0,01	0,01
Fibra x Presión	-0,02	-0,02
Falta de ajuste	0,400	0,619
R ²	0,790	0,690
p	<0,05	>0,05
Ecuación reducida correspondiente al pH de hamburguesas crudas: $pH = 6,07 + 0,23 \text{ Presión}$		
(*) Nivel de significancia menor al 5 % (p<0,05)		
NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio		
TG: Concentración de transglutaminasa		
Fibra: Concentración de fibra cítrica		
Presión: Nivel de presión		

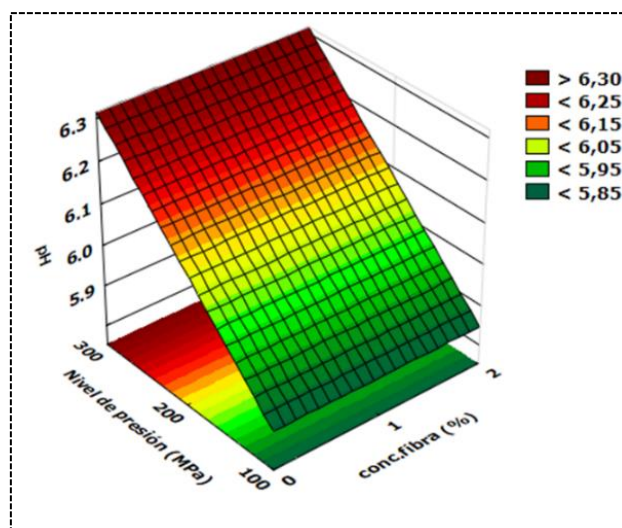


Figura 4.11. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de fibra sobre el pH de hamburguesas crudas.

4.2.2 Parámetros cromáticos

La Tabla 4.10 muestra el análisis de varianza y los coeficientes de regresión estimados correspondientes a los parámetros cromáticos L^* , a^* y b^* de hamburguesas crudas y cocidas, obtenidos por el análisis de regresión múltiple. En hamburguesas crudas, el modelo resultó significativo ($p < 0,05$) para el parámetro L^* , el cual describió el 93,0 % de las respuestas observadas. La concentración de NaCl y el nivel de presión afectaron significativamente ($p < 0,05$) la luminosidad de las hamburguesas. La concentración de NaCl disminuyó (coeficiente -2,54), mientras que el nivel de presión incrementó (coeficiente 3,38) los valores de L^* , ambos en forma lineal. Los valores de los coeficientes indican que el efecto más importante fue de la presión ya que ese término presenta el coeficiente de mayor valor. Resultados similares fueron informados por Ferrari y col. (2012) y Szman y col. (2011), quienes también realizaron estudios en hamburguesas tratadas con APH. Estos autores indicaron que al mayor nivel de presión que evaluaron (300 MPa) obtuvieron los valores más elevados de L^* de las hamburguesas. Además, observaron disminución de L^* por efecto del NaCl. Ferrari y col. (2012) indicaron que el efecto más importante sobre L^* fue la aplicación del tratamiento con APH, este resultado fue similar a lo observado en el presente trabajo.

En relación con el parámetro a^* de hamburguesas crudas, el modelo de regresión resultó significativo ($p < 0,05$) y explicó el 70,0 % de las respuestas observadas. Este parámetro disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con el incremento de la concentración de NaCl y del nivel de presión; para ambos factores los términos fueron lineales. La concentración de NaCl presentó un coeficiente de regresión con

mayor valor absoluto (-2,35) que el nivel de presión (-1,39), siendo en consecuencia el efecto más importante.

Con respecto al valor del parámetro b^* de las hamburguesas crudas, el modelo fue significativo ($p < 0,05$) y explicó el 77,8 % de las respuestas observadas. El nivel presión y las concentraciones de NaCl y fibra afectaron significativamente ($p < 0,05$) este parámetro. Para los tres factores, los términos que resultaron significativos fueron los lineales. La concentración de fibra incrementó (coeficiente 0,9) mientras que la concentración de NaCl (coeficiente -1,5) y el nivel de presión (coeficiente -0,84) disminuyeron el valor de b^* .

En las Figuras 4.12, 4.13 y 4.14 se presentan las superficies de respuesta correspondientes a los efectos del nivel de presión y las concentraciones de NaCl y fibra sobre los parámetros cromáticos L^* , a^* y b^* de hamburguesas crudas.

La disminución de los valores L^* con la concentración creciente de NaCl puede ser una consecuencia del aumento de la fuerza iónica que produce una mayor retención de agua en el tejido cárnico. Este aumento de la retención de agua determinaría una menor cantidad de agua libre a nivel superficial, disminuyendo la reflexión de luz en la superficie de las piezas. Esa menor reflexión determinaría una disminución de la luminosidad de las muestras (Faustman y Cassens, 1990; Baublits y col., 2006).

El cambio en el color por efecto del tratamiento con APH se asoció a la alteración de la mioglobina causada por el desplazamiento de su grupo hemo, separación de hierro del anillo porfirínico y oxidación de oximioglobina (conversión en metamioglobina) (Carlez y col., 1995; Fuentes y col., 2010). El aumento de L^* se vinculó a la desnaturalización de la mioglobina y a la separación del hierro del anillo porfirínico (Carlez y col., 1995). A su vez, la reducción de a^* se asoció a un incremento en la oxidación de la oximioglobina (Jung y col., 2003). Además, la reducción de a^* por el incremento de la concentración de NaCl también se debería a un incremento de la oxidación de la oximioglobina inducida por esa sal.

En cuanto a la disminución de los valores de b^* por efecto de la adición de NaCl, al igual que en el caso del parámetro L^* , se debería al efecto de la retención de agua por las proteínas miofibrilares (Faustman y Cassens, 1990; Baublits y col., 2006). El efecto del procesamiento con APH sobre el parámetro b^* , al igual que el parámetro a^* estaría relacionado a la oxidación de la oximioglobina (Carlez y col., 1995). El aumento de los valores de b^* por el efecto de la incorporación de fibra estuvo

relacionado con los compuestos presentes en este aditivo, que le aportarían una coloración amarilla.

Tabla 4.10. Coeficientes de regresión y análisis de varianza para los modelos de regresión correspondientes a los parámetros cromáticos de hamburguesas crudas y cocidas

Términos	Hamburguesas crudas			Hamburguesas cocidas		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Constante	43,69	21,33	11,86	53,23	9,65	11,72
Lineales						
NaCl	-2,54*	-2,35*	-1,50*	-1,89*	0,00	-1,94*
TG	-0,65	-0,61	-0,25	-0,88	-0,27	-0,18
Fibra	0,47	-0,23	0,90*	0,32	-0,26	0,24
Presión	3,38*	-1,39*	-0,84*	1,13	-0,18	-0,36
Cuadráticos						
NaCl ²	-0,93	0,21	-0,26	-1,40	0,29	-0,69
TG ²	-0,11	-0,41	-0,10	-0,14	-0,23	-0,22
Fibra ²	-0,07	0,08	-0,04	-0,23	-0,43	-0,04
Presión ²	-1,69	-0,09	-0,13	-0,98	0,27	-0,15
Interacciones						
NaCl x TG	-0,13	-0,34	-0,23	0,04	0,01	0,21
NaCl x Fibra	0,16	0,19	0,19	-0,25	0,10	0,13
NaCl x presión	-0,95	-1,58	-0,75	-0,11	0,04	-0,02
TG x Fibra	-0,12	-0,55	0,08	1,00	-0,30	0,08
TG x Presión	0,20	0,02	-0,28	-0,21	0,21	-0,20
Fibra x Presión	-1,19	-0,77	-1,03	-0,67	-0,30	0,34
Falta de ajuste	0,872	0,119	0,148	0,367	0,351	0,526
R ²	0,930	0,700	0,778	0,735	0,590	0,872
p	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05
Ecuaciones reducidas correspondientes a los parámetros cromáticos de hamburguesas crudas:						
$L^* = 42,45 - 2,54 NaCl + 3,38 Presión$						
$a^* = 21,23 - 2,35 NaCl - 1,39 Presión$						
$b^* = 11,63 - 1,50 NaCl + 0,91 Fibra - 0,84 Presión$						
Ecuaciones reducidas correspondientes a los parámetros cromáticos de hamburguesas cocidas:						
$L^* = 52,51 - 1,90 NaCl$						
$b^* = 11,23 - 1,94 NaCl$						
(*) Nivel de significancia menor al 5 % (p<0,05)						
NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio						
TG: Concentración de transglutaminasa						
Fibra: Concentración de fibra cítrica						
Presión: Nivel de presión						

En relación con los parámetros cromáticos de hamburguesas cocidas, el modelo fue significativo para los parámetros L* y b*, logrando explicar el 73,5 y 87,2 % de las respuestas observadas, respectivamente. Los valores de dichos parámetros disminuyeron significativamente (p<0,05), con el incremento de la concentración de NaCl. Para ambos parámetros, los términos que resultaron significativos fueron los lineales, presentando coeficientes de correlación de -1,89 y -1,94, para L* y b*, respectivamente.

Luego del tratamiento térmico de las hamburguesas no se observó efecto del nivel de presión en los parámetros cromáticos. El efecto predominante sobre L^* y b^* fue la concentración de NaCl. Si se compara con los resultados de los parámetros cromáticos de las hamburguesas preparadas con carne picada tratada con APH (ensayo previo, ítem 4.1.2), en ese estudio se observó un efecto significativo del nivel de presión sobre los parámetros cromáticos de las muestras cocidas. Este comportamiento indica que la presurización sobre la materia prima tuvo un efecto más importante sobre el color que la presurización sobre la hamburguesa.

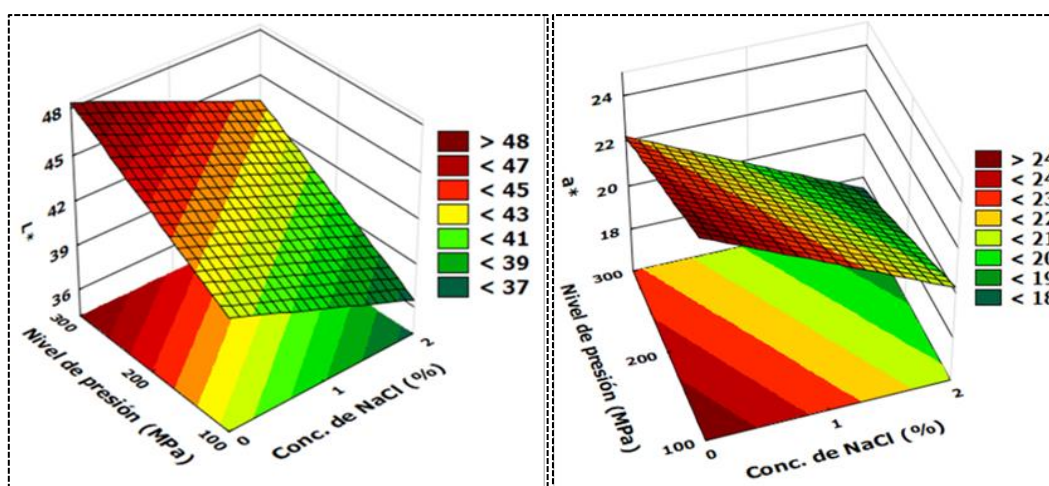


Figura 4.12. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre la luminosidad de hamburguesas crudas.

Figura 4.13. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre el parámetro a^* de hamburguesas crudas.

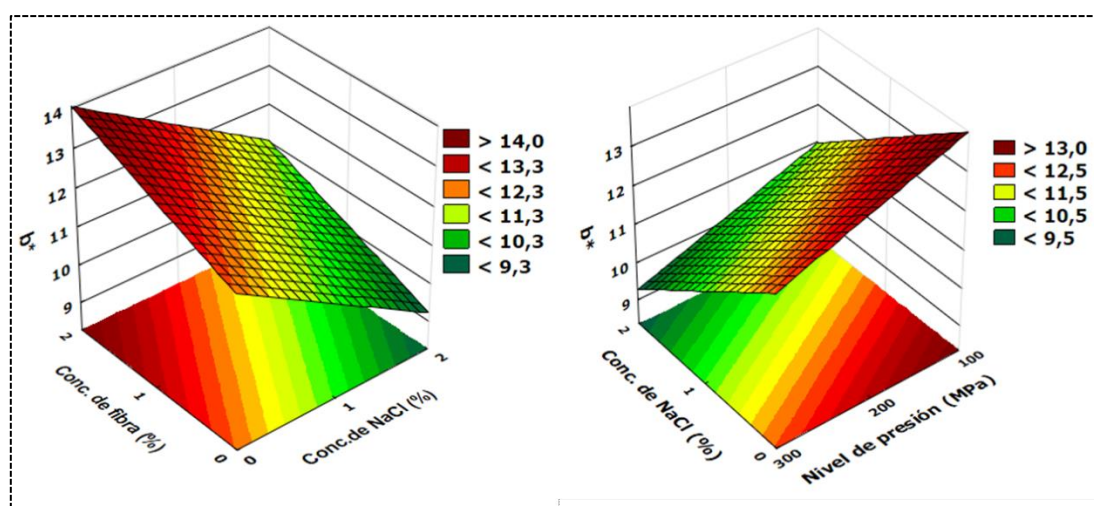


Figura 4.14. Superficie de respuesta del efecto de la concentración de fibra, NaCl y del nivel de presión sobre el parámetro b^* de hamburguesas crudas (para los niveles medios de Presión y Fibra).

4.2.3 Parámetros de textura (Análisis del Perfil de Textura, TPA)

Con respecto a los parámetros de textura determinados mediante TPA, la Tabla 4.11 muestra el análisis de varianza y los coeficientes de regresión obtenidos por análisis de regresión lineal múltiple, para los parámetros dureza, elasticidad, cohesividad y masticabilidad de las hamburguesas cocidas.

Tabla 4.11. Coeficientes de regresión y análisis de varianza para los modelos de regresión correspondientes a los parámetros de textura de hamburguesas cocidas

Términos	Dureza (N)	Elasticidad	Cohesividad	Masticabilidad (N)
Constante	30,18	0,78	0,60	13,22
Lineales				
NaCl	-3,57*	0,00	0,03	-1,70*
TG	1,34	0,00	0,01	0,44
Fibra	1,58*	0,00	-0,01	0,77*
Presión	0,08	0,00	0,00	-0,02
Cuadráticos				
NaCl ²	-0,36	0,00	0,02	-0,28
TG ²	0,96	0,01	0,00	0,41
Fibra ²	0,57	0,00	0,01	0,19
Presión ²	-0,56	0,00	0,00	-0,34
Interacciones				
NaCl x TG	1,46	0,00	0,01	0,89
NaCl x Fibra	-0,89	0,00	-0,02	-0,46
NaCl x presión	-1,68	0,00	-0,01	-0,65
TG x Fibra	-1,67	-0,01	0,00	-0,58
TG x Presión	-1,03	0,01	0,02	-0,45
Fibra x Presión	0,86	-0,01	-0,01	0,29
Falta de ajuste	0,087	0,778	0,758	0,092
R ²	0,680	0,624	0,794	0,659
p	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05
Ecuaciones reducidas correspondientes a los parámetros de textura:				
<i>Dureza = 30,45 – 3,60 NaCl + 1,60 Fibra</i>				
<i>Masticabilidad = 13,21 – 1,71 NaCl + 0,77 Fibra</i>				
(*) Nivel de significancia menor al 5 % (p<0,05)				
NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio				
TG: Concentración de transglutaminasa				
Fibra: Concentración de fibra cítrica				
Presión: Nivel de presión				

Con respecto al parámetro dureza de las hamburguesas, el modelo resultó significativo (p<0,05), logrando describir el 68,0 % de las respuestas observadas. Las concentraciones de NaCl y de fibra afectaron significativamente (p<0,05) este parámetro. Para ambos factores, el término significativo fue el lineal. La dureza disminuyó con el incremento de la concentración de NaCl (coeficiente -3,57), mientras que aumentó con el incremento de la concentración de fibra (coeficiente 1,58). Este efecto de la fibra es destacable dado que no se esperaba influencia de ese aditivo - según lo informaron Selani y col. (2016) y Carvalho y col. (2017) o que disminuyera la

dureza de las hamburguesas por un aumento en la retención de agua. Una posible explicación del aumento de la dureza podría basarse en la gelificación de la fibra cítrica durante la cocción de las hamburguesas (Lundberg y col., 2014).

El modelo de regresión correspondiente al parámetro masticabilidad fue significativo ($p < 0,05$) y logró explicar el 65,9 % de las respuestas observadas. Al igual que el parámetro de dureza, las concentraciones de NaCl y de fibra afectaron significativamente ($p < 0,05$) la masticabilidad. Para ambos factores, el término significativo fue el lineal. La masticabilidad disminuyó con el incremento de la concentración de NaCl (coeficiente -1,70) y aumentó con el incremento de la concentración de fibra (coeficiente 0,77). En las Figuras 4.15 y 4.16 se presentan las superficies de respuesta del efecto de las concentraciones de NaCl y de fibra sobre la dureza y masticabilidad de hamburguesas cocidas.

Con relación a los parámetros cohesividad y elasticidad, el modelo de regresión no fue significativo ($p > 0,05$) para ninguno de ellos, por lo que no fue posible determinar el efecto de los factores sobre esos parámetros.

Szerman y col. (2011) y Ferrari y col. (2012) trataron hamburguesas de carne bovina a 100 o 300 MPa durante 5 min y concluyeron que los valores de los parámetros dureza y masticabilidad aumentaron con el incremento del nivel de presión. En este trabajo de Tesis Doctoral, se observó una tendencia al aumento de los valores de dureza y masticabilidad por efecto del aumento de la presión y de la concentración de TG, aunque los efectos no fueron significativos ($p > 0,05$). Szerman y col. (2011) indicaron que la aplicación de tratamientos con alta presión modificaría la unión entre las piezas de carne, generando una estructura más compacta.

Fernández Martín y col. (2002) evaluaron parámetros de textura de salchichas e informaron que la adición de NaCl y la aplicación de APH, produjeron menores valores de dureza y masticabilidad. A su vez observaron que el uso de NaCl y TPFS en combinación con la presión, incrementaron los valores de los parámetros mencionados. Por otra parte, Szerman y col. (2011) mencionaron que el incremento de la concentración de NaCl en hamburguesas disminuyó los parámetros vinculados a la textura, lo cual podría asociarse a una mayor retención de agua, lo que determinaría una estructura menos firme.

La incorporación de NaCl y TPFS incrementan la fuerza iónica y, en el caso del TPFS, también el pH del tejido cárnico. Ambos efectos favorecen el incremento de la retención de agua. A su vez, se produce un aumento de la extracción de las proteínas miofibrilares, las cuales gelifican durante la cocción de las piezas, permitiendo la retención de agua. La mayor retención de agua afecta la textura, reduciendo los valores de dureza y masticabilidad.

Resulta importante mencionar que además de los aditivos indicados en el diseño experimental, las hamburguesas fueron formuladas con una concentración elevada de TPFS (0,5 %, máxima permitida por la normativa). Por lo que probablemente el uso de este aditivo en el presente estudio también contribuyó a la modificación de la textura de las hamburguesas.

A diferencia de lo observado en el estudio previo (ítem 4.1.3), el tratamiento con APH no afectó los parámetros de textura. Probablemente este comportamiento se debió a que la presión fue aplicada sobre las hamburguesas ya formuladas con los aditivos y las proteínas ya se encontraban extraídas fuera de las fibras musculares

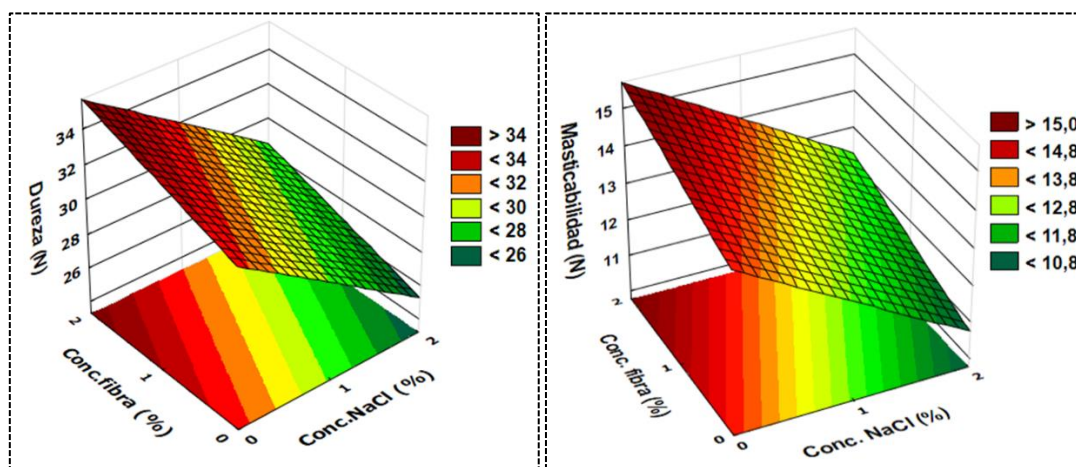


Figura 4.15. Superficie de respuesta del efecto de las concentraciones de fibra y NaCl sobre la dureza de hamburguesas.

Figura 4.16. Superficie de respuesta del efecto de las concentraciones de fibra y NaCl sobre la masticabilidad de hamburguesas.

4.2.4 Esfuerzo y trabajo de corte

La Tabla 4.12 presenta el análisis de varianza y los coeficientes de regresión estimados para los parámetros de esfuerzo de corte (N/g) y trabajo de corte (mJ/g) de hamburguesas cocidas, correspondientes a los distintos tratamientos evaluados.

Para los parámetros esfuerzo y trabajo de corte, el modelo fue significativo ($p < 0,05$), logrando describir el 74,4 y el 77,3 % de las respuestas observadas respectivamente. El nivel de presión y las concentraciones de NaCl, TG y fibra afectaron de manera significativa ($p < 0,05$) y lineal los valores de estos parámetros. El incremento de las concentraciones de NaCl y fibra disminuyó significativamente ($p < 0,05$) los valores de esfuerzo y trabajo de corte, mientras que el aumento de la concentración de TG y del nivel de presión, tuvieron un efecto lineal positivo, incrementando los valores de los parámetros mencionados.

En las Figuras 4.17, 4.18, 4.19 y 4.20 se presentan las superficies de respuesta correspondientes a los efectos de los factores del diseño sobre el esfuerzo y el trabajo de corte.

Las proteínas miofibrilares son responsables principales de las propiedades texturales de los productos cárnicos procesados (Yasui y col., 1980; Asghar y col., 1985). Debido a ello, una modificación en las propiedades funcionales de las proteínas produce modificaciones en las propiedades de textura. La TG se utiliza en la industria cárnica para la preparación de productos cárnicos reestructurados ya que esta enzima favorece la cohesión de las partículas cárnicas, debido a que cataliza la polimerización y el entrecruzamiento de las proteínas a través de la formación de enlaces covalentes entre los restos de lisina y glutamina. A su vez, las fibras alimentarias son utilizadas para incrementar la capacidad de retención de agua y mejorar la textura de los productos cárnicos. En el presente trabajo, los efectos descritos de estos aditivos fueron observados, generando propiedades de textura deseables en las hamburguesas.

Tabla 4.12. Coeficientes de regresión y análisis de varianza para los modelos de regresión correspondientes a los parámetros de esfuerzo de corte y trabajo de corte

Términos	Esfuerzo de corte (N/g)	Trabajo de corte (mJ/g)
Constante	36,90	0,115
Lineales		
NaCl	-2,85*	-0,011*
TG	2,70*	0,014*
Fibra	-3,66*	-0,013*
Presión	2,28*	0,009*
Cuadráticos		
NaCl ²	1,43	0,006
TG ²	0,46	0,002
Fibra ²	-1,18	0,005
Presión ²	-0,67	0,002
Interacciones		
NaCl x TG	-1,47	-0,006
NaCl x Fibra	0,58	0,005
NaCl x presión	0,30	0,003
TG x Fibra	-1,09	-0,006
TG x Presión	-0,19	0,001
Fibra x Presión	1,62	0,011
Falta de ajuste	0,138	0,165
R ²	0,744	0,773
p	<0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondientes a los parámetros de esfuerzo y trabajo de corte:

$$Esfuerzo\ de\ corte = 36,92 - 2,85NaCl + 2,70\ TG - 3,66\ Fibra + 2,28\ Presión$$

$$Trabajo\ de\ corte = 0,12 - 0,01NaCl + 0,01\ TG - 0,01\ Fibra + 0,01\ Presión$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % (p<0,05)

NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio

TG: Concentración de transglutaminasa

Fibra: Concentración de fibra cítrica

Presión: Nivel de presión

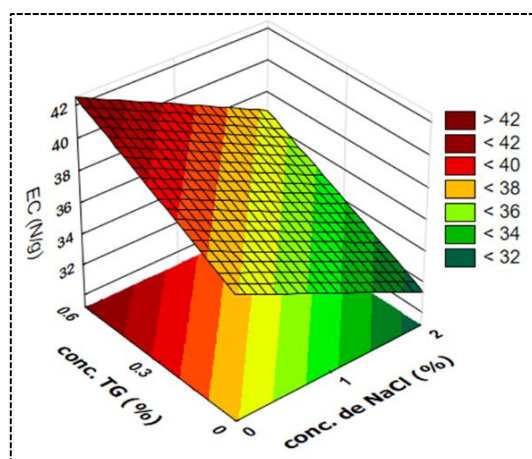


Figura 4.17. Superficie de respuesta del efecto de las concentraciones de TG y NaCl sobre el esfuerzo de corte de hamburguesas (para una concentración de 1 % fibra y 200 MPa).

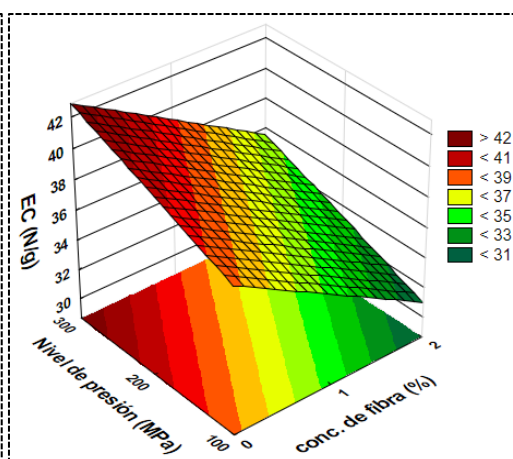


Figura 4.18. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y la concentración de fibra sobre el esfuerzo de corte de hamburguesas (para concentraciones de 1 y 0,3 % NaCl y TG respectivamente).

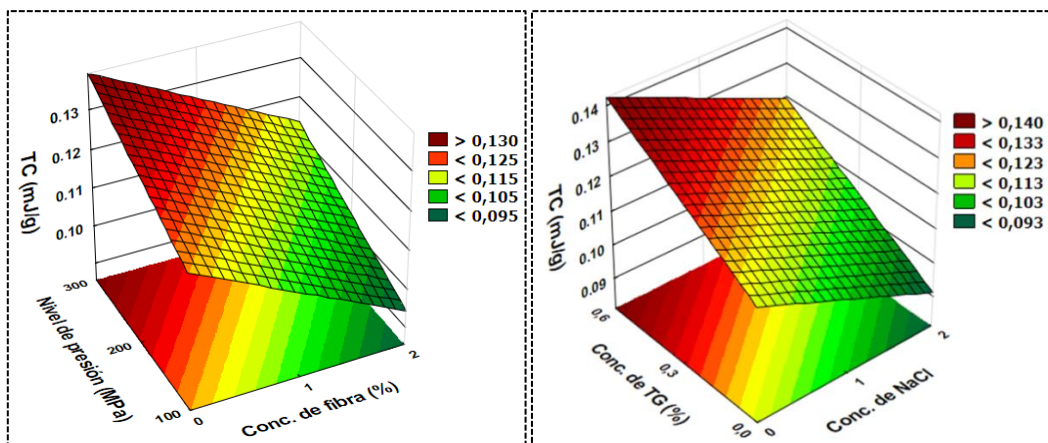


Figura 4.19. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y la concentración de fibra sobre el trabajo de corte de hamburguesas (para concentraciones de 1 y 0,3 % NaCl y TG respectivamente).

Figura 4.20. Superficie de respuesta del efecto de las concentraciones de TG y NaCl sobre el trabajo de corte de hamburguesas (para una concentración de 1 % fibra y 200 MPa).

Trespalacios y Pla (2007) informaron que la adición de 0,3 % de TG en muestras de carne de pollo, posteriormente tratadas a 500 MPa y 40 °C durante 30 min, y luego calentadas a 75 °C, aumentó los valores de la dureza y de la masticabilidad en comparación con las muestras sin TG y con las muestras adicionadas con TG, pero sin tratar con APH. Los autores indicaron que al nivel de presión aplicado (500 MPa), las proteínas de carne en presencia de TG presentaron un mayor número de enlaces ϵ -(γ -glutamil) lisina intra e intermoleculares.

Con respecto al uso de la fibra alimentaria, estudios previos sin tratamiento con APH (0,1 MPa), informaron que su incorporación redujo el esfuerzo de corte de hamburguesas de carne de bovina (Troutt y col., 1992; Aleson-Carbonell y col., 2005; López-López y col., 2010). Según López-López y col. (2010), la reducción del esfuerzo de corte podría estar asociada con la mejora de la capacidad de retención de agua por la adición de fibra alimentaria. Esos efectos fueron similares a los observados en el presente estudio.

Grossi y col. (2011) demostraron que la aplicación de APH (600 MPa) y la temperatura de procesamiento, así como la incorporación de 2 % de fibra de zanahoria en salchichas, indujo un mayor orden de la red de proteínas, lo que condujo a un mayor módulo de Young (resistencia a la compresión).

En el presente estudio, el incremento del nivel de presión aumentó el esfuerzo de corte y el trabajo de corte de las hamburguesas, probablemente por reforzar el gel de proteínas extraídas por las sales y polimerizadas por la TG. Este comportamiento

fue opuesto al observado en el ítem 4.1.4 y sugiere que la extracción proteica previa al tratamiento con APH juega un rol muy importante en los efectos de la presurización.

4.2.5 Pérdida de peso por cocción y humedad expresable

La Tabla 4.13 se presentan el análisis de varianza y los coeficientes de regresión estimados para los parámetros pérdida de peso por cocción (PPC %) y humedad expresable (HE %) de hamburguesas correspondientes a los distintos tratamientos evaluados.

Tabla 4.13. Coeficientes de regresión y análisis de varianza para los modelos de regresión correspondientes a los parámetros de pérdida de peso por cocción (PPC) y humedad expresable (HE) de hamburguesas después de la cocción

Términos	PPC (%)	HE (%)
Constante	29,34	17,20
Lineales		
NaCl	-6,45*	3,77*
TG	-1,00	0,40
Fibra	-3,46*	1,64*
Presión	3,06*	-1,76*
Cuadráticos		
NaCl ²	0,75	-0,61
TG ²	-0,26	-0,10
Fibra ²	-0,50	0,32
Presión ²	0,44	-0,11
Interacciones		
NaCl x TG	-0,44	0,89
NaCl x Fibra	0,42	0,01
NaCl x Presión	-2,18	2,12
TG x Fibra	-1,51	0,55
TG x Presión	1,12	-0,14
Fibra x Presión	0,64	-0,21
Falta de ajuste	0,220	0,696
R ²	0,948	0,950
p	<0,05	<0,05
Ecuaciones reducidas correspondientes a los parámetros de PPC y HE: $PPC = 29,52 - 6,45NaCl - 3,46Fibra + 3,06Presión$ $HE = 16,99 + 3,77NaCl + 1,64Fibra - 1,76Presión$		
(*) Nivel de significancia menor al 5 % (p<0,05) NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio TG: Concentración de transglutaminasa Fibra: Concentración de fibra cítrica Presión: Nivel de presión		

El modelo resultó significativo (p<0,05) para los parámetros PPC y HE, logrando describir el 94,8 y 95,0 % de las respuestas observadas respectivamente. Las concentraciones de NaCl y fibra y el nivel de presión afectaron de manera significativa (p<0,05) y lineal los valores de PPC y HE. El incremento de las

concentraciones de NaCl y fibra disminuyó significativamente la PPC, mientras que el aumento del nivel de presión incrementó significativamente este parámetro. A su vez, el incremento de las concentraciones de NaCl y fibra aumentó significativamente la HE mientras que el aumento del nivel de presión tuvo un efecto negativo. Tanto para PPC como HE, el coeficiente más importante fue el correspondiente a la concentración de NaCl: -6,45 para PPC y 3,77 para HE.

En las Figuras 4.21, 4.22, 4.23 y 4.24 se presentan las superficies de respuestas correspondientes a los efectos de los factores del diseño sobre la PPC y la HE.

Es importante señalar que el origen estructural de la retención de agua en la carne entera y de los productos preparados con carne picada/triturada es diferente. En las piezas o músculos de carne, el encogimiento y el hinchamiento de las miofibrillas es el factor principal (Offer y Knight, 1988), mientras que la capacidad de las proteínas de la carne de formar diferentes tipos de gel es más importante en los productos cárnicos preparados con carne picada/triturada (Hermansson, 1986). Un gel se establece por asociación entre las proteínas y el agua de tal manera que las fuerzas atractivas y repulsivas están tan bien equilibradas formando una red tridimensional de proteínas. Labuza y Busk (1979) indicaron que el agua está asociada de varias formas, entre ellas: agua unida a sitios hidrofílicos por puentes de hidrógeno, agua retenida por fuerzas capilares entre las superficies de una red insoluble, agua atraída a sitios iónicos por el dipolo molecular del agua.

La carne picada/triturada es una matriz compleja constituida por proteínas solubles y componentes insolubles como fibras de carne, tejido conectivo y grasa. La cantidad y el estado de estos componentes tienen un gran impacto sobre las propiedades del gel, las cuales son afectadas por factores como el tratamiento térmico, el pH o la fuerza iónica (Tornberg, 2005).

Una hamburguesa está compuesta de haces de fibras cárnicas más o menos intactos y en menor proporción de fibras aisladas, estos componentes representan entre un 50 y un 70 % del producto y están distribuidos al azar en comparación con la estructura anisotrópica bien definida del músculo completo (Andersson y col., 2000). Las propiedades de las hamburguesas dependen no solo de la materia prima sino también del proceso y de los aditivos utilizados para su elaboración.

Jiménez-Colmenero y col. (1998^a) y Fernández-Martín y col. (1997) informaron que la presurización (200 y 400 MPa) en combinación con un tratamiento

térmico (60, 70 y 80 °C) provocó una reducción significativa de la PPC, en carne picada de cerdo y de ave. Estos autores sugirieron que la combinación de presión y temperatura tuvo un efecto de preservación respecto a la desnaturalización térmica de las proteínas, lo cual reduciría la PPC. Szerman y col. (2011) y Ferrari y col. (2012), informaron que el aumento de la presión incrementó significativamente la PPC, similar al efecto observado en el presente trabajo. Este efecto podría interpretarse en términos de un incremento de la disociación del agua como consecuencia del aumento de la fuerza iónica que produciría la alta presión, según fue informado por Tintchev y col. (2013). A su vez, se debe considerar que el tratamiento con APH induce la desnaturalización de las proteínas miofibrilares, las cuales estabilizan el agua en el interior de las miofibrillas y de las fibras del tejido cárnico.

En relación con la concentración de NaCl, Szerman y col. (2011) y Ferrari y col., (2012) informaron un efecto similar sobre la PPC de hamburguesas de carne bovina que el observado en el presente trabajo. El NaCl se utiliza en la elaboración de productos preparados con carne picada/triturada para incrementar la fuerza iónica, mejorando la extracción y la solubilización de proteínas. Esto favorece la formación de una matriz homogénea y compacta, logrando una mayor retención de agua en las hamburguesas. Además, la incorporación de NaCl permite incrementar la viscosidad de las pastas de carne, facilitando la incorporación de grasa para formar emulsiones estables.

Con respecto al efecto de la incorporación de fibra dietética, un estudio en hamburguesas de carne bovina (sin tratamiento con APH) formuladas con ese aditivo, informó una mejora significativa en la capacidad de retención de agua del producto (López-López y col., 2010). En otro estudio realizado en salchichas formuladas con fibra de zanahoria y tratadas con APH, se informó que las salchichas adicionadas con fibra tuvieron una capacidad de retención de agua significativamente mayor que las salchichas sin fibra, con independencia del tratamiento con APH (Møller y col., 2011). La adición de fibra afecta positivamente el rendimiento (al favorecer la unión con el agua), la unión de los lípidos y la dureza, posiblemente debido a una estabilización de la red de proteínas en el gel (Cofrades y col., 2000; Eim y col., 2008; Møller y col., 2011).

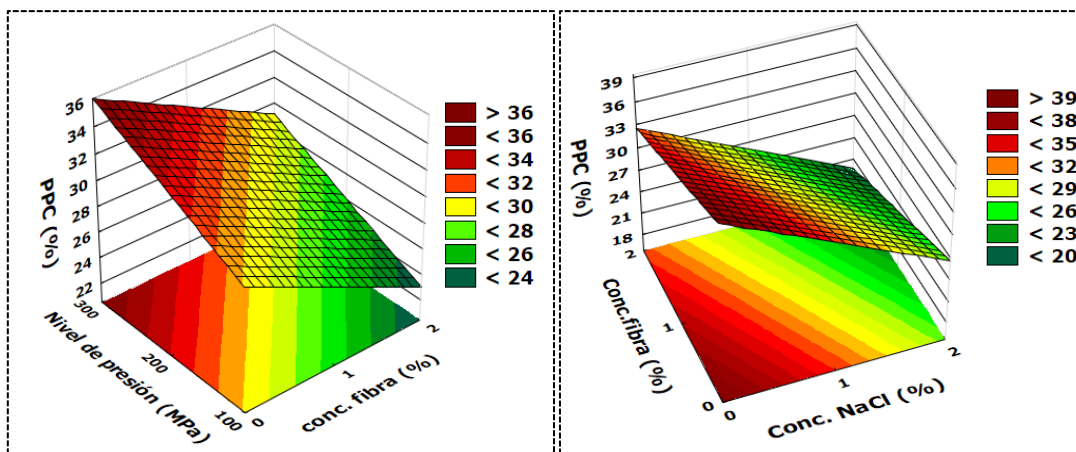


Figura 4.21. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de fibra sobre la PPC de hamburguesas (para una concentración de 1 % NaCl).

Figura 4.22. Superficie de respuesta del efecto de las concentraciones de fibra y de NaCl sobre la PPC de hamburguesas (para 200 MPa).

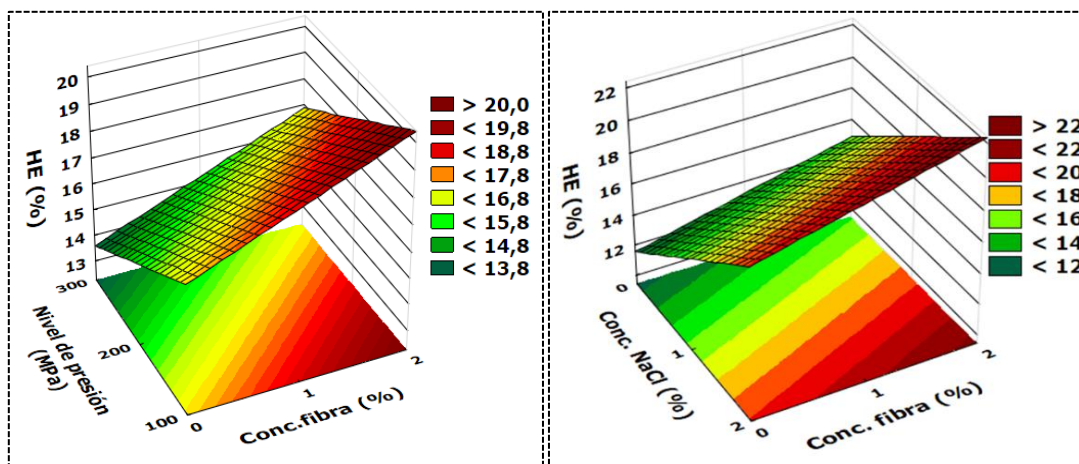


Figura 4.23. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y la concentración de fibra sobre la HE de hamburguesas (para una concentración de 1 % NaCl).

Figura 4.24. Superficie de respuesta del efecto de las concentraciones de fibra y de NaCl sobre la HE de hamburguesas (para 200 MPa).

4.2.6 Análisis del comportamiento térmico de las proteínas cárnicas de hamburguesas elaboradas con distintas concentraciones de aditivos y tratadas con APH

En la Figura 4.25 se presentan termogramas de muestras sometidas a los distintos tratamientos correspondientes al diseño cuyos factores fueron las concentraciones de NaCl, TG y fibra y el nivel de presión.

Los termogramas presentaron varias transiciones solapadas cuyas temperaturas de máxima deflexión (T_d) dependieron de la composición y se encontraron entre 51 y 80 °C. Las diferencias con los termogramas de carne picada para la elaboración de hamburguesas (Figura 4.1, ítem 4.1.6) se debieron a la presencia de TPFS en mayor concentración (0,5 %) y a la aplicación con APH directamente sobre las hamburguesas. Fue observado en trabajos previos del grupo de trabajo que el TPFS modificó algunas T_d y en ausencia de NaCl protegió a las proteínas cárnicas de la desnaturalización inducida por APH, cuando ésta se aplicó hasta 200 MPa (Speroni y col., 2014).

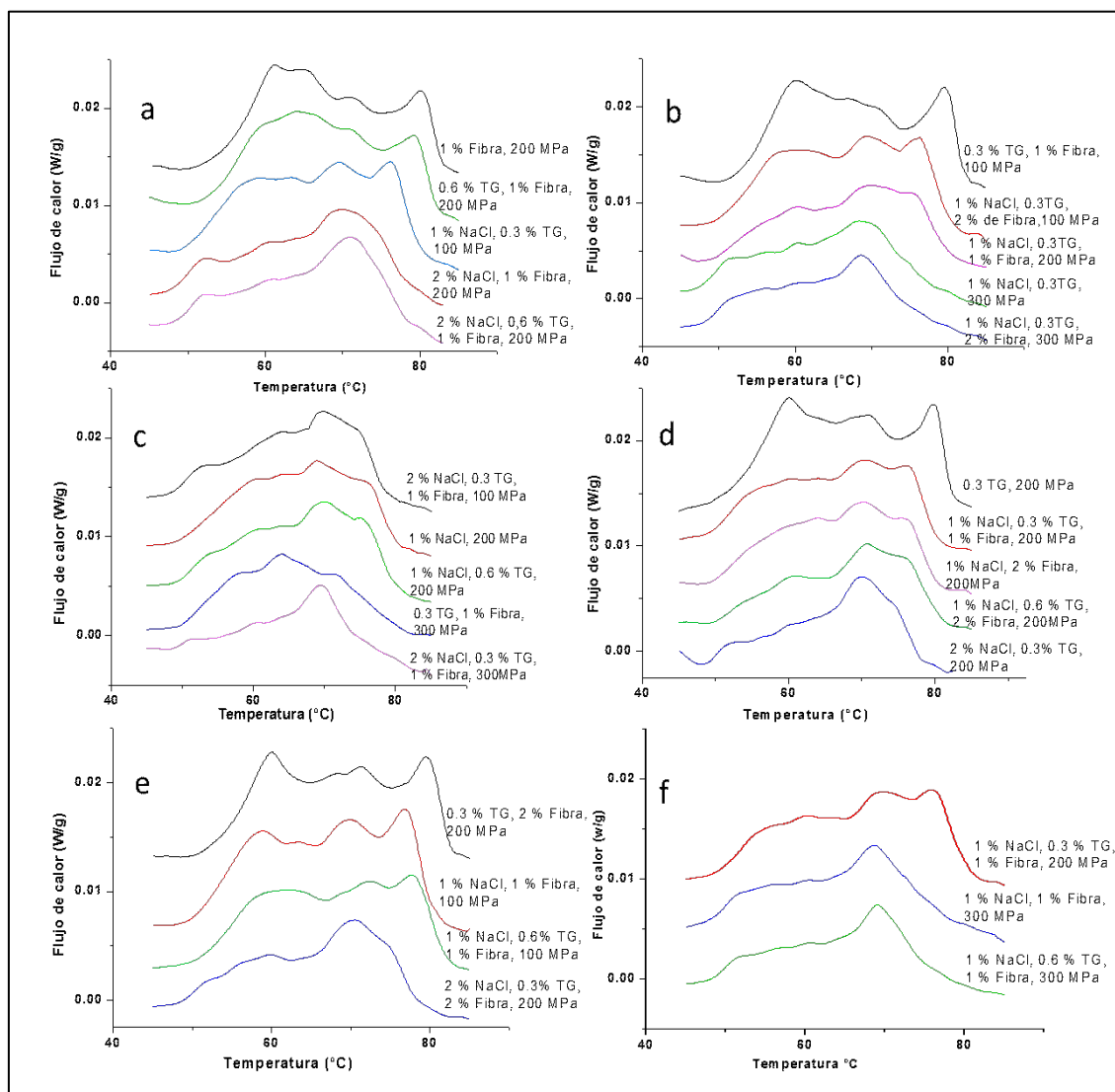


Figura 4.25. Termogramas de muestras de hamburguesas elaboradas con distintas concentraciones de NaCl, TG y fibra cítrica, y tratadas con diferentes niveles de presión.

Tabla 4.14. Coeficientes de regresión y análisis de varianza para los modelos de regresión del cambio de entalpía de desnaturalización (ΔH_d , J/g de proteína) del total de proteína de muestras de hamburguesas

Términos	ΔH_d (J/g de proteína)
Constante	10,26
Lineales	
NaCl	-1,66*
TG	-0,50*
Fibra	-0,32
Presión	-2,56*
Cuadráticos	
NaCl ²	0,04
TG ²	0,12
Fibra ²	0,02
Presión ²	0,72*
Interacciones	
NaCl x TG	-0,49
NaCl x Fibra	-0,31
NaCl x presión	-0,07
TG x Fibra	-0,70
TG x Presión	0,25
Fibra x Presión	0,35
Falta de ajuste	0,103
R ²	0,928
p	<0,05
Ecuación reducida del cambio de entalpía de desnaturalización del total de proteínas: ΔH_d (J/g de proteína) = 10,36 – 1,66 NaCl – 0,50 TG – 2,56 Presión + 0,68 Presión ²	
(*) Nivel de significancia menor al 5 % (p<0,05) NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio TG: Concentración de transglutaminasa Fibra: Concentración de fibra cítrica Presión: Nivel de presión	

El análisis de varianza y los coeficientes de regresión para el cambio de entalpía de desnaturalización (ΔH_d) del total de las proteínas, obtenidos por análisis de regresión lineal múltiple se presentan en la Tabla 4.14. El modelo obtenido fue significativo y logró explicar el 92,8 % de las respuestas observadas. El ΔH_d del total de proteínas fue afectado significativamente (p<0,05) por las concentraciones de NaCl y TG (términos lineales) y por el nivel de presión con un efecto lineal y cuadrático. El incremento de las concentraciones de NaCl y de TG disminuyeron significativamente (p<0,05) el valor del ΔH_d . A su vez, el efecto lineal negativo del nivel de presión fue el más importante, ya que presentó el coeficiente de regresión con mayor valor absoluto (-2,56), en comparación con los otros factores (-1,66 para NaCl y -0,5 para TG). La adición de fibra en la elaboración de las hamburguesas no tuvo un efecto significativo sobre la desnaturalización de las proteínas. En las Figuras 4.26 y 4.27 se presentan las superficies de respuesta correspondientes al efecto de las concentraciones de

NaCl y TG y del nivel de presión sobre el ΔH_d del total de proteínas de las hamburguesas.

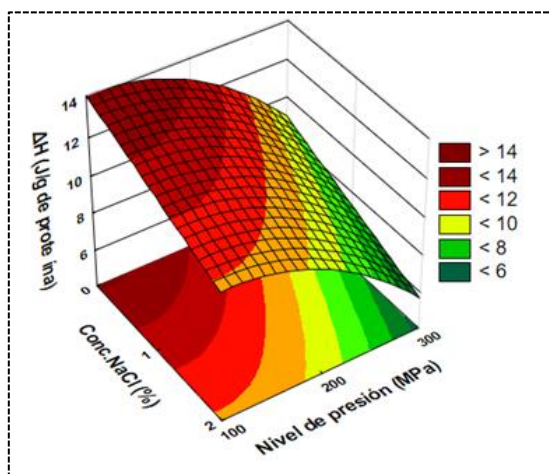


Figura 4.26. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre el cambio de entalpía de desnaturalización del total de proteínas de hamburguesas (para una concentración de 0,3 % TG).

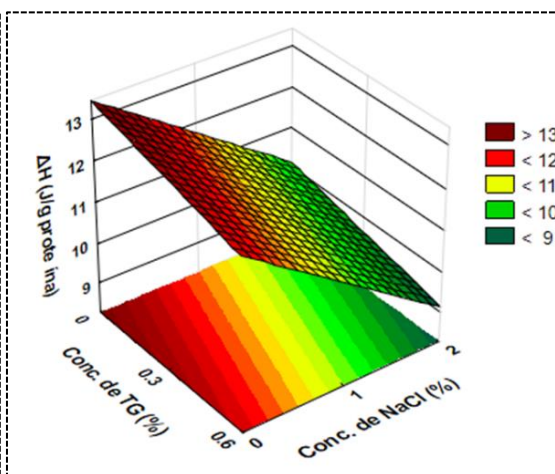


Figura 4.27. Superficie de respuesta del efecto de las concentraciones de TG y NaCl sobre el cambio de entalpía de desnaturalización del total de proteínas de hamburguesas (para 200 MPa).

La desnaturalización de proteínas cárnicas provocada por NaCl y/o por APH fue informada por Fernández-Martin y col. (2000); Pighin y col. (2007); Villamonte y col. (2013) y por Speroni y col. (2014). La solubilización de proteínas miofibrilares inducida por NaCl está acompañada de cierto grado de desnaturalización e influye sobre los efectos de otros tratamientos, como APH. En ausencia de sales, los tratamientos con APH a 200 MPa desnaturalizan la cabeza de miosina, mientras en presencia de 1 % NaCl también desnaturalizan actina. Por otro lado, los tratamientos a 200 MPa no inducen desnaturalización si la carne está adicionada solamente con TPFS. A su vez, tratamientos a 300 MPa desnaturalizan la mayoría de las proteínas cárnicas, alcanzando grados de desnaturalización que se incrementan por la presencia de NaCl y TPFS (Speroni y col., 2014).

En las muestras tratadas a 200 MPa en presencia de 2 % NaCl o con 300 MPa para cualquier composición, se observó una transición a ca. 51 °C, como se mencionó en el ítem 4.1.6 y en los trabajos de Villamonte y col. (2013) y Speroni y col. (2014). En las muestras con 1 % NaCl y con TG se detectó una nueva transición a $60,37 \pm 0,19$ °C, que fue conspicua luego del tratamiento a 100 MPa y pareció resistir el tratamiento a 200 MPa. La presencia de esta transición sugiere la formación de una especie de estructura definida, catalizada por la TG.

Tabla 4.15. Coeficientes de regresión y análisis de varianza para los modelos de regresión de las entalpías de desnaturalización de la cabeza de miosina y actina (ΔH_d , J/g de proteína)

Términos	ΔH_d de cabeza de miosina (J/g de proteína)	ΔH_d de actina (J/g de proteína)
Constante	2,28	1,44
Lineales		
NaCl	-1,59*	-0,39*
TG	-0,45*	-0,03
Fibra	0,11	-0,16
Presión	-1,49*	-1,10*
Cuadráticos		
NaCl ²	-0,26*	0,27
TG ²	-0,04	0,10
Fibra ²	-0,13	0,05
Presión ²	-0,29*	0,22
Interacciones		
NaCl x TG	0,60*	-0,28
NaCl x Fibra	0,07	-0,05
NaCl x Presión	1,40*	0,16
TG x Fibra	-0,17	-0,03
TG x Presión	0,37	0,13
Fibra x Presión	0,01	0,12
Falta de ajuste	0,164	0,427
R ²	0,963	0,915
p	<0,05	<0,05
Ecuación reducida de la entalpía de desnaturalización:		
<i>ΔH_d cabeza de miosina (J/g de proteína)</i>		
$= 2,17 - 1,59 NaCl - 0,22 NaCl^2 - 0,45 TG - 1,49 Presión - 0,25 Presión^2 + 0,60 NaCl x TG + 1,40 NaCl x Presión$		
<i>ΔH_d actina (J/g de proteína) = 1,73 - 0,39 NaCl - 1,10 Presión</i>		
(*) Nivel de significancia menor al 5 % (p<0,05)		
NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio		
TG: Concentración de transglutaminasa		
Fibra: Concentración de fibra cítrica		
Presión: Nivel de presión		

El análisis de varianza y los coeficientes de regresión para los ΔH_d de la cabeza de miosina y de actina se muestran en la Tabla 4.15, en ambos casos el modelo obtenido fue significativo (p<0,05) y logró explicar el 96,3 % y 91,5 % de las respuestas observadas, respectivamente.

El ΔH_d de la cabeza de miosina fue afectado significativamente (p<0,05) por las concentraciones de NaCl (términos lineal y cuadrático) y TG (término lineal) y por el nivel de presión (términos lineal y cuadrático), además por las interacciones NaCl x TG y NaCl x Nivel de Presión. Las concentraciones de NaCl de TG (términos lineales) y el nivel de presión (término lineal) disminuyeron significativamente (p<0,05) los valores de ΔH_d de la cabeza de miosina. Las interacciones NaCl x TG y NaCl x

Presión incrementaron el valor de dicho parámetro. Para la cabeza de miosina, la concentración de NaCl y el nivel de presión presentaron los mayores valores de coeficientes de regresión, por lo que ejercieron los efectos más importantes sobre el ΔH_d de esta proteína. La presencia de NaCl indujo que la cabeza de miosina fuera más sensible a las APH, ya que en muestras con 1 % NaCl, el tratamiento a 100 MPa disminuyó su ΔH_d , mientras que en ausencia de NaCl y para el mismo tratamiento, el ΔH_d fue mayor (Figura 4.25, paneles b y e). Cabe mencionar que a bajos niveles de presión (100 o 200 MPa) la presencia de TPFS protegió a la cabeza de miosina de la desnaturalización inducida por APH, mientras que la adición de 1 % NaCl redujo el efecto protector del TPFS.

El ΔH_d de actina fue afectado significativamente ($p < 0,05$) por la concentración de NaCl y por el nivel de presión, en ambos casos de forma lineal negativa. Para actina el efecto más importante fue el de la presión, ya que tuvo mayor valor absoluto del coeficiente de regresión. La actina fue menos sensible a la presión y a la concentración de NaCl que la cabeza de miosina (menores valores absolutos de los coeficientes) y no se vio afectada por la concentración de TG.

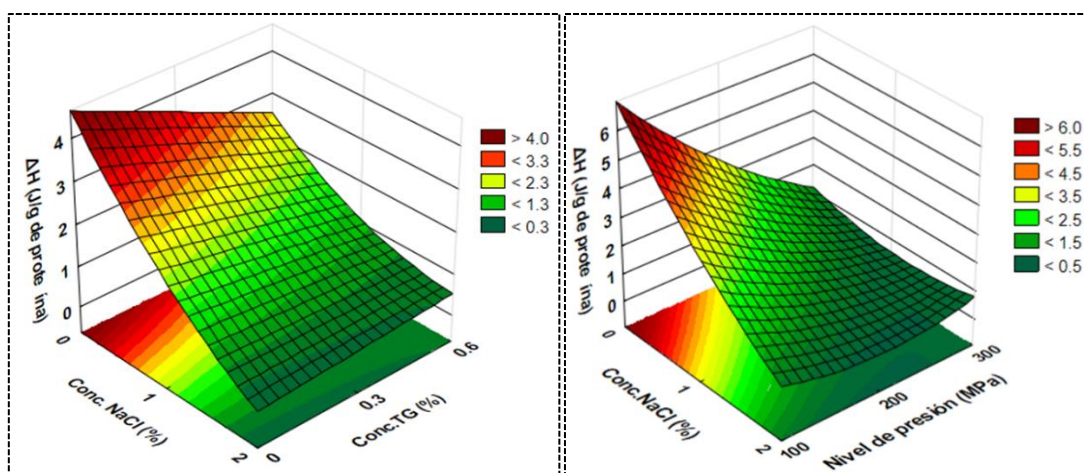


Figura 4.28. Superficie de respuesta del efecto de las concentraciones de NaCl y TG sobre el cambio de entalpía de desnaturalización de la cabeza de miosina de muestras de hamburguesas (para 200 MPa).

Figura 4.29. Superficie de respuesta del efecto de la concentración de NaCl y del nivel de presión sobre el cambio de entalpía de desnaturalización de la cabeza de miosina de muestras de hamburguesas (para una concentración de 0,3 % TG).

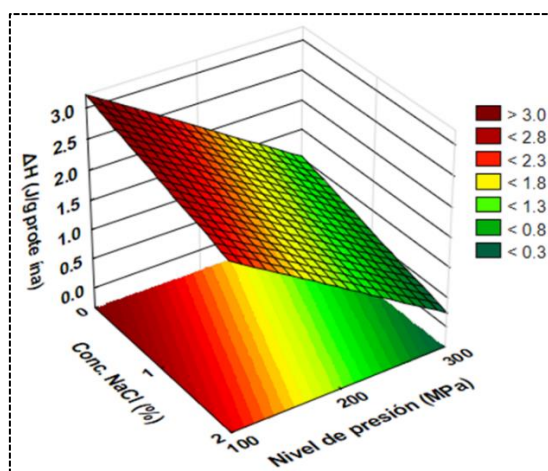


Figura 4.30. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre el cambio de entalpía de desnaturalización de actina de muestras de hamburguesas.

Las Figuras 4.28, 4.29 y 4.30 presentan las superficies de respuesta correspondientes al ΔH_d de la cabeza de miosina y actina, en función de los factores que tuvieron efectos significativos. Respecto a la cabeza de miosina, para la mayor concentración de NaCl (2 %) se observaron los menores valores de ΔH_d con un mínimo efecto de la concentración de TG y del nivel de presión. También la desnaturalización de actina fue mayor con el incremento del nivel de presión y de la concentración de NaCl. Si bien para ambas proteínas los factores que influyeron en forma importante fueron el nivel de presión y la concentración de NaCl, para actina se observó un predominio del efecto de la presión sobre el de la concentración de NaCl (Figura 4.30). En cambio, en el caso de la cabeza de miosina el predominio de un factor fue relativo al rango de valores del otro factor, es decir a baja concentración de NaCl el efecto de la presión fue importante, mientras que, a alta concentración de NaCl, el efecto de la presión fue mínimo. De manera recíproca el nivel de presión moduló el efecto de la concentración de NaCl.

La TG también promovería un cierto grado de desnaturalización, como fue informado para la cabeza de miosina por Aktas y Kilic (2005) y por Hong y Xiong (2012). Sin embargo, actina no se desnaturalizaría por acción de TG (Aktas y Kilic, 2005). Para proteínas de origen vegetal también se informó desplegamiento de la estructura proteica inducido por TG (Siu y col., 2002). En el presente trabajo se observó que el efecto de TG sobre la desnaturalización de la cabeza de miosina depende de la concentración de NaCl, siendo minimizado al incrementar la concentración de NaCl.

4.2.7 Análisis del perfil electroforético de las proteínas

Las proteínas se evaluaron mediante SDS-PAGE. Se utilizaron distintos buffers para la extracción de éstas (B0,1 para sarcoplásmicas y B0,6 para miofibrilares). El perfil electroforético de las proteínas de muestras de hamburguesas se evaluó según el diseño experimental, analizando hamburguesas elaboradas con distintas concentraciones de NaCl, TG y fibra y otro aditivo (0,5 % TPFS) y posteriormente tratadas con distintos niveles de presión (100, 200 o 300 MPa).

4.2.7.1 Efecto de los aditivos y la aplicación de APH sobre las proteínas sarcoplásmicas

La Figura 4.31 presenta los perfiles electroforéticos de las proteínas sarcoplásmicas de muestras de hamburguesas sometidas a los distintos tratamientos.

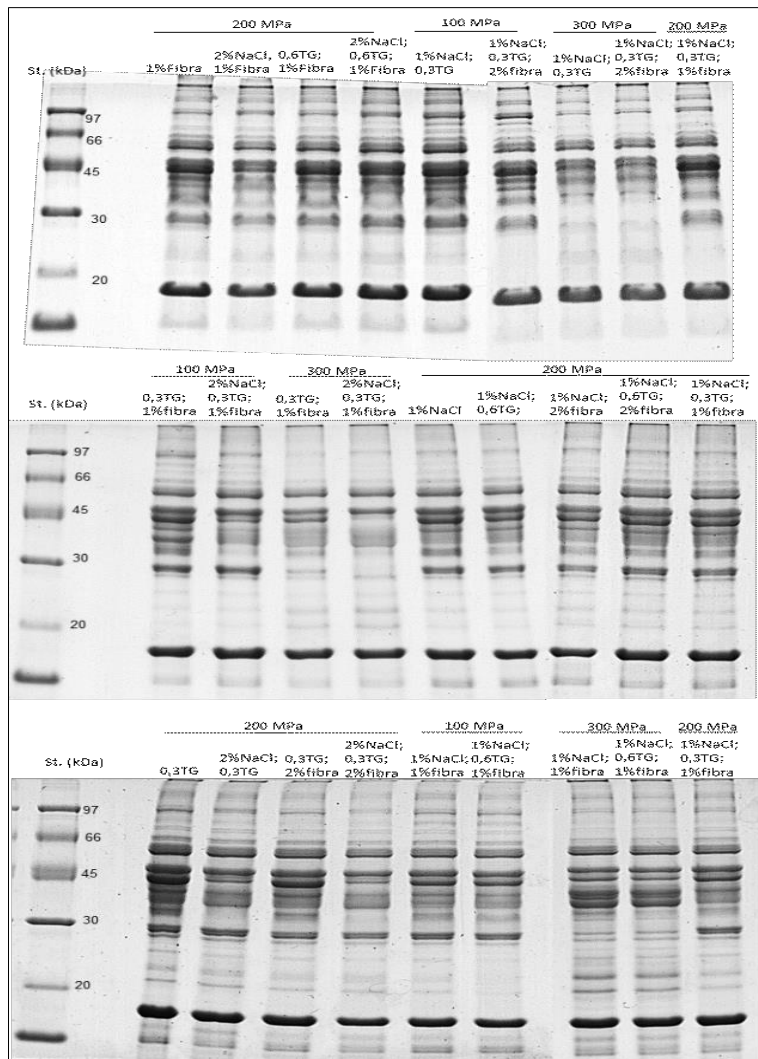


Figura 4.31. Perfiles electroforéticos de proteínas sarcoplásmicas de muestras de hamburguesas. St: muestra estándar con pesos moleculares definidos.

Se observaron efectos similares a los detectados en el estudio previo (ítem 4.1.7) con respecto al tratamiento con APH: los perfiles fueron sensiblemente diferentes luego del tratamiento a 300 MPa (disminución de la intensidad de las bandas de 97, 43 y 30 kDa y aumento de la intensidad de las bandas de 38, 36, 28, 24 y 22 kDa). Por otra parte, luego de tratamientos a 100 o 200 MPa, los perfiles fueron similares a los correspondientes a hamburguesas control (sin presurizar). Estos datos sugieren que para las proteínas sarcoplásmicas los efectos de las APH (al menos hasta 300 MPa) son similares en presencia o ausencia de sales (NaCl y TPFS) durante el tratamiento. La presencia de fibra no ejerció efectos detectables en los perfiles electroforéticos, lo que sugiere que no interactuó directamente con las proteínas sarcoplásmicas ni interfirió en sus mecanismos de agregación o solubilización.

Con respecto a la concentración de NaCl y de TG, se observó en las muestras con 2 % NaCl (pero no con 1 %) que los polipéptidos de 43 y 32 kDa mostraron una intensidad disminuida, cuando también se adicionó TG. Esto sugiere que fue necesaria una alta concentración de NaCl para observar la acción de TG sobre estos polipéptidos, que se habrían involucrado en especies que resultaron insolubles en el B0,1. Este efecto se observó a cualquier nivel de presión.

4.2.7.2 Efecto de los aditivos y la aplicación de APH sobre las proteínas miofibrilares

La Figura 4.32 presenta los perfiles electroforéticos de las proteínas miofibrilares de muestras de hamburguesas sometidas a los distintos tratamientos.

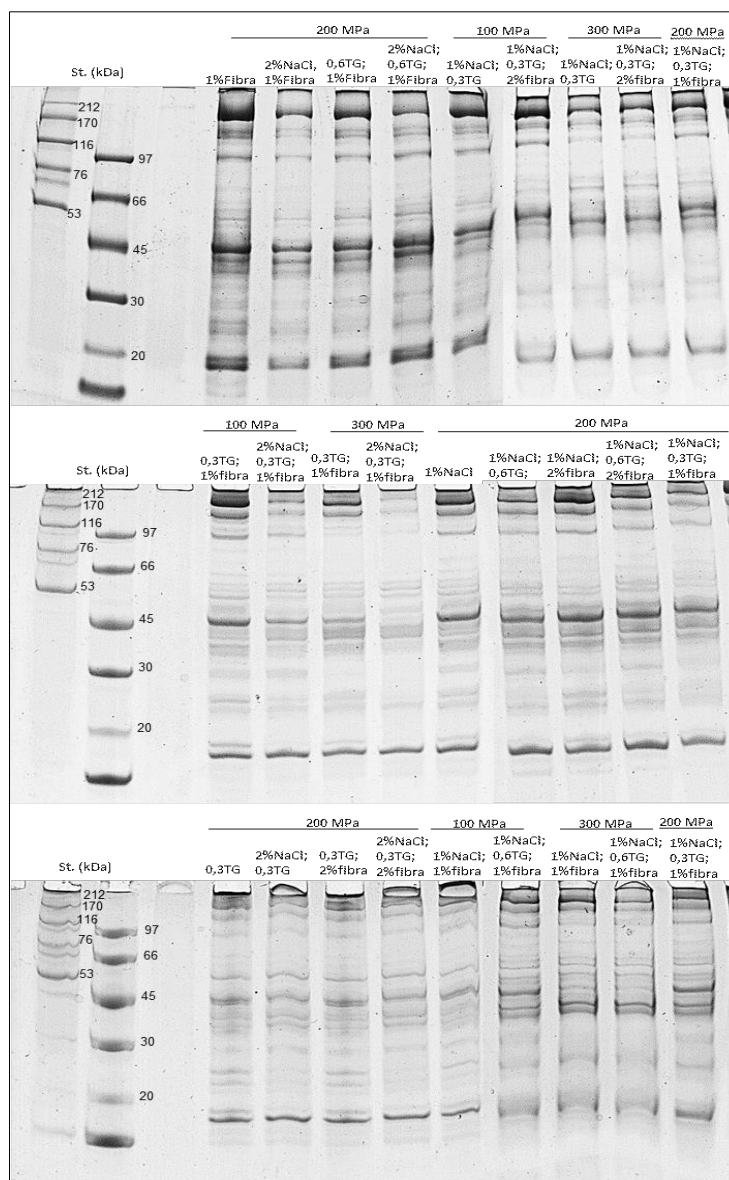


Figura 4.32. Perfiles electroforéticos de proteínas miofibrilares de muestras de hamburguesas. St: muestra estándar con pesos moleculares definidos.

Los efectos más evidentes se detectaron en la cadena pesada de miosina (CPM), en actina, en la cadena liviana de miosina (polipéptido de 24 kDa) y en troponina-C. La presencia de fibra no ejerció efectos detectables en los perfiles electroforéticos, lo que sugiere que no interactuó directamente con las proteínas miofibrilares ni interfirió en sus mecanismos de agregación o solubilización.

La intensidad de la banda correspondiente a la CPM fue alta en muestras sometidas a 100 y 200 MPa en ausencia de NaCl o en su presencia hasta 1 %. En las muestras con 2 % NaCl, los tratamientos a 100 o 200 MPa, o los tratamientos con TG (para cualquier nivel de presión) promovieron la disminución de la intensidad de la

banda. Las muestras con presencia no simultánea de NaCl o de TG, sometidas a 300 MPa, tuvieron bandas intensas para CPM. Sin embargo, cuando el NaCl y la TG estuvieron simultáneamente presentes durante el tratamiento a 300 MPa la banda fue menos intensa, sobre todo para las muestras con 2 % NaCl. Estos resultados sugieren que la concentración de NaCl influyó sobre la acción del tratamiento con APH y de la TG; las proteínas solubilizadas por el NaCl pudieron ser agregadas por la enzima (desde 1 % NaCl) o por la presión (2 % NaCl).

El comportamiento del polipéptido de 24 kDa correspondiente a la cadena liviana de miosina fue similar al de la CPM: la TG en ausencia de NaCl y la presión hasta 200 MPa en ausencia o en presencia de 1 % NaCl afectaron la intensidad de la banda. La presencia de 2 % NaCl combinada con presión a 200 MPa o la presencia de 1 o 2 % NaCl combinada con TG provocaron la disminución de la intensidad de esta banda. Estos comportamientos sugieren que la solubilización inducida por NaCl permitió que el tratamiento con 200 MPa y la TG agregaran este polipéptido.

La banda correspondiente a actina tuvo baja intensidad en las muestras tratadas con 300 MPa, este efecto fue acentuado por la presencia de NaCl. Las muestras que contuvieron simultáneamente 2 % NaCl y TG también mostraron baja intensidad en la banda de actina. La agregación de actina fue más evidente luego del tratamiento a 300 MPa que por efecto de otros factores. Tseng y col. (2002) trabajaron con proteínas miofibrilares aisladas de carne de gallina y también mostraron que actina se involucró en agregados más lentamente que la cadena pesada de miosina. Además, la polimerización de actina no fue completa, mientras que la de miosina sí lo fue. En conjunto estos datos sugieren que miosina es mejor sustrato que actina para la TG.

La banda de troponina-C exhibió baja intensidad en las muestras que contuvieron TG. Este efecto de TG fue más acentuado en muestras tratadas con 200 o 300 MPa en presencia de 1 o 2 % NaCl. Este comportamiento sugiere que troponina-C fue solubilizada por el NaCl, fue sustrato de TG y luego sus productos fueron insolubilizados por los tratamientos con 200 o 300 MPa.

En conjunto estos resultados sugieren que las proteínas miofibrilares se agregaron, posiblemente formando un gel cuyos componentes no fueron solubilizados por el B0,6, a través de mecanismos que involucraron en primer término la solubilización por NaCl, luego la polimerización por la acción de TG y por último agregación inducida por el tratamiento APH a 300 MPa, o a 200 MPa; en este último

caso si la concentración de NaCl fue del 2 %. Estos resultados están en acuerdo con los observados por Hong y Chin (2010), quienes trabajaron con proteínas miofibrilares aisladas y TG e informaron que la gelificación de estas proteínas por acción enzimática comenzaba a partir de una concentración de NaCl igual o mayor a 1,8 %.

Tanto para las proteínas sarcoplásmicas como para las miofibrilares no se detectaron por análisis de SDS-PAGE diferencias debidas a la concentración de enzima TG entre 0,3 y 0,6 %. En ambos tipos de proteínas se encontró que el NaCl promovió la acción de TG, probablemente la solubilización y la desnaturalización inducidas por el NaCl favorecieron la exposición o acceso al sitio activo de restos de lisina y glutamina. En el caso de las sarcoplásmicas la polimerización o agregación fue consecuencia de la actividad de TG, mientras que en las miofibrilares la agregación fue debida tanto a TG como a la posterior aplicación de APH. La formación de agregados al 2 % NaCl, en presencia de TG y en muestras presurizadas a 200 o 300 MPa se vinculó con los resultados de los ensayos de esfuerzo y trabajo de corte (Tabla 4.12), en que se observó que la TG y el tratamiento con APH aumentaron dichos parámetros.

4.2.8 Análisis de la microestructura de muestras de hamburguesa mediante microscopía electrónica de barrido

Las micrografías expuestas en las Figuras 4.33, 4.34, 4.35 y 4.36 corresponden a muestras de hamburguesas elaboradas con 0,5 % de TPFS y diferentes concentraciones de los aditivos considerados en el diseño experimental (NaCl, TG y fibra) y tratadas con distintos niveles de presión.

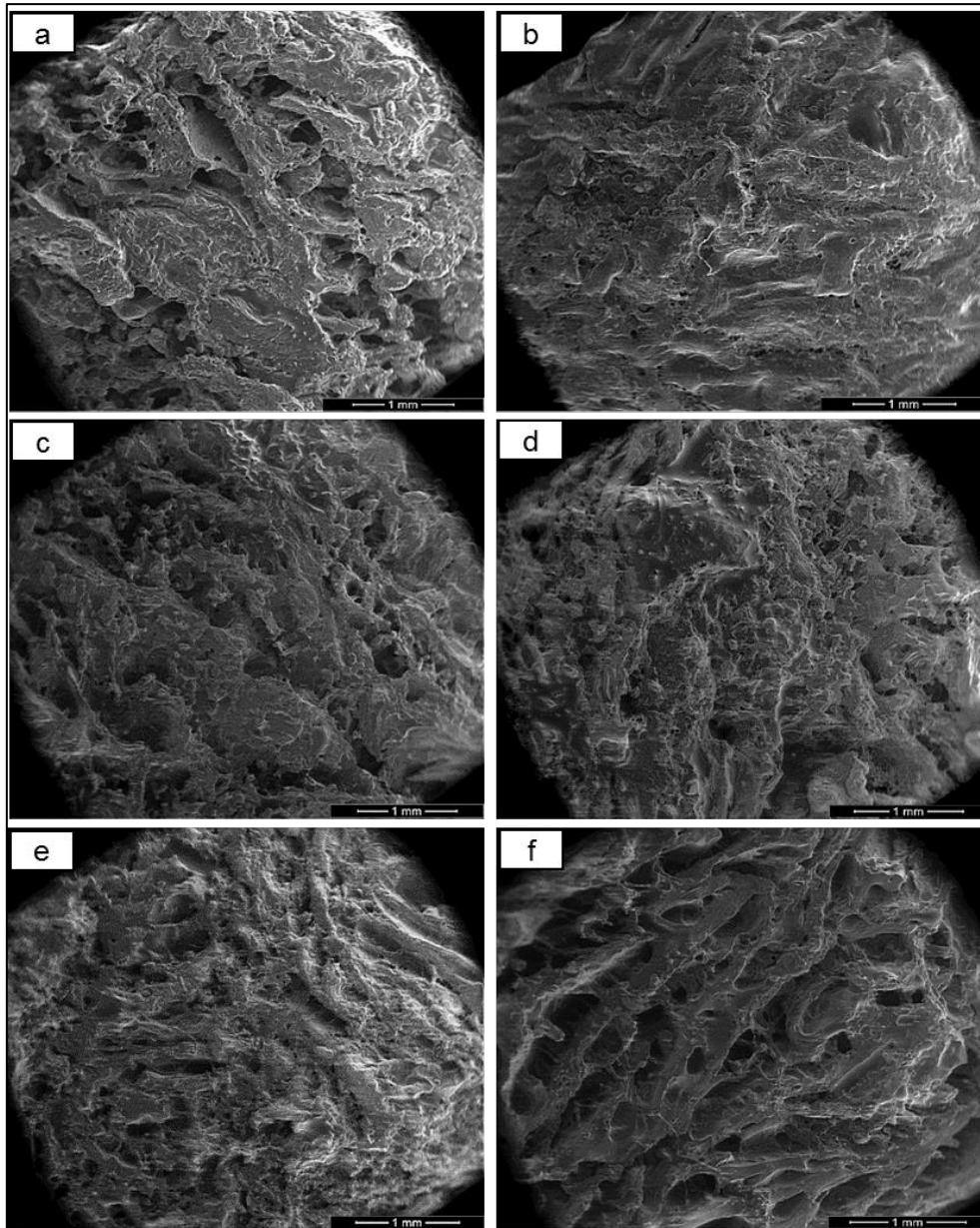


Figura 4.33. Micrográficas de muestras de hamburguesas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (60X), a: (1 % fibra, 200 MPa), b: (2 % NaCl, 1 % fibra, 200 MPa) c: (0,6 % TG, 1 % fibra, 200 MPa) d: (1 % NaCl, 0,3 % TG, 2 % fibra, 100 MPa), e: (1 % NaCl, 0,3 % TG, 2 % fibra, 300 MPa), f: (1 % NaCl, 0,3 % TG, 1 % fibra, 200 MPa). Todas las muestras se formularon con 0,5 % TPFS.

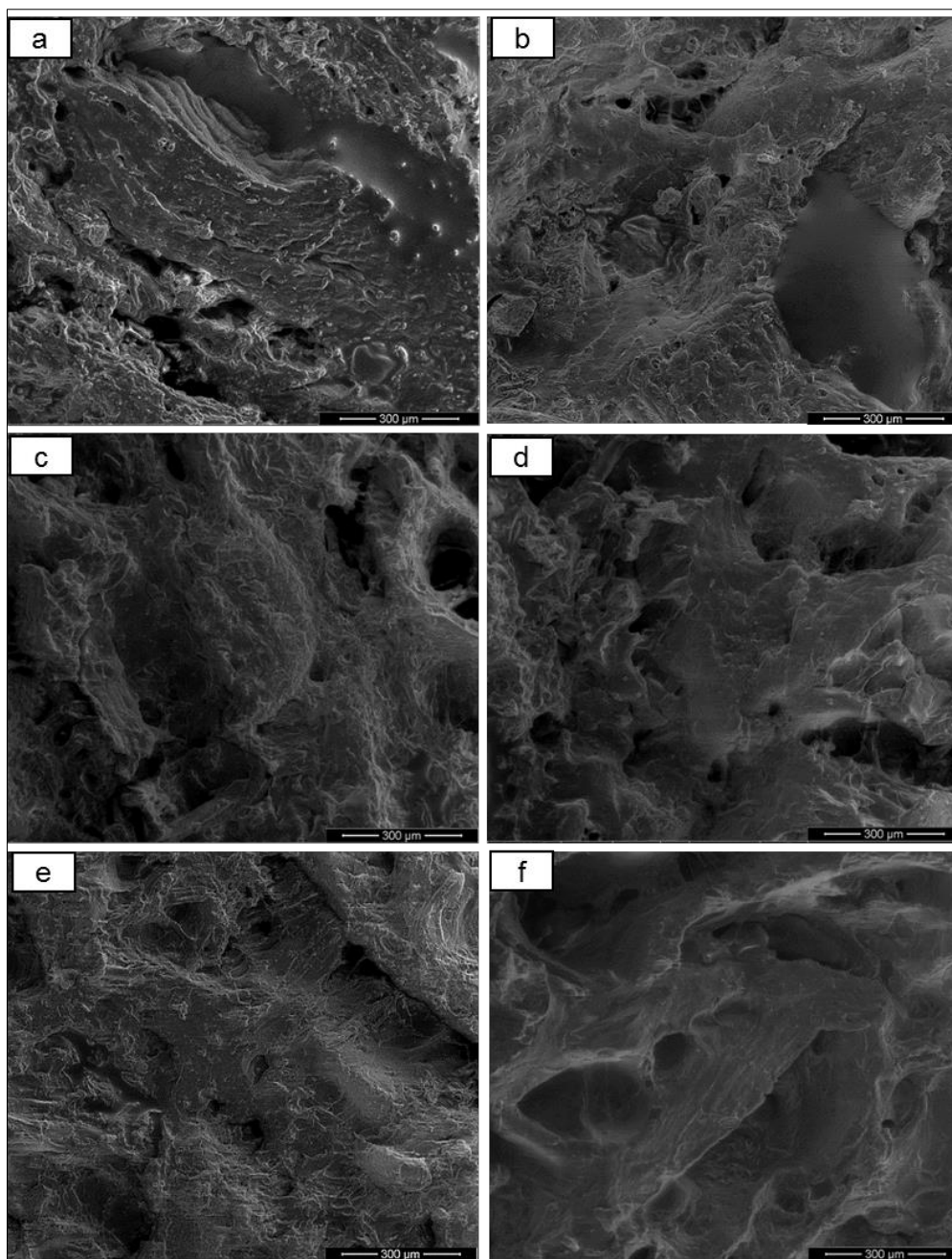


Figura 4.34. Micrografías de muestras de hamburguesas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (250X), a: (1 % fibra, 200 MPa), b: (2 % NaCl, 1 % fibra, 200 MPa) c: (0,6 % TG, 1 % fibra, 200 MPa) d: (1 % NaCl, 0,3 % TG, 2 % de fibra, 100 MPa), e: (1% NaCl, 0,3 % TG, 2 % fibra, 300 MPa), f: (1 % NaCl, 0,3 % TG, 1 % fibra, 200 MPa). Todas las muestras se formularon con 0,5 % TPFS.

La muestra “a” (0,5 % de TPFS, 1 % fibra, 200 MPa, 60X, Figura 4.33) presentó una estructura tipo pasta, debido a la adición de TPFS y al proceso de mezclado durante la elaboración de las hamburguesas. Con un aumento de 250X (Figura 4.34) se lograron diferenciar algunos haces de fibras, aunque no se distinguió claramente el tipo de corte (longitudinal y/o transversal). En la micrografía “b” (0,5 % de TPFS, 2 % NaCl, 1 % fibra, 200 MPa, 60X, Figura 4.33), se observó una estructura

más homogénea que la muestra previa. La adición de 2 % NaCl incrementó la extracción y solubilización de las proteínas, por lo cual se observó una topografía más rugosa de los haces de fibras y de las partículas cárnicas (aumento de 250X, Figura 4.34), formando a su vez una estructura más homogénea y compacta. La muestra “c” (0,5 % TPFS, 0,6 % TG, 1 % fibra, 200 MPa, 60X, Figura 4.33) difirió de la muestra “a” por la presencia de TG y presentó una estructura más homogénea y compacta, lo cual se debería a la mayor interacción entre componentes estructurales debido a la acción de la enzima TG. A un aumento de 250X se observó una mayor cohesión de los haces de fibras. La muestra “d” (0,5 % TPFS, 1 % NaCl, 0,3 % TG, 2 % fibra, 100 MPa, 60X, Figura 4.33), presentó una estructura similar a la muestra “c” pero con evidencia del efecto del NaCl, como la topografía más rugosa y presencia de zonas de mayor compactación. A 250X (muestra d, Figura 4.34) se pudo distinguir que los haces de fibra resultaron compactos. En la micrografía “e” (0,5 % TPFS, 1 % NaCl, 0,3 % TG, 2 % fibra, 300 MPa, 60X, Figura 4.33) se observó una estructura más heterogénea que en la muestra “d”. El tratamiento a 300 MPa indujo la separación de los haces de fibras y de las partículas de carne, según se observa la Figura 4.33. La muestra “f” (0,5 % TPFS, 1 % NaCl, 0,3 % TG, 1 % fibra, 200 MPa, 60X, Figura 4.33) también presentó una estructura heterogénea, con haces de fibras y partículas con mayor separación que en la muestra “d”.

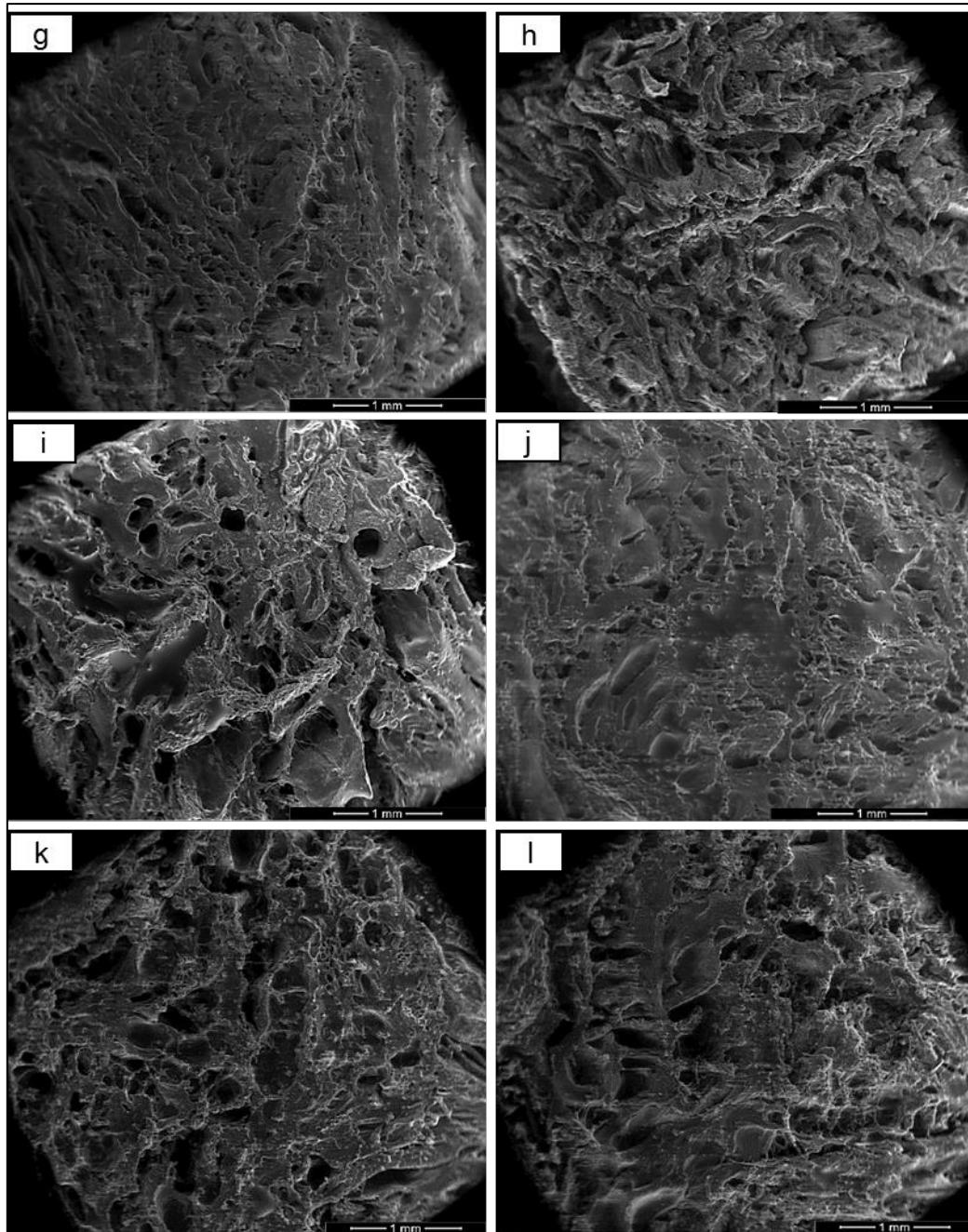


Figura 4.35. Micrografías de muestras de hamburguesas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (60X), g: (1 % NaCl, 200 MPa), h: (0,3 % TG, 200 MPa), i: (2 % NaCl, 0,3 % TG, 200 MPa), j: (2 % NaCl, 0,3 % TG, 2 % fibra, 200 MPa), k: (1 % NaCl, 1 % fibra, 300 MPa), l: (1 % NaCl, 0,6 % TG, 1 % fibra, 300 MPa). Todas las muestras se formularon con 0,5 % TPFS.

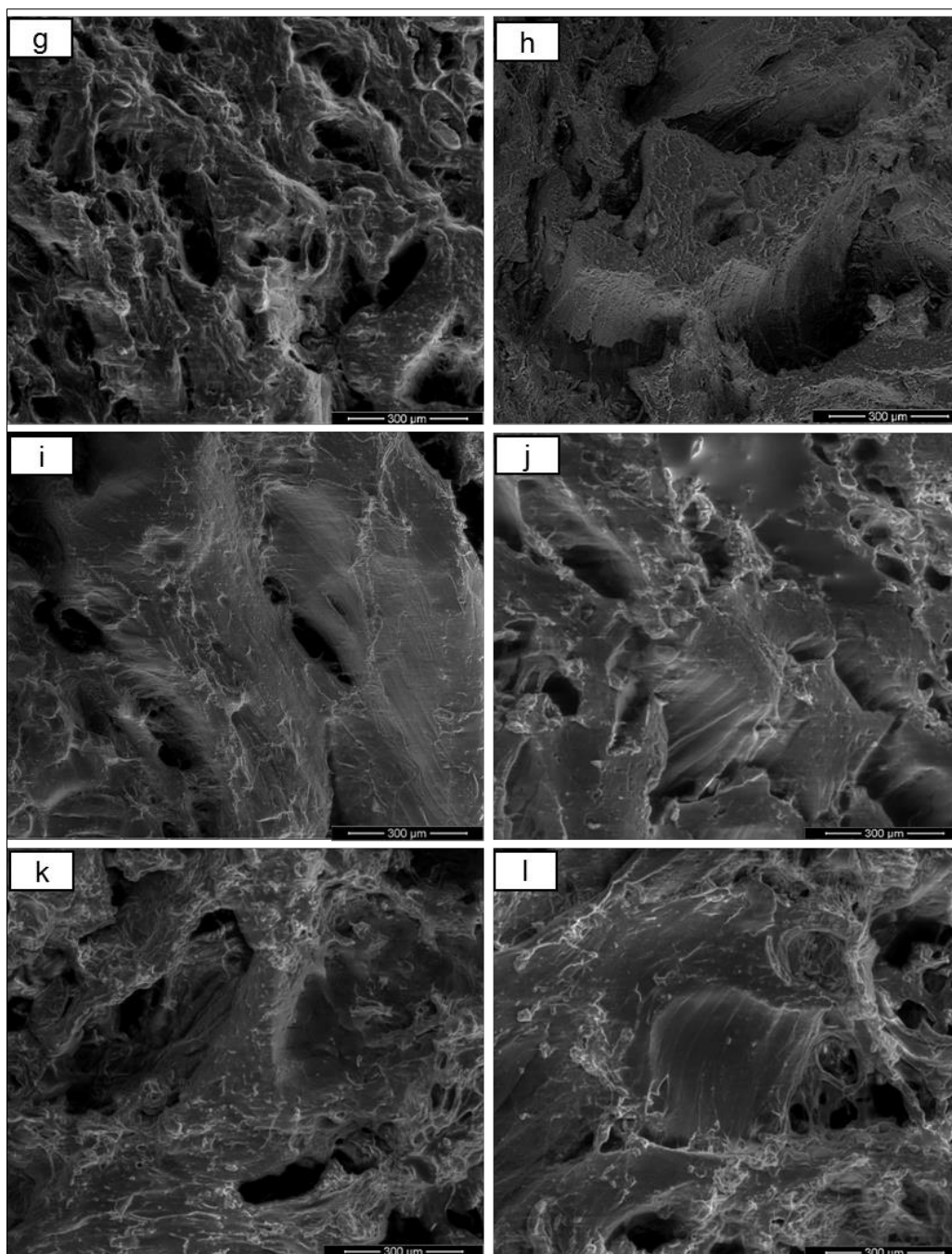


Figura 4.36. Micrografías de muestras de hamburguesas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (250X), g: (1 % NaCl, 200 MPa), h: (0,3 % TG, 200 MPa), i: (2 % NaCl, 0,3 % TG, 200 MPa), j: (2 % NaCl, 0,3 % TG, 2 % fibra, 200 MPa), k: (1 % NaCl, 1 % fibra, 300 MPa), l: (1 % NaCl, 0,6 % TG, 1 % fibra, 300 MPa). Todas las muestras se formularon con 0,5 % TPFS.

La micrografía “g” (0,5 % TPFS, 1 % NaCl, 200 MPa, 60X, Figura 4.35) mostró una estructura homogénea de tipo pasta. A 250X (Figura 4.36) se lograron diferenciar haces de fibras en cortes longitudinales y transversales y se observó el efecto de la extracción y solubilización de las proteínas (rugosidad superficial, depósito de proteínas agregadas). En la muestra “h” (0,5 % TPFS, 0,3 % TG, 200 MPa, 60X, Figura 4.35) se observó una estructura más heterogénea, con mayor separación de los

haces de fibras y de las partículas cárnicas. A 250X se observó haces de fibras en cortes transversales; a esta muestra no se adicionó NaCl, por lo tanto, la extracción y solubilización de las proteínas fue menor, observándose una topografía sin depósitos de proteínas agregadas. En la micrografía “i” (0,5 % TPFS, 2 % NaCl, 0,3 % TG, 200 MPa, 60X, Figura 4.35) se observó que la topografía de los haces de fibras y de las partículas presenta una estructura compacta que estaría conformada por proteínas solubilizadas por el NaCl y polimerizadas por la TG. En la micrografía “j” (0,5 % TPFS, 2 % NaCl, 0,3 % TG, 2 % fibra, 200 MPa, 60X, Figura 4.35), se observó una imagen similar a la de la “i”, pero con una estructura aún más homogénea y compacta, esto se debería a la adición de fibra. Las muestras “k” (0,5 % TPFS, 1 % NaCl, 1 % fibra, 300 MPa, 60X, Figura 4.35) y “l” (0,5 % de TPFS, 1 % de NaCl, 0,6 % de TG, 1 % de fibra, 300 MPa, 60X, Figura 4.35) presentaron una estructura similar a las muestras “j” pero más heterogéneas, en las cuales las partículas cárnicas están más separadas. A 250X se observaron haces de fibras, mayoritariamente en cortes transversales, presentando en su topografía depósitos de proteínas extraídas y agregadas

En general se observó que la incorporación de los aditivos en distintas concentraciones y el tratamiento con APH modificaron la microestructura de las hamburguesas. Los aditivos como las sales (NaCl y TPFS), la TG y la fibra inducirían la formación una microestructura más homogénea y compacta. El tratamiento con APH causaría la separación de las fibras cárnicas; este efecto sería dependiente del nivel de presión al cual se trata la muestra. Además, la formulación, el picado y el amasado de la carne que se aplican en la elaboración de las hamburguesas, serían otros factores responsables de la modificación de la microestructura del alimento. Estos análisis ayudarían a comprender los efectos de los factores del diseño experimental sobre los parámetros de textura y capacidad de retención de agua, descritos en ítems previos.

4.2.9 Optimización de los factores de diseño utilizando la función deseabilidad

La función deseabilidad es uno de los métodos más utilizados para la optimización del efecto de múltiples factores sobre una variable respuesta. Este método fue desarrollado por Harrington en 1965 y modificado Derringer y Suich en 1980.

Este método convierte las ecuaciones de regresión obtenidas para cada variable respuesta en una función individual (deseabilidad), cuyos valores están

comprendidos entre 0 y 1. De este modo, si el valor de la respuesta se encuentra fuera de una región aceptable, se le asigna un valor de 0, mientras que, si la respuesta se ajusta a lo deseable, se le asigna un valor de 1. Luego se obtiene la deseabilidad general “D” del proceso, que se define como la media geométrica de las deseabilidades individuales.

En el presente trabajo, la función deseabilidad fue utilizada para optimizar los factores del diseño experimental (concentraciones de NaCl, TG y fibra y nivel de presión) de modo de obtener los valores deseados de los parámetros tecnológicos y fisicoquímicos evaluados. Lo deseado en el presente estudio fue obtener el valor mínimo de pérdida de peso por cocción y valores adecuados de los parámetros de textura (dureza y esfuerzo de corte) de las hamburguesas.

El valor D se obtuvo utilizando el software STATISTICA. Un valor cercano a 1 de D indica que todas las funciones deseabilidad individuales se acercaron al valor deseable, por lo tanto, el máximo de esa función será considerado como la solución óptima del sistema.

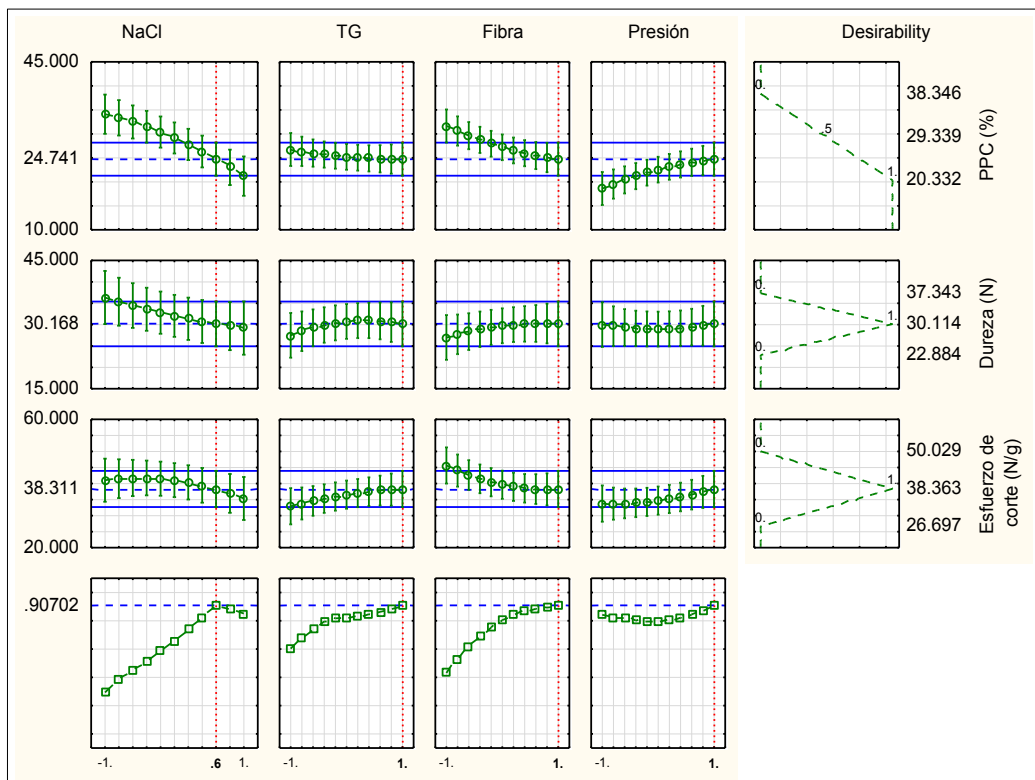


Figura 4.37. Optimización los factores evaluados (concentraciones de NaCl, TG y fibra, y nivel de presión) en hamburguesas de carne bovina, presentando las variables respuesta (pérdida de peso por cocción –PPC–, dureza y esfuerzo de corte) con los valores predichos.

La Figura 4.37 muestra los gráficos de los perfiles predichos para los factores del diseño experimental (concentraciones de NaCl, de TG y de fibra, y nivel de presión) y los perfiles de la función deseabilidad obtenidos para cada variable respuesta (pérdida de peso por cocción, dureza y esfuerzo de corte).

Realizando el análisis con la función deseabilidad se determinaron los valores óptimos de los factores del diseño experimental: concentraciones de NaCl de 1,6 %; TG de 0,6 % y fibra de 2 %, y nivel de presión de 300 MPa, con un valor de deseabilidad de 0,91. Con estas condiciones se obtuvieron los siguientes valores predichos para las variables respuesta: 24,74 % para la pérdida de peso por cocción, 30,17 N para dureza y 38,31 N/g para el esfuerzo de corte (Figura 4.37).

4.2.10 Validación de los valores predichos mediante la función deseabilidad

Después de realizar la optimización con la función deseabilidad, se realizó la validación utilizando los valores optimizados de los factores del diseño, los cuales fueron concentraciones de NaCl de 1,6 %; TG de 0,6 %; fibra de 2 % y nivel de presión de 300 MPa. Para ello se utilizó un diseño factorial 2x2x2, en donde además de estar incluido el tratamiento con los factores optimizados se evaluaron distintas concentraciones de TG y fibra cítrica, además del nivel de presión. La concentración de NaCl no fue un factor del diseño experimental, por lo que esta sal se incorporó según el valor óptimo (1,6 %).

a) pH

La tabla 4.16 presenta los valores de pH de muestras de hamburguesas crudas y cocidas.

Tabla 4.16. Valores medios y desvíos del pH de hamburguesas crudas y cocidas correspondientes al diseño factorial

Nivel de presión (MPa)	Concentración de fibra (%)	Concentración de TG (%)	pH de hamburguesas crudas	pH de hamburguesas cocidas	
0,1	0	0,0	6,36 (0,07) ^{b,A}	6,37 (0,11) ^z	
		0,6	6,35 (0,07) ^{b,AB}	6,42 (0,04) ^{x,y}	
	2	0,0	6,33 (0,05) ^{b,B}	6,41 (0,01) ^{x,y,z}	
		0,6	6,38 (0,06) ^{b,AB}	6,42 (0,04) ^{x,y,z}	
300	0	0,0	6,48 (0,05) ^{a,A}	6,45 (0,02) ^x	
		0,6	6,40 (0,05) ^{a,AB}	6,38 (0,03) ^{y,z}	
	2	0,0	6,41 (0,05) ^{a,B}	6,38 (0,01) ^{y,z}	
		0,6	6,44 (0,07) ^{a,AB}	6,43 (0,04) ^{x,y}	
	Valor p del modelo				
	MODELO	Presión		0,001	0,631
Fibra			0,667	0,631	
TG			0,969	0,446	
Presión x Fibra			0,670	0,262	
Presión x TG			0,234	0,124	
Fibra x TG			0,008	0,233	
Presión x Fibra x TG			0,458	0,003	
CME			0,003	0,002	

Nota: TG: enzima Transglutaminasa. ^{a, b}: en la misma columna indica efecto significativo del nivel de presión ($p < 0,05$). ^{A, B}: en la misma columna indica efecto significativo de la interacción Fibra x TG ($p < 0,05$). ^{x, y, z}: en la misma columna indica efecto significativo de la interacción Presión x Fibra x TG ($p < 0,05$).

El análisis de varianza de los valores de pH de hamburguesas crudas presentó un efecto significativo ($p < 0,05$) del nivel de presión y de la interacción concentración de Fibra x TG. El tratamiento con APH a 300 MPa incremento significativamente el pH de las hamburguesas crudas en comparación con las muestras control. El pH de las hamburguesas cocidas presentó efecto significativo de la interacción Presión x Fibra x TG, incrementando su valor.

b) Parámetros cromáticos

El análisis de varianza de los parámetros cromáticos de hamburguesas (crudas y cocidas) se presenta en la tabla 4.17, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) por efecto de los distintos factores evaluados.

Tabla 4.17. Valores medios y desvíos de los parámetros cromáticos de hamburguesas crudas y cocidas correspondientes al diseño factorial

Nivel de presión (MPa)	Conc. de fibra (%)	Conc. de TG (%)	Hamburguesas crudas			Hamburguesas cocidas			
			L*	a*	b*	L*	a*	b*	
0,1	0	0,0	43,54 (1,56) ^z	19,73 (3,18) ^a	11,64 (0,91) ^{a,B,ii}	51,90 (0,83) ^b	10,31 (0,84)	10,06 (0,59) ^B	
		0,6	44,21 (2,32) ^z	20,99 (2,90) ^a	11,97 (1,30) ^{a,B,ii}	51,40 (0,91) ^b	10,09 (0,62)	10,46 (0,73) ^B	
	2	0,0	45,97 (1,96) ^z	19,84 (1,99) ^a	14,02 (0,66) ^{a,A,i}	51,61 (0,92) ^b	9,75 (1,34)	11,27 (1,05) ^A	
		0,6	45,38 (2,41) ^z	18,89 (2,24) ^a	12,70 (2,04) ^{a,A,ii}	51,14 (1,69) ^b	9,51 (0,26)	11,66 (1,08) ^A	
	300	0	0,0	52,09 (1,06) ^x	14,46 (2,50) ^b	11,33 (0,60) ^{b,B,ii}	54,08 (0,80) ^a	9,93 (1,35)	9,95 (0,46) ^B
			0,6	49,82 (1,33) ^y	11,90 (1,87) ^b	11,32 (0,44) ^{b,B,ii}	52,84 (1,91) ^a	9,14 (0,45)	10,69 (1,20) ^B
2		0,0	52,13 (1,49) ^x	12,47 (2,67) ^b	12,81 (0,46) ^{b,A,i}	53,83 (0,60) ^a	9,40 (1,49)	11,54 (1,24) ^A	
		0,6	50,20 (1,32) ^y	10,48 (0,94) ^b	11,86 (0,69) ^{b,A,ii}	53,43 (0,92) ^a	9,60 (0,70)	11,67 (0,86) ^A	
Valor p del modelo									
MODELO	Presión		0,001	0,001	0,015	0,001	0,167	0,715	
	Fibra		0,053	0,056	0,001	0,879	0,297	0,001	
	TG		0,048	0,131	0,105	0,059	0,361	0,134	
	Presión x Fibra		0,123	0,610	0,366	0,510	0,347	0,874	
	Presión x TG		0,040	0,085	0,982	0,621	0,915	0,947	
	Fibra x TG		0,648	0,553	0,034	0,516	0,393	0,576	
	Presión x Fibra x TG		0,429	0,319	0,549	0,559	0,380	0,591	
	CME		3,041	5,667	1,046	1,339	0,961	0,887	

Nota: TG: enzima Transglutaminasa ^{a, b}: en la misma columna indica efecto significativo del nivel de presión ($p < 0,05$). ^{A, B}: en la misma columna indica efecto significativo de la concentración de fibra ($p < 0,05$). ^{x, y, z}: indica diferencia significativa de la interacción Presión x TG ($p < 0,05$). ^{i, ii, iii}: indica diferencia significativa de la interacción Fibra x TG ($p < 0,05$).

En la Tabla 4.17 se observa que el nivel de presión tuvo efecto significativo ($p < 0,05$) sobre los tres parámetros cromáticos de las hamburguesas crudas. La luminosidad (L*) de las hamburguesas crudas tratadas a 300 MPa fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que la luminosidad de las muestras sin presurizar. A su vez, la interacción Presión x TG, afectó significativamente ($p < 0,05$) el parámetro L* de hamburguesas crudas, aumentando su valor en comparación con la muestra control.

El parámetro a* de las hamburguesas crudas tratadas a 300 MPa disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en relación con el parámetro a* de las muestras sin presurizar. A su vez, el parámetro b* disminuyó significativamente ($p < 0,05$) por efecto del nivel de presión, mientras que la incorporación de fibra y la interacción Fibra x TG incrementaron significativamente ($p < 0,05$) el valor de b*.

A su vez, el parámetro b^* disminuyó significativamente ($p < 0,05$) por efecto del nivel de presión, mientras que la incorporación de fibra y la interacción Fibra x TG incrementaron significativamente ($p < 0,05$) el valor de b^* .

Con respecto a los parámetros cromáticos de hamburguesas cocidas, la aplicación de presión y la adición de fibra incrementaron significativamente la luminosidad y el parámetro b^* , respectivamente (Tabla 4.17).

c) Análisis del perfil de textura

En el análisis del perfil de textura se evaluaron los parámetros correspondientes a dureza, elasticidad, cohesividad y masticabilidad de hamburguesas cocidas. Los resultados del análisis de varianza y los valores medios y desvíos de los parámetros de textura se presentan en la Tabla 4.18.

Tabla 4.18. Valores medios y desvíos de los parámetros de textura de hamburguesas cocidas correspondientes al diseño factorial

Nivel de presión (MPa)	Conc. de fibra (%)	Conc. de TG (%)	Dureza (N)	Elasticidad	Cohesividad	Masticabilidad (N)
0,1	0	0,0	19,36 (1,31) ^{b,B,iii}	0,748 (0,008) ^{a,C}	0,617 (0,014) ^{a,iii}	11,45 (1,12) ^{a,B,iii}
		0,6	21,44 (0,50) ^{b,B,iii}	0,797 (0,010) ^{a,A}	0,692 (0,015) ^{a,i}	13,64 (0,25) ^{a,A,i}
	2	0,0	24,86 (1,21) ^{a,B,ii}	0,715 (0,005) ^{b,C}	0,577 (0,008) ^{c,iii}	12,65 (0,50) ^{a,B,ii}
		0,6	23,12 (1,39) ^{a,B,i}	0,767 (0,008) ^{b,A}	0,618 (0,008) ^{c,ii}	13,05 (0,78) ^{a,A,i}
300	0	0,0	15,28 (0,73) ^{c,C,iii}	0,717 (0,005) ^{c,D}	0,572 (0,016) ^{b,iii}	8,71 (0,44) ^{b,C,iii}
		0,6	21,69 (0,80) ^{c,A,iii}	0,75 (0,004) ^{c,B}	0,648 (0,004) ^{b,i}	12,66 (0,41) ^{b,A,i}
	2	0,0	19,32 (0,55) ^{a,C,ii}	0,708 (0,013) ^{c,D}	0,577 (0,005) ^{c,iii}	11,08 (0,11) ^{a,C,ii}
		0,6	25,48 (1,64) ^{a,A,i}	0,753 (0,005) ^{c,B}	0,598 (0,004) ^{c,ii}	13,63 (0,76) ^{a,A,i}
Valor p del modelo						
MODELO	Presión		0,001	0,001	0,001	0,001
	Fibra		0,001	0,001	0,001	0,001
	TG		0,001	0,001	0,001	0,001
	Presión x Fibra		0,043	0,001	0,001	0,001
	Presión x TG		0,001	0,035	0,130	0,001
	Fibra x TG		0,001	0,155	0,001	0,001
	Presión x Fibra x TG		0,222	0,472	0,075	0,586
	CME		1,187	0,001	0,001	0,392

Nota: TG: enzima Transglutaminasa ^{a, b, c}: en la misma columna indica efecto significativo de la interacción Presión x Fibra ($p < 0,05$). ^{A, B, C, D}: en la misma columna indica efecto significativo de la interacción Presión x TG ($p < 0,05$). ^{i, ii, iii, iii}: indica diferencia significativa de la interacción Fibra x TG ($p < 0,05$).

Los valores de dureza y masticabilidad mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) por efecto de las interacciones Presión x Fibra, Presión x TG, Fibra x TG, incrementando el valor de ambos parámetros. El parámetro elasticidad mostró efectos significativos ($p < 0,05$) de las interacciones Presión x Fibra y Presión x TG. Este parámetro disminuyó por efecto de la interacción Presión x Fibra e incrementó por efecto de la interacción Presión x TG. La cohesividad de las hamburguesas cocidas disminuyó significativamente ($p < 0,05$) por efecto de la interacción Presión x Fibra, mientras que la interacción Fibra x TG incrementaron significativamente los valores de cohesividad en comparación con la muestra control.

d) Esfuerzo y trabajo de corte

En la Tabla 4.19 se muestran los resultados del análisis de varianza y los valores medios y desvíos correspondientes a los parámetros esfuerzo y trabajo de corte de hamburguesas cocidas

Tabla 4.19. Valores medios y desvíos del esfuerzo y trabajo de corte de hamburguesas cocidas correspondientes al diseño factorial

Nivel de presión (MPa)	Conc. de fibra (%)	Conc. de TG (%)	Esfuerzo de corte (N/g)	Trabajo de corte (mJ/g)
0,1	0	0,0	30,30 (1,45) ^d	0,093 (0,006) ^e
		0,6	35,49 (2,19) ^b	0,115 (0,012) ^{bc}
	2	0,0	33,26 (0,92) ^c	0,103 (0,002) ^d
		0,6	39,89 (2,22) ^a	0,119 (0,008) ^{ab}
300	0	0,0	18,28 (0,87) ^e	0,054 (0,002) ^f
		0,6	38,83 (1,76) ^a	0,126 (0,009) ^a
	2	0,0	34,35 (1,15) ^{bc}	0,108 (0,008) ^{cd}
		0,6	33,62 (0,81) ^c	0,101(0,001) ^d
Valor p del modelo				
MODELO	Presión		0,001	0,001
	Fibra		0,001	0,001
	TG		0,001	0,001
	Presión x Fibra		0,053	0,065
	Presión x TG		0,001	0,002
	Fibra x TG		0,001	0,001
	Presión x Fibra x TG		0,001	0,001
	CME		2,312	0,001

Nota: a, b, c, d, e: en la misma columna indica efecto significativo de la interacción Presión x Fibra x TG ($p < 0,05$).

Para estos parámetros la interacción de los tres factores estudiados (Presión x Fibra x TG) incrementaron significativamente ($p < 0,05$) el valor de esfuerzo y trabajo de corte.

e) Pérdida de peso por cocción y humedad expresable

El análisis de varianza y los resultados correspondientes a la pérdida de peso por cocción y la humedad expresable de hamburguesas cocidas se presentan en la Tabla 4.20.

Tabla 4.20. Valores medios y desvíos de la humedad expresable y la pérdida de peso por cocción de hamburguesas cocidas correspondientes al diseño factorial

Nivel de presión (MPa)	Conc. de fibra (%)	Conc. de TG (%)	Humedad Expresable (%)	Pérdida de peso por cocción (%)
0,1	0	0,0	22,09 (2,03) ^{a,B}	25,32 (2,28) ^{y,ii}
		0,6	23,75 (2,11) ^{a,B}	24,15 (1,25) ^{y,ii}
	2	0,0	26,67 (2,60) ^{a,A}	24,20 (3,13) ^{y,ii}
		0,6	26,32 (1,47) ^{a,A}	25,55 (1,69) ^{y,ii}
300	0	0,0	17,80 (1,80) ^{b,B}	30,08 (3,07) ^{x,i}
		0,6	19,43 (2,82) ^{b,B}	25,86 (2,39) ^{x,ii}
	2	0,0	23,10 (2,32) ^{b,A}	28,14 (1,69) ^{y,i}
		0,6	21,11 (3,59) ^{b,A}	21,71 (1,70) ^{y,ii}
Valor p del modelo				
MODELO	Presión		0,001	0,015
	Fibra		0,001	0,031
	TG		0,737	0,001
	Presión x Fibra		0,954	0,018
	Presión x TG		0,553	0,001
	Fibra x TG		0,052	0,906
	Presión x Fibra x TG		0,570	0,075
	CME		5,876	5,046

Nota: ^{a, b}: en la misma columna indica efecto significativo en el nivel de presión ($p < 0,05$). ^{A, B}: en la misma columna indica efecto significativo de fibra ($p < 0,05$). ^{x, y}: en la misma columna indica efecto significativo de Presión x Fibra ($p < 0,05$). ^{i, ii}: en la misma columna indica efecto significativo de Presión x TG ($p < 0,05$).

La PPC aumentó significativamente ($p < 0,05$) por efecto de la interacción Presión x Fibra, mientras que el valor de PPC disminuyó significativamente por efecto de la interacción Presión x TG. La HE fue afectada significativamente ($p < 0,05$) por la presión y la concentración de fibra. La presión disminuyó el valor de HE y la incorporación de fibra incrementó los valores de este parámetro.

La interacción Presión x TG fue significativa y disminuyó los valores de PPC y luminosidad (L^*) en comparación con las muestras presurizadas que no tuvieron TG, mientras que aumentó la dureza, el esfuerzo y el trabajo de corte, se relacionaría con el mecanismo propuesto en el ítem 4.2.7.2: el NaCl extraería proteínas miofibrilares que se polimerizarían por la TG para dar una matriz que luego se reforzaría por el tratamiento con 300 MPa.

En la Tabla 4.21 se presentan los valores predichos de las variables respuestas (dureza, esfuerzo de corte y pérdida de peso por cocción) calculados con valores óptimos de los factores del diseño, obtenidos mediante la función deseabilidad.

Además, se presentan los valores de las variables respuesta obtenidos en forma experimental.

Tabla 4.21. Valores predichos y experimentales para las variables de respuesta correspondientes a los valores óptimos de los factores del diseño experimental

Variables Respuesta	Valores predichos	Intervalo de confianza (95 %)		Valor experimental
		Negativo	Positivo	
Dureza (N)	30,17	24,93	35,40	25,48 (1,64)
Esfuerzo de corte (N/g)	38,31	32,67	43,95	33,62 (0,81)
Pérdida de peso por cocción (%)	24,74	21,30	28,19	21,71 (1,70)

Los valores experimentales obtenidos se encuentran dentro del intervalo de confianza de los valores predichos, por lo cual se considera validada la optimización de los factores del diseño experimental.

4.2.11 Conclusión

En este estudio el tratamiento con APH se aplicó a las hamburguesas en vez de hacerlo a la materia prima. Para algunos parámetros evaluados (parámetros L^* y a^* , pérdida de peso por cocción, humedad expresable, pH y desnaturalización de las proteínas) en este estudio se encontraron efectos similares a los observados en el estudio previo (ítem 4.1). A su vez, una de las diferencias más importantes fue el efecto sobre el esfuerzo y el trabajo de corte, los cuales en este estudio incrementaron con el aumento del nivel la presión mientras que en el estudio previo disminuyeron.

El incremento de la luminosidad y la disminución de los valores del parámetro a^* fueron efectos importantes que se observaron a 300 MPa, pero luego de la cocción de las hamburguesas el efecto de la presurización sobre los parámetros cromáticos fue mínimo. Además, la pérdida de peso por cocción incrementó con el aumento del nivel de presión. A su vez, la incorporación de aditivos tuvo efectos importantes sobre los parámetros evaluados en las hamburguesas. Los resultados indican que el uso de distintos aditivos (NaCl, Transglutaminasa y fibra cítrica) en la elaboración de hamburguesas en combinación con la aplicación de APH permitió obtener hamburguesas con propiedades fisicoquímicas adecuadas. La incorporación de Transglutaminasa y fibra permitiría disminuir la concentración de NaCl en las hamburguesas, incrementando la unión de las partículas cárnicas, aportándoles mejores propiedades texturales al producto. La fibra, además de ser un ingrediente con propiedades beneficiosas para la salud, contrarrestó el efecto de la alta presión,

disminuyendo significativamente la pérdida de peso por cocción debido a su interacción con el agua y mejoró las propiedades texturales, probablemente por su capacidad gelificante. En relación a la microestructura de las hamburguesas, el tratamiento correspondiente al mayor nivel de presión evaluado (300 MPa) indujo la separación de los haces de fibra, aunque la incorporación de los aditivos (NaCl, TPFS, TG y fibra) permitió la formación de una estructura homogénea, por lo que se obtuvieron mejores propiedades de textura en presencia de estos aditivos. Las modificaciones en la textura debido a la fibra ocurrirían sin interactuar con la matriz de proteínas cárnicas.

En cuanto al estudio de optimización de las condiciones del tratamiento con APH y la incorporación de aditivos, se logró obtener resultados favorables para los parámetros dureza, esfuerzo de corte y pérdida de peso por cocción, concluyendo que se podría obtener menor pérdida por cocción y propiedades de dureza y esfuerzo de corte convenientes con la aplicación de 300 MPa y concentraciones de 1,6 %, 2 % y 0,6 % de NaCl, fibra y TG respectivamente.

El análisis de las propiedades térmicas y moleculares de las proteínas cárnicas demostró que la combinación de los factores estudiados permitió obtener proteínas modificadas con diferentes características. La desnaturalización y agregación inducida por APH sobre las proteínas cárnicas puede ser modulada por la incorporación de TG y/o NaCl. La TG, en presencia de proteínas solubilizadas por NaCl, indujo la polimerización de la CPM en mayor grado que la de otras proteínas. El tratamiento con 200 o 300 MPa aumentó el grado de agregación e insolubilización de los polímeros generados por NaCl y TG, llegando a comprometer casi la totalidad de la actina y de la CPM en agregados insolubles con los tratamientos a 300 MPa. También se demostró que fue posible incorporar hasta un 2 % de fibra sin modificar la agregación de las proteínas sarcoplásmicas o miofibrilares ni las propiedades térmicas de las proteínas cárnicas.

Por otra parte, al comparar los resultados de esta sección con los del ítem 4.1 se observa que la incorporación de NaCl a las muestras antes o después de la aplicación de APH puede tener efectos muy importantes en la agregación de ciertos polipéptidos. En el ítem 4.1, el NaCl incorporado luego del tratamiento con 300 MPa solubilizó parcialmente la CPM que había sido agregada por la presión, mientras que en esta sección el NaCl incorporado antes del tratamiento APH (mismas condiciones que en el ítem 4.1) aumentó el nivel de insolubilización de la CPM. Esta diferencia probablemente se deba a las distintas estructuras de los agregados formados dentro

(a partir de proteínas que se encontraban integrando las miofibrillas) o fuera de la fibra (a partir de miofilamentos solubilizados). La incorporación de TG en combinación con NaCl y APH se presentó como una estrategia interesante que permitiría reducir la concentración de esta sal manteniendo un gel que una las partículas cárnicas y disminuya el efecto sobre el color de las hamburguesas crudas.

Por lo tanto, la combinación de los factores estudiados permitiría obtener hamburguesas con menor contenido de Sodio y propiedades tecnológicas aceptables.

4.3. Aplicación de tratamientos con APH a hamburguesas de carne bovina formuladas con aditivos convencionales y con compuestos antioxidantes

El mayor inconveniente que se presenta con la aplicación de APH en carnes rojas es la alteración del color que se produce en el rango de presiones necesario (superiores a 300 MPa) para inactivar microorganismos patógenos y alteradores (Carlez y col., 1995; Jung y col., 2003). En el rango 200-350 MPa se ha observado un aumento de la luminosidad (parámetro L^*), lo cual sería consecuencia de la desnaturalización de la globina y/o desplazamiento o pérdida del Hierro hemínico, mientras que en el rango 300-600 MPa disminuye el parámetro a^* , lo cual se debería a la oxidación de la mioglobina ferrosa a metamioglobina (Carlez y col., 1995; Jung y col., 2003).

El color es un factor importante que influye en la calidad y la aceptabilidad de la carne. El color se considera un indicador de la calidad percibida y frescura de la carne y es un factor que puede limitar la vida útil de la carne bovina fresca (Smith y col., 2000). La oxidación lipídica es otra causa importante de deterioro de la calidad de la carne y de los productos cárnicos, ya que conduce a alteración del color, sabor desagradable, y pérdida de nutrientes, todos los cuales son determinantes de la calidad de la carne (Chan y col., 1993). La oxidación de lípidos es promovida por diversos factores tales como calor, luz, iones metálicos, proteínas que contienen hemo (en la carne), nivel de Oxígeno, radicales libres y enzimas oxidativas (Barbut y col., 1985 y Buckley y col., 1989).

Una de las alternativas estudiadas para solucionar este problema es la incorporación de compuestos antioxidantes. Los antioxidantes sintéticos tales como BHT y BHA, están siendo cuestionados debido a consideraciones sobre la seguridad toxicológica. Por lo que los antioxidantes naturales son una alternativa a los antioxidantes convencionales sintéticos.

Con respecto a la incorporación de antioxidantes en productos cárnicos procesados con APH, Carlez y col. (1995) informaron que la adición de nitrito a carne picada tratada hasta 500 MPa tuvo un efecto protector contra la oxidación a la forma férrica. Sin embargo, no presentó protección contra la decoloración. Por lo que estos autores indicaron que los cambios de color que resultan del procesamiento con APH son causados por distintos mecanismos.

El extracto de romero es la principal fuente de antioxidantes naturales usados comercialmente por su efectiva capacidad antioxidante en productos cárnicos. Djenane y col. (2002) aplicaron extracto de romero sobre la superficie de filetes de carne bovina e informaron que este tratamiento fue efectivo para retrasar el deterioro oxidativo y extender la vida útil, de acuerdo con la evaluación de los atributos sensoriales. Además, Sánchez-Escalante y col. (2003^a) informaron mejoras en la inhibición de la producción de TBARS y prevención de la oxidación de la mioglobina en hamburguesas de carne bovina. El Eritorbato de Sodio ($C_6H_7NaO_6$) es un antioxidante y estabilizador del color y puede extender la vida útil; este aditivo no registra ningún efecto secundario tóxico, por lo que es posible su uso en productos cárnicos. Hui (2001) informó que la adición de Eritorbato de Sodio en carnes y productos cárnicos disminuyó la oxidación de la mioglobina y de esta manera la decoloración de la carne.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la incorporación de compuestos antioxidantes (extracto de romero, Eritorbato de Sodio) y del tratamiento con APH sobre las propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y bioquímicas y sobre la microestructura de las hamburguesas preparadas. Además, se evaluó la influencia de esos tratamientos sobre el comportamiento térmico y la caracterización molecular de las proteínas cárnicas.

Para ello se realizaron dos ensayos, cada uno con un diseño experimental específico, para evaluar distintos factores. En el primer diseño experimental los factores fueron: concentraciones de NaCl y de extracto de romero y nivel de presión; en el segundo diseño los factores fueron: concentraciones de extracto de romero y de Eritorbato de Sodio y nivel de presión. En estos ensayos se evaluó el efecto de los antioxidantes sobre la oxidación de lípidos y la capacidad antioxidante de estos compuestos en las hamburguesas, además del efecto de los tratamientos sobre los parámetros tecnológicos, fisicoquímicos, la microestructura y la caracterización molecular. A continuación, se describen los resultados de los ensayos realizados.

4.3.1 pH

En las Tablas 4.22 y 4.23 se presentan los resultados del análisis de varianza y los coeficientes de regresión estimados en cada uno de los estudios para el pH de hamburguesas crudas y cocidas.

Los valores de pH de hamburguesas crudas y cocidas (Tabla 4.22) presentaron modelos significativos ($p < 0,05$), logrando explicar el 91 y 93 % de las

respuestas observadas respectivamente. La concentración de NaCl tuvo un efecto lineal negativo, es decir que el aumento de la concentración de esta sal produjo una disminución del pH de hamburguesas crudas. A su vez, el nivel de presión presentó efectos lineal y cuadrático positivos (Tabla 4.22 y Figura 4.38). El valor de pH de hamburguesas cocidas disminuyó linealmente con la concentración de NaCl, sin ser afectado significativamente por el nivel de presión (Tabla 4.22 y Figura 4.39).

Tabla 4.22. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes al pH de hamburguesas crudas y cocidas

Términos	Hamburguesas crudas	Hamburguesas cocidas
Constante	6,347	6,392
Lineales		
NaCl	-0,023*	-0,047*
Romero	0,007	-0,017
Presión	0,020*	-0,019
Cuadráticos		
NaCl ²	-0,012	-0,015
Romero ²	-0,002	-0,005
Presión ²	0,030*	0,016
Interacciones		
NaCl x Romero	0,004	-0,006
NaCl x Presión	0,012	-0,002
Romero x Presión	0,023	-0,003
Falta de ajuste	0,119	0,468
R ²	0,907	0,934
P	<0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondiente al parámetro de pH de muestras de hamburguesas crudas y cocidas:

$$pH_{\text{crudo}} = 6,34 - 0,02 \text{ NaCl} + 0,02 \text{ Presión} + 0,03 \text{ Presión}^2$$

$$pH_{\text{cocido}} = 6,39 - 0,05 \text{ NaCl}$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % ($p < 0,05$)

NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio

Romero: Concentración de extracto de romero

Presión: Nivel de presión.

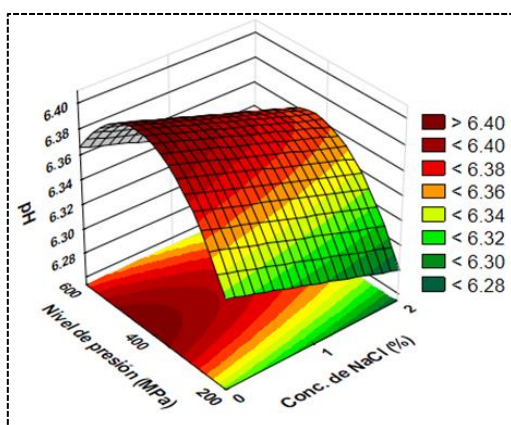


Figura 4.38. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre el pH de hamburguesas crudas.

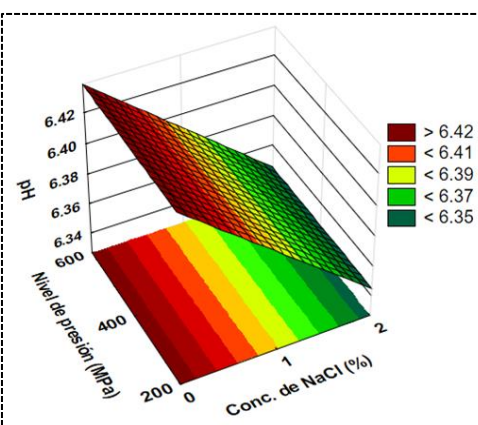


Figura 4.39. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre el pH de hamburguesas cocidas.

En la Tabla 4.23 se observa que los modelos resultaron significativos ($p < 0,05$) para los valores de pH de hamburguesas crudas y cocidas, explicando el 82 y el 90 % de las respuestas observadas, respectivamente. La concentración de extracto de romero (término cuadrático negativo) y la interacción extracto de romero x Eritorbato (término negativo) modificaron significativamente el valor de pH de las hamburguesas crudas. A su vez el nivel de presión (término cuadrático positivo) también modificó significativamente el valor de dicho parámetro (Tabla 4.23 y Figura 4.40). Cabe señalar que esos cambios se produjeron en un rango acotado de valores de pH, entre 6,35 y 6,43. En hamburguesas cocidas se observó que la concentración del extracto de romero y el nivel de presión afectaron significativamente el valor del pH (términos cuadrático negativo y positivo, respectivamente, Tabla 4.23 y Figura 4.41).

Tabla 4.23. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes al pH de hamburguesas crudas y cocidas

Términos	Hamburguesas crudas	Hamburguesas cocidas
Constante	6,381	6,367
Lineales		
Romero	0,013	-0,004
Eritorbato	0,007	-0,007
Presión	0,010	-0,003
Cuadráticos		
Romero ²	-0,015*	-0,013*
Eritorbato ²	0,000	-0,007
Presión ²	0,014*	0,009*
Interacciones		
Romero x Eritorbato	-0,025*	0,012
Romero x Presión	-0,019	-0,005
Eritorbato x Presión	0,008	0,006
Falta de ajuste	0,507	0,901
R²	0,824	0,901
P	<0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondiente al parámetro de pH de muestras de hamburguesas crudas y cocidas:

$$pH \text{ crudo} = 6,381 - 0,015 \text{ Romero}^2 + 0,014 \text{ Presión}^2 - 0,025 \text{ Romero x Eritorbato}$$

$$pH \text{ cocido} = 6,394 - 0,013 \text{ Romero}^2 + 0,010 \text{ Presión}^2$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % ($p < 0,05$)

Romero: Concentración de extracto de romero

Eritorbato: Concentración de Eritorbato de Sodio

Presión: Nivel de presión

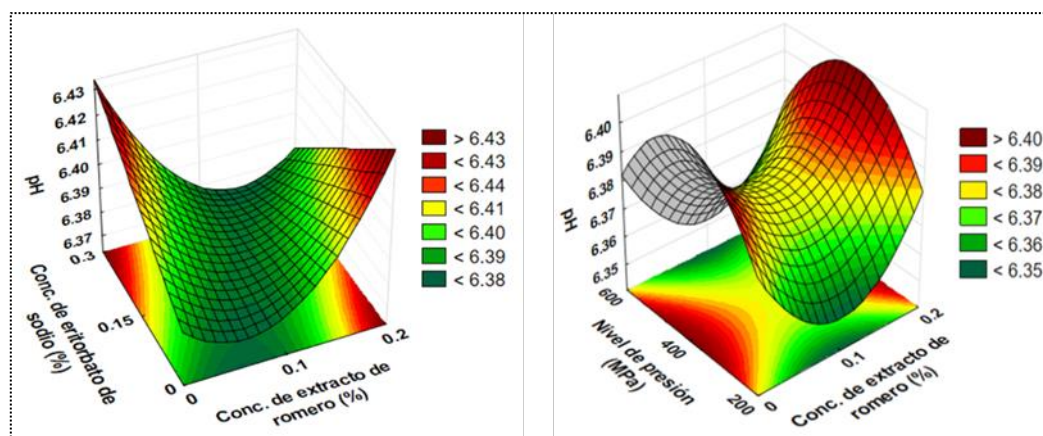


Figura 4.40. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de las concentraciones de extracto de romero y Eritorbato de Sodio sobre el pH de hamburguesas crudas.

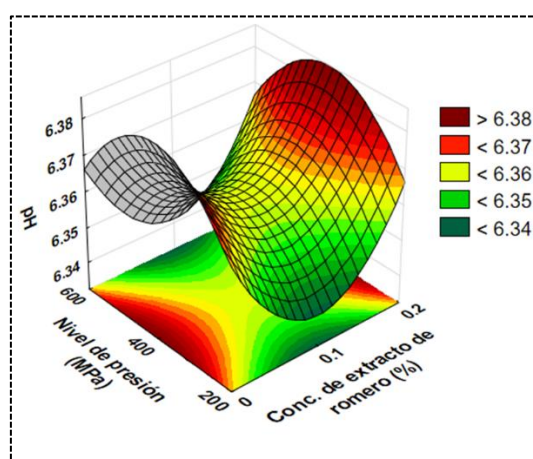


Figura 4.41. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de extracto de romero sobre el pH de hamburguesas cocidas.

La presurización modifica el pH de los alimentos, en este estudio se observó el incremento del pH por efecto del aumento del nivel de presión hasta 400 MPa, probablemente como resultado de una disminución del grado de disociación de los grupos ácidos de los aminoácidos, causada por la desnaturalización proteica (Poulter y col., 1985), como fue reportado para la desnaturalización térmica (Hamm, 1960). Este efecto del tratamiento APH sobre el pH de las hamburguesas crudas fue observado y discutido en los estudios previos (4.1 y 4.2). Por otra parte, la disminución de los valores de pH de las hamburguesas crudas por efecto del NaCl se debería a que esta sal desplaza el punto isoeléctrico de las proteínas de la carne hacia valores de pH más bajos (Hamm, 1961).

Con respecto a la adición de extracto de romero, otros autores no encontraron efecto significativo de su adición (0,1 %) sobre el pH de hamburguesas de carne bovina (Sánchez–Escalante y col., 2003). En el presente estudio el efecto cuadrático negativo podría deberse al pH del extracto de romero (2,8). La baja concentración de extracto de romero explicaría la ausencia de una disminución lineal. Por otra parte, el poder reductor del Eritorbato podría ser responsable de una reacción con algún componente del extracto de romero promoviendo la generación de especies con actividad ácido-base, lo cual resultara en un cambio en el pH de las hamburguesas.

4.3.2 Parámetros cromáticos

Las Tablas 4.24 y 4.25 presentan los resultados del análisis de varianza y los coeficientes de regresión correspondientes a los parámetros cromáticos de hamburguesas crudas y cocidas obtenidos por análisis de regresión lineal múltiple.

Tabla 4.24. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes a los parámetros cromáticos de hamburguesas crudas y cocidas

Términos	Hamburguesas crudas			Hamburguesas cocidas		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Constante	48,17	22,84	13,02	53,46	11,80	11,16
Lineales						
NaCl	-2,81*	0,53	-0,92*	-2,53*	0,20	-1,65*
Romero	-0,31	-0,08	0,04	0,32	-0,43	0,04
Presión	3,55*	-1,23*	0,28	0,20	-0,10	-0,32
Cuadráticos						
NaCl ²	-1,39*	1,61*	0,39	-1,18	0,06	-0,25
Romero ²	-0,48	0,21	0,10	-0,74	0,43	0,02
Presión ²	1,75*	0,09	-0,02	0,35	-0,51	-0,11
Interacciones						
NaCl x Romero	-0,48	-0,61	-0,42	0,22	-0,19	-0,12
NaCl x Presión	-0,21	-1,24	-1,29*	-0,49	1,11	-0,49
Romero x Presión	-0,18	-0,20	-0,080	0,53	-0,05	0,07
Falta de ajuste	0,307	0,829	0,457	0,332	0,476	0,154
R²	0,970	0,972	0,900	0,900	0,694	0,959
p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondientes a los parámetros cromáticos de hamburguesas crudas:

$$L^* = 48,02 - 2,81 \text{ NaCl} - 1,35 \text{ NaCl}^2 + 3,55 \text{ Presión} + 1,79 \text{ Presión}^2$$

$$a^* = 22,92 + 1,59 \text{ NaCl}^2 - 1,23 \text{ Presión}$$

$$b^* = 13,15 - 0,92 \text{ NaCl} - 1,29 \text{ NaCl} \times \text{Presión}$$

Ecuaciones reducidas correspondientes a los parámetros cromáticos de hamburguesas cocidas:

$$L^* = 53,04 - 2,53 \text{ NaCl}$$

$$b^* = 11,06 - 1,64 \text{ NaCl}$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % (p<0,05)

NaCl: Concentración Cloruro de Sodio

Romero: Concentración de extracto de romero

Presión: Nivel de presión

En cuanto a los parámetros cromáticos de hamburguesas crudas (Tabla 4.24), se observa que el modelo fue significativo para L^* ($p < 0,05$) y logró describir el 97 % de las respuestas observadas. El aumento de la concentración de NaCl modificó significativamente (términos lineal y cuadrático negativos) los valores de L^* de las hamburguesas. También el aumento del nivel de presión modificó significativamente (términos lineal y cuadrático) el valor de L^* . Para este parámetro el efecto más importante fue el correspondiente al nivel de presión que presentó el coeficiente de regresión de mayor valor (Tabla 4.24 y Figura 4.42).

Con relación al parámetro a^* de hamburguesas crudas, se observó que el modelo fue significativo ($p < 0,05$) y que describió el 97 % de las respuestas observadas. El nivel de presión tuvo un efecto lineal negativo, es decir que un incremento del nivel de presión disminuyó significativamente el valor del parámetro a^* , mientras que la concentración de NaCl presentó un efecto cuadrático positivo (Tabla 4.24 y Figura 4.43).

En cuanto al parámetro b^* de hamburguesas crudas, el modelo también fue significativo y describió el 90 % de las respuestas observadas; tanto la concentración de NaCl (término lineal) como la interacción NaCl x Presión modificaron el valor de b^* (Tabla 4.24 y Figura 4.44).

Con respecto a los parámetros cromáticos de hamburguesas cocidas, el modelo fue significativo ($P < 0,05$) para los parámetros L^* y b^* , describiendo el 90 y el 96 % de las respuestas observadas respectivamente. Los valores de esos parámetros disminuyeron significativamente con el incremento de la concentración del NaCl (términos lineales negativos en ambos casos), según se indica en Tabla 4.24 y Figuras 4.45 y 4.46.

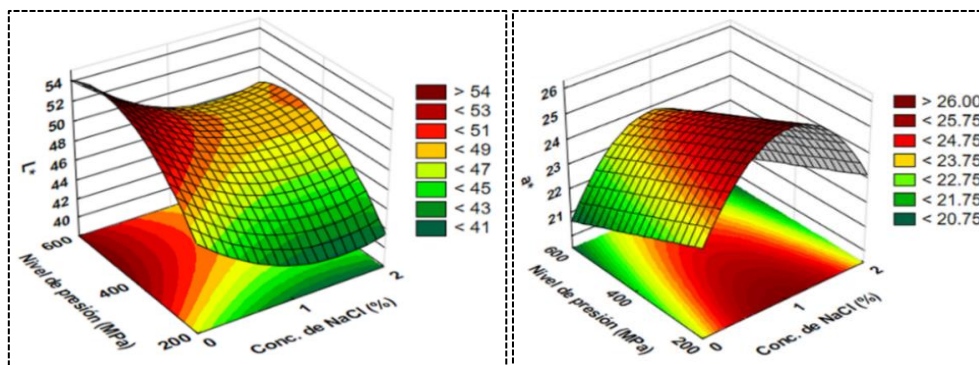


Figura 4.42. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre el parámetro L^* de hamburguesas crudas.

Figura 4.43. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre el parámetro a^* de hamburguesas crudas.

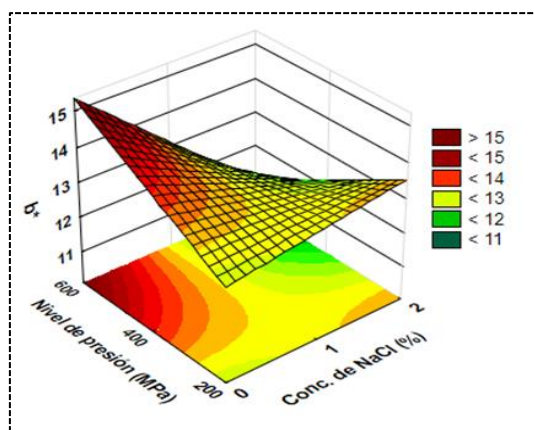


Figura 4.44. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre el parámetro b^* de hamburguesas crudas.

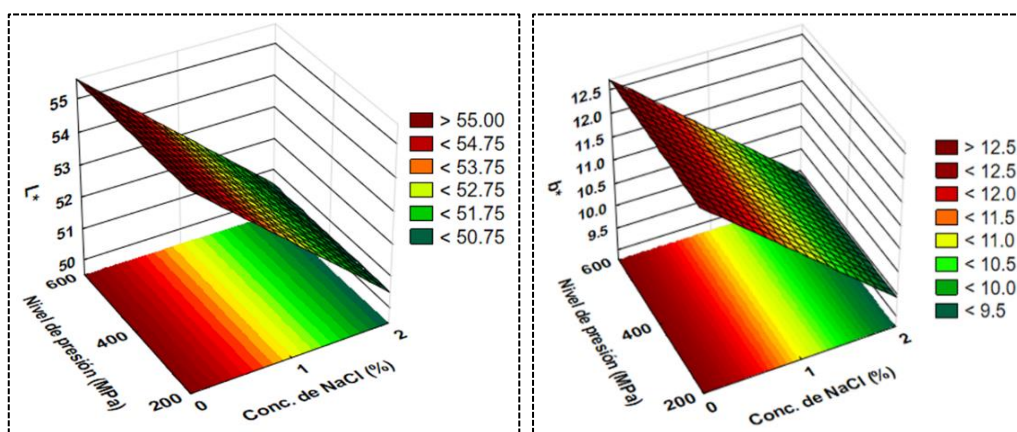


Figura 4.45. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre el parámetro L^* de hamburguesas cocidas.

Figura 4.46. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre el parámetro b^* de hamburguesas cocidas.

En la Tabla 4.25 se observa que el parámetro L^* presentó un modelo significativo ($p < 0,05$), el cual explicó el 97 % de las respuestas observadas. Este parámetro disminuyó significativamente por efecto del aumento de la concentración de Eritorbato de Sodio (término lineal negativo), mientras que se modificó significativamente con el aumento del nivel de presión (término lineal y cuadrático positivo). Además, la adición del extracto de romero tuvo un efecto cuadrático significativo (Figuras 4.47 y 4.48).

El parámetro a^* presentó un modelo significativo ($p < 0,05$), el cual logró explicar el 92 % de las respuestas observadas. Este parámetro se modificó significativamente con el incremento del nivel de presión (términos lineal y cuadrático negativos). La concentración de Eritorbato de Sodio tuvo efecto cuadrático significativo

($p < 0,05$) mientras que el extracto de romero no tuvo efecto significativo sobre el parámetro a^* (Figura 4.49).

El parámetro b^* presentó un modelo significativo ($p < 0,05$), que explicó el 99 % de las respuestas observadas. El incremento del nivel de presión modificó (términos lineal y cuadrático negativos) el parámetro b^* . A su vez la interacción concentración de extracto de Romero x Nivel de Presión (termino positivo) también modificó significativamente el valor de este parámetro. La concentración de Eritorbato de Sodio no tuvo efecto significativo sobre el parámetro b^* (Figura 4.50).

Tabla 4.25. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes a los parámetros cromáticos de hamburguesas crudas y cocidas

Términos	Hamburguesas crudas			Hamburguesas cocidas		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Constantes	48,27	22,69	12,26	53,26	10,39	10,53
Lineales						
Romero	-0,50	-0,31	0,02	-0,85	-0,16	0,07
Eritorbato	-0,73*	-1,24	-0,39	0,93	0,04	0,10
Presión	1,13*	-2,90*	-1,79*	-0,78	-0,13	-0,07
Cuadráticos						
Romero ²	-0,79*	-0,87	-0,23	-0,38	-0,30	-0,09
Eritorbato ²	0,18	-1,28*	-0,30	-0,29	-0,22	0,25
Presión ²	0,86*	-1,27*	-1,20*	0,17	-0,53	0,23
Interacciones						
Romero x Eritorbato	0,34	-0,92	-0,03	-0,22	0,15	-0,10
Romero x Presión	-0,38	0,26	0,58*	0,14	0,11	0,03
Eritorbato x Presión	-0,09	-0,18	-0,37	-0,32	0,58	-0,32
Falta de ajuste	0,268	0,177	0,276	0,826	0,867	0,397
R²	0,968	0,918	0,986	0,868	0,839	0,847
p	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Ecuaciones reducidas correspondiente a los parámetros cromáticos de hamburguesas crudas:

$$L^* = 48,33 - 0,74 \text{ Eritorbato} - 0,79 \text{ Romero}^2 + 1,13 \text{ Presión} + 0,85 \text{ Presión}^2$$

$$a^* = 22,42 - 2,90 \text{ Presión} - 1,21 \text{ Presión}^2 - 1,21 \text{ Eritorbato}^2$$

$$b^* = 12,11 - 1,79 \text{ Presión} - 1,16 \text{ Presión}^2 + 0,58 \text{ Romero} \times \text{Presión}$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % ($p < 0,05$)

Romero: Concentración de extracto de romero

Eritorbato: Concentración de Eritorbato de Sodio

Presión: Nivel de presión

Los parámetros L^* , a^* y b^* de las hamburguesas cocidas no presentaron modelos significativos ($p > 0,05$).

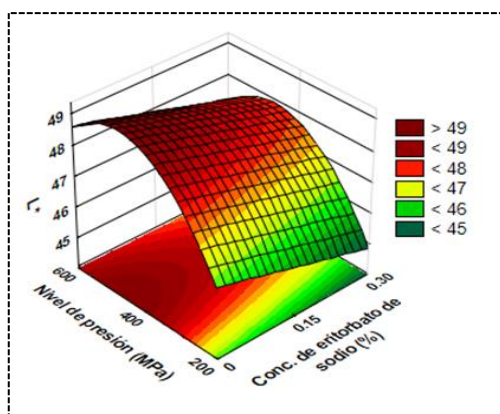


Figura 4.47. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de Eritorbato de Sodio sobre el parámetro L^* de hamburguesas crudas (para una concentración de 0,1 % de extracto de romero).

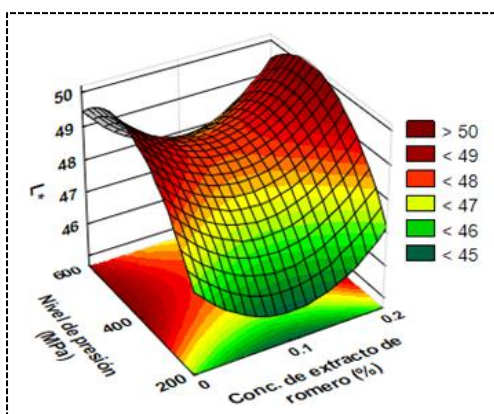


Figura 4.48. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de extracto de romero sobre el parámetro L^* de hamburguesas crudas (para una concentración de 0,15 % de Eritorbato de Sodio).

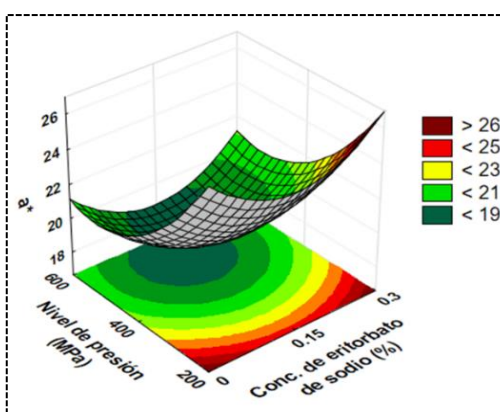


Figura 4.49. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de Eritorbato de Sodio sobre el parámetro a^* de hamburguesas crudas.

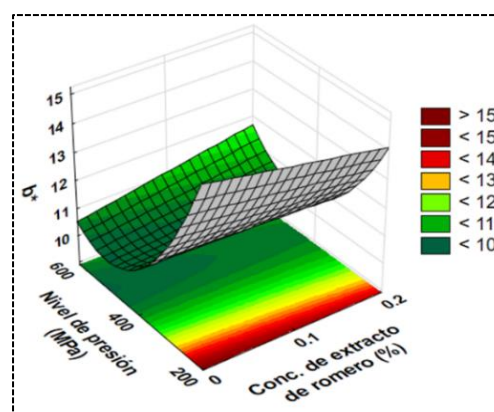


Figura 4.50. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de extracto de romero sobre el parámetro b^* de hamburguesas crudas.

Bolumar y col. (2014) propusieron tres mecanismos para interpretar los cambios de color inducidos por el incremento de la presión: (1) desnaturalización de la mioglobina, (2) modificación o alteración del anillo de porfirina y (3) química redox de la mioglobina, incluida la actividad redox enzimática, que puede afectar el inicio de la oxidación de los lípidos.

Los efectos sobre la luminosidad observados en el presente trabajo también fueron informados por estudios previos, correspondientes al tratamiento con APH de carne y productos cárnicos, a presiones superiores a 200 MPa. Así, Carlez y col.,

(1995) (carne bovina picada); Sikes y col., (2009) (salchichas de carne bovina); Ferrari y col., (2012) (hamburguesas de carne bovina); Szerman y col., (2011) (hamburguesas de carne bovina); McArdle y col., (2011) (carne bovina), informaron incrementos significativos de la luminosidad a partir de los 200 MPa. Carlez y col. (1995) indicaron que la decoloración (aumento de luminosidad) de la carne tratada con APH podría ser inducida por la desnaturalización de globina, desplazamiento y/o liberación de hemo y oxidación de oximioglobina a metamioglobina durante el procesamiento tratamiento con APH. A su vez, otros autores propusieron que el aumento de luminosidad se debería a la modificación de la conformación o coagulación de las proteínas miofibrilares (Jung y col., 2003) o a la ruptura del anillo porfirínico (Goutefongea y col., 1995). Además, Hughes y col. (2014) sugirieron que los cambios en la luminosidad de la carne tratada con APH se deberían a los efectos del tratamiento sobre la microestructura del tejido cárnico, como cambios en el empaquetamiento de las miofibrillas, alteraciones en la refracción del sarcoplasma, reducción del diámetro de las fibras musculares y cambios en las propiedades de dispersión de luz en la carne. Jung y col. (2003) informaron la disminución gradual del parámetro a^* con el incremento de la oxidación de mioglobina a metamioglobina por efecto de la presurización. Marcos y col. (2010) informaron incrementos en los valores de b^* de carne bovina tratada con APH, estos autores mencionaron que este efecto estaría relacionado con oxidación de mioglobina ferrosa a metamioglobina férrica. En general, el incremento de la presión hasta 400 MPa generó importantes cambios de color, mientras que por encima de este nivel (600 MPa) los cambios fueron mínimos en comparación a 400 MPa.

Con respecto a la adición de NaCl, las hamburguesas presentaron menores valores de luminosidad con la incorporación de esta sal. Serdaroglu y col. (2008) observaron similar efecto en pastas de carne cruda y Sikes y col. (2009) informaron que los valores L^* de salchichas de carne bovina aumentaron cuando la concentración de NaCl disminuyó del 2 al 0 %, independientemente del nivel de presión aplicado. Szerman y col. (2011) también observaron un aumento en los valores de la luminosidad de hamburguesas de carne bovina cuando la concentración de NaCl disminuyó de 2 a 0 %; y cuando el nivel de presión aumentó de 100 a 300 MPa. El efecto de NaCl sobre el parámetro L^* se relacionó con el incremento de la retención de agua debido al aumento de la fuerza iónica y una menor reflexión de la luz en la superficie de la carne, por lo que la misma resultaría más oscura.

En el presente trabajo la incorporación de Eritorbato de Sodio contrarrestó el incremento de la luminosidad de las hamburguesas producido por el tratamiento con APH. Este efecto fue esperado también con la incorporación de extracto de romero, sin embargo, no se observó claramente, debido a que hasta una concentración de extracto de romero de 0,1 % el parámetro L^* disminuyó y a mayor concentración de ese compuesto (hasta 0,2 %) el parámetro aumentó. Para los parámetros a^* y b^* el efecto principal fue del nivel de presión, mientras que el Eritorbato de Sodio y extracto de romero el efecto fue menor. Hui (2001) indicó que el Eritorbato de Sodio mejoró y mantuvo el color de los productos cárnicos. En un trabajo realizado en carne picada (15 % de grasa), sin tratar con APH, se informó que el Eritorbato Sódico (0,1 %) en combinación con Citrato Sódico (0,5 %) y extracto romero (0,2 %) fueron eficaces en la estabilización del color y del grado de oxidación de los lípidos (Lee y col., 2005).

4.3.3 Parámetros de textura

En las Tablas 4.26 y 4.27 se presentan los resultados del análisis de varianza y los coeficientes de regresión de los parámetros dureza, elasticidad, cohesividad y masticabilidad de hamburguesas de carne bovina cocidas.

Los parámetros de dureza y masticabilidad (Tabla 4.26) mostraron modelos significativos ($p < 0,05$), los cuales describieron el 96 y 95 % de las respuestas observadas, respectivamente. Tanto la dureza como la masticabilidad fueron afectadas por la concentración de NaCl (términos lineal negativo y cuadrático positivo), el nivel de presión (término lineal positivo) y la interacción concentración de NaCl x Nivel de Presión (término negativo). En las Figuras 4.51 y 4.52 se observa que los mayores valores de dureza y masticabilidad correspondieron a valores intermedios de la concentración de NaCl y al mayor nivel de presión evaluado. Ello se debió al aporte de los términos cuadráticos de la concentración de NaCl y a la interacción de la concentración de NaCl x Nivel de Presión, a la vez de la influencia de los términos lineales de la concentración de NaCl y del Nivel de Presión.

Tabla 4.26. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes a los parámetros de textura de hamburguesas cocidas

Términos	Dureza (N)	Elasticidad	Cohesividad	Masticabilidad (N)
Constante	22,03	0,771	0,630	10,70
Lineales				
NaCl	-2,85*	0,002	0,023	-0,89*
Romero	0,75	0,006	0,002	0,48
Presión	1,59*	0,002	-0,005	0,65*
Cuadráticos				
NaCl ²	1,24*	0,007	0,023	1,03*
Romero ²	0,64	-0,008	0,000	0,06
Presión ²	-0,61	0,001	0,010	-0,21
Interacciones				
NaCl x Romero	-1,06	0,010	-0,015	-0,67
NaCl x Presión	-3,25*	-0,010	0,000	-1,48*
Romero x Presión	-0,72	-0,002	-0,017	-0,68
Falta de ajuste	0,296	0,128	0,539	0,198
R²	0,957	0,641	0,815	0,950
p	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondiente a los parámetros de textura:

$$Dureza = 22,04 - 2,85 NaCl + 1,24 NaCl^2 + 1,59 Presión - 3,25 NaCl \times Presión$$

$$Masticabilidad = 10,65 - 0,89 NaCl + 1,04 NaCl^2 + 0,65 Presión - 1,48 NaCl \times Presión$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % ($p < 0,05$)

NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio

Romero: Concentración de extracto de romero

Presión: Nivel de presión

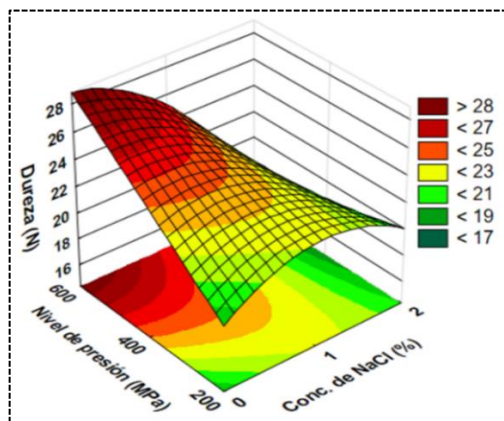


Figura 4.51. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre la dureza de hamburguesas cocidas.

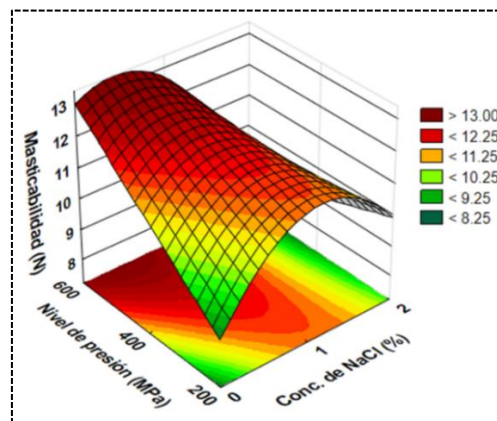


Figura 4.52. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre la masticabilidad de hamburguesas cocidas.

A su vez, en el estudio con Eritorbato de Sodio, el parámetro de dureza (Tabla 4.27) presentó un modelo significativo que describió el 79 % de las respuestas observadas. La elasticidad presentó también un modelo significativo que logró describir el 89 % de las respuestas observadas, además la masticabilidad presentó un modelo que describió el 80 %. El parámetro dureza fue afectado significativamente por el nivel de presión (término cuadrático positivo) y la elasticidad fue afectada

significativamente por la concentración de Eritorbato de Sodio (término cuadrático positivo). El parámetro masticabilidad fue afectado significativamente por el nivel de presión (término cuadrático positivo).

Tabla 4.27. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes a los parámetros de textura de hamburguesas cocidas

Términos	Dureza (N)	Elasticidad	Cohesividad	Masticabilidad (N)
Constante	21,51	0,790	0,647	11,64
Lineales				
Romero	0,17	0,001	0,012	0,07
Eritorbato	0,03	0,001	-0,002	0,02
Presión	-0,31	0,008	0,004	-0,27
Cuadráticos				
Romero ²	0,31	-0,001	-0,002	0,19
Eritorbato ²	0,16	0,014*	0,000	-0,19
Presión ²	1,88*	0,003	0,006	0,76*
Interacciones				
Romero x Eritorbato	-0,42	-0,005	-0,006	0,34
Romero x Presión	0,64	-0,006	-0,005	-0,06
Eritorbato x Presión	0,38	0,000	0,017	0,20
Falta de ajuste	0,205	0,185	0,381	0,166
R²	0,792	0,891	0,816	0,804
p	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondiente a los parámetros de textura:

$$Dureza = 21,64 + 1,85 Presión^2$$

$$Elasticidad = 0,79 + 0,01 Eritorbato^2$$

$$Masticabilidad = 11,64 + 0,76 Presión^2$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % (p<0,05)

Romero: Concentración de extracto de romero

Eritorbato: Concentración de Eritorbato de Sodio

Presión: Nivel de presión

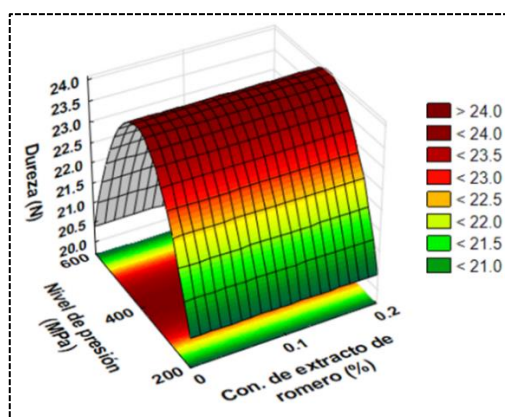


Figura 4.53. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de extracto de romero sobre el parámetro dureza de hamburguesas cocidas.

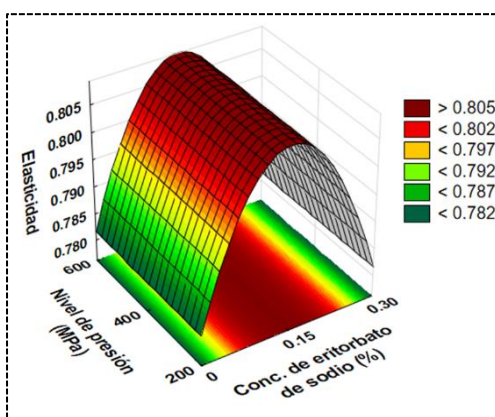


Figura 4.54. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de Eritorbato de Sodio sobre la elasticidad de hamburguesas cocidas.

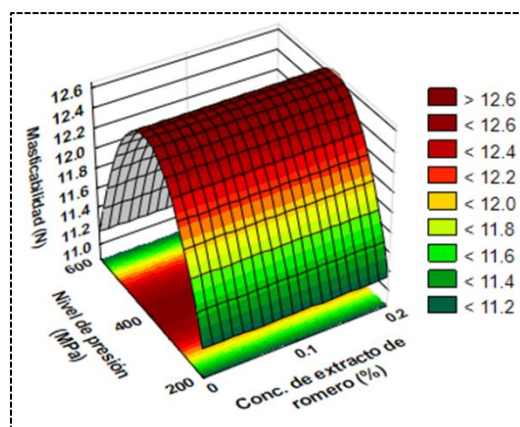


Figura 4.55. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de extracto de romero sobre la masticabilidad de hamburguesas cocidas.

En las Figuras 4.53 y 4.55 se observa que los mayores valores de dureza y masticabilidad correspondieron a valores intermedios del nivel de presión. A su vez, en la Figura 4.54 se observa que los mayores valores de elasticidad se obtuvieron a valores intermedios de la concentración de Eritorbato de Sodio. Cabe destacar que en este estudio el rango de valores de los parámetros de textura fue más acotado que en el estudio previo, en el cual además del nivel de presión y de la concentración de extracto de romero se modificó la concentración de NaCl, que en este ensayo fue constante e igual a 1,5 %. La modificación de los parámetros de textura de las hamburguesas cocidas está en estrecha relación con los cambios en su microestructura, la cual depende de la unión o interacción entre las partículas de carne. Las proteínas miofibrilares tienen un importante rol, debido a que los cambios en su conformación y funcionalidad influyen sobre esa interacción (Szerman y col., 2011). Las altas presiones hidrostáticas modifican la conformación de las proteínas miofibrilares, a la vez que incrementan su agregación a través de enlaces disulfuro e interacciones hidrofóbicas (Jiménez-Colmenero y col. 1997; Speroni y col., 2014). Debido a ello, generalmente los parámetros de textura correspondientes a emulsiones y pastas cárnicas tratadas con APH son mayores que los correspondientes a los sistemas sin presurizar, este efecto estaría en estrecha relación con los aditivos añadidos.

Sikes y col. (2009), Ferrari y col. (2012), Villamonte y col. (2013) informaron que la aplicación de APH aumentó los valores de dureza de salchichas y hamburguesas de carne bovina y pasta de carne de cerdo respectivamente. Villamonte y col. (2013) informaron que la aplicación de un tratamiento a 350 MPa incrementó la dureza de pastas de carne de cerdo. Estos autores asociaron ese efecto

de endurecimiento a la desnaturalización y agregación de las proteínas miofibrilares y a la formación de un gel de proteínas. Sikes y col. (2009) evaluaron el efecto de tratamientos con APH sobre salchichas de carne bovina e informaron un incremento de la dureza a 200 MPa, mientras que a 400 MPa los valores de dureza disminuyeron significativamente.

En relación con la incorporación de sales, Sikes y col. (2009) informaron que la incorporación de 2 % NaCl en salchichas de carne bovina incrementó los valores de dureza. A diferencia de lo informado por estos autores, nuestros resultados muestran que los mayores valores de dureza en las hamburguesas cocidas se observaron para valores intermedios de concentración de NaCl (1 %) mientras que a 2 % la dureza disminuyó. Esto se debería a que a valores intermedios el efecto predominante sería el de extracción de proteínas miofibrilares que formarían un gel, mientras que, a alta concentración de NaCl, el mayor incremento de la retención de agua determinaría el ablandamiento de las hamburguesas. Villamonte y col. (2013) no observaron efecto significativo en pastas preparadas con carne de cerdo con la adición de NaCl y polifosfatos, pero estos autores observaron la disminución de los valores de dureza cuando las pastas fueron adicionadas con las sales y tratadas con APH.

El incremento de los parámetros de dureza y masticabilidad observados en el presente trabajo se debería al incremento de la solubilización y la desnaturalización de las proteínas provocadas por efecto de la incorporación de los aditivos (principalmente el NaCl) a las menores concentraciones en la elaboración de las hamburguesas y el posterior tratamiento de estas con APH, ambos tendrían un efecto sinérgico en la unión de las partículas cárnicas.

4.3.4 Esfuerzo y trabajo de corte

En la Tabla 4.28 se presentan los resultados del análisis de varianza y los coeficientes de regresión estimados para los parámetros esfuerzo de corte (N/g) y trabajo de corte (mJ/g) de hamburguesas cocidas.

Para los parámetros esfuerzo al corte (EC) y trabajo de corte (TC) el modelo fue significativo ($p < 0,05$) y logró describir el 92 y el 94 % de las respuestas observadas, respectivamente. El nivel de presión (términos lineales positivos) y la concentración de NaCl (términos cuadráticos positivos), modificaron significativamente ($p < 0,05$) los valores de EC y TC.

Tabla 4.28. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes a los parámetros de esfuerzo de corte y trabajo de corte de hamburguesas cocidas

Términos	Esfuerzo de corte (N/g)	Trabajo de corte (mJ/g)
Constantes	31,10	0,079
Lineales		
NaCl	-1,19	-0,003
Romero	0,53	0,005
Presión	2,46*	0,007*
Cuadráticos		
NaCl ²	3,83*	0,012*
Romero ²	-0,06	0,002
Presión ²	-1,13	0,001
Interacciones		
NaCl x Romero	2,38	0,000
NaCl x Presión	0,42	0,000
Romero x Presión	0,03	0,000
Falta de ajuste	0,23	0,290
R²	0,92	0,940
p	<0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondiente a los parámetros de esfuerzo de corte y trabajo de corte:

$$EC = 30,76 + 2,46 \text{ Presión} + 3,91 \text{ NaCl}^2$$

$$TC = 0,080 + 0,007 \text{ Presión} + 0,012 \text{ NaCl}^2$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % (p<0,05)

EC: esfuerzo de corte

TC: trabajo de corte

NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio

Romero: Concentración de extracto de romero

Presión: Nivel de presión

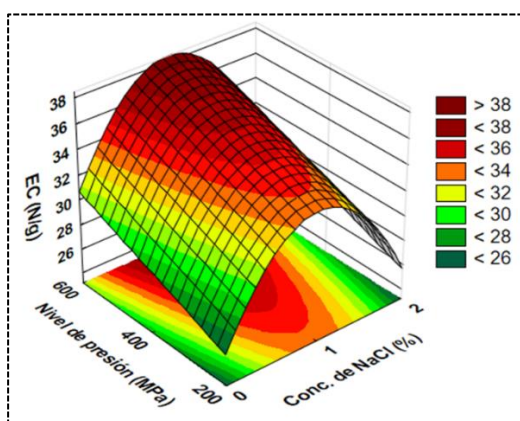


Figura 4.56. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre el esfuerzo de corte de hamburguesas cocidas.

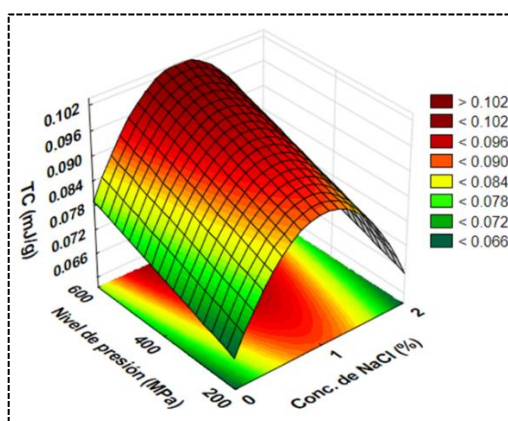


Figura 4.57. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre el trabajo de corte de hamburguesas cocidas.

En las Figuras 4.56 y 4.57 se observa que los mayores valores de EC y TC correspondieron a valores intermedios de la concentración de NaCl y al mayor nivel de presión evaluado.

En el caso de los parámetros EC y TC correspondientes al estudio con Eritorbato de Sodio (Tabla 4.29), los modelos fueron significativos ($p < 0,05$) y explicaron el 91 y 92 % de las respuestas observadas, respetivamente. Los valores de estos parámetros fueron afectados significativamente ($p < 0,05$) por efecto cuadrático positivo del nivel de presión.

Tabla 4.29. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes a los parámetros de esfuerzo de corte y trabajo de corte de hamburguesas cocidas

Parámetros	Esfuerzo de corte (N/g)	Trabajo de corte (mJ/g)
Constantes	29,56	0,082
Lineales		
Romero	2,08	0,003
eritorbato	-0,04	-0,002
Presión	-1,87	-0,002
Cuadráticos		
Romero ²	2,06	0,014
Eritorbato ²	1,19	0,008
Presión ²	4,58*	0,018*
Interacciones		
Romero x Eritorbato	-2,61	-0,003
Romero x Presión	2,64	0,007
Eritorbato x Presión	0,06	0,003
Falta de ajuste	0,255	0,711
R²	0,911	0,916
p	<0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondiente a los parámetros de esfuerzo de corte y trabajo de corte:

$$EC = 30,48 + 4,35 \text{ Presión}^2$$

$$TC = 0,088 + 0,017 \text{ Presión}^2$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % ($p < 0,05$)

Romero: Concentración de extracto de romero

Eritorbato: Concentración de Eritorbato de Sodio

Presión: Nivel de presión

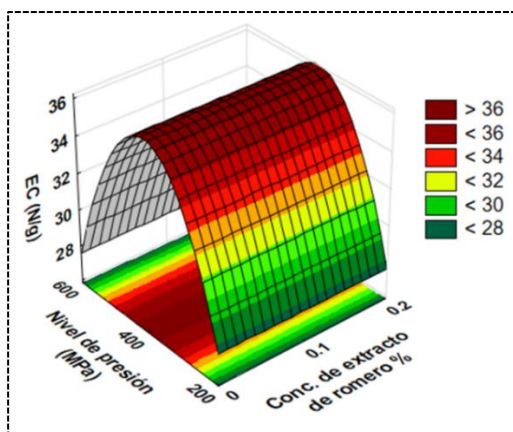


Figura 4.58. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de extracto de romero sobre el esfuerzo de corte de hamburguesas cocidas.

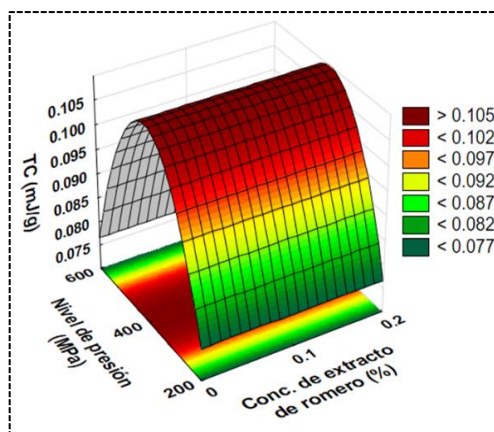


Figura 4.59. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de extracto de romero sobre el trabajo de corte de hamburguesas cocidas.

Szerman y col. (2011) observaron que el esfuerzo de corte y el trabajo de corte de hamburguesas de carne bovina tratadas con APH disminuyeron significativamente al aumentar las concentraciones de NaCl hasta 2 % y de TPFS hasta 0,5 %. A su vez, estos autores informaron que el esfuerzo de corte incrementó significativamente en las muestras tratadas a 300 MPa. A su vez, Carballo y col. (1996) evaluaron la textura de hamburguesas de carne bovina mediante celda de Kramer y observaron que los valores de esfuerzo de corte incrementaron significativamente con el tratamiento a 300 MPa.

En el presente trabajo se observaron efectos similares del nivel de presión y de la concentración de NaCl para los parámetros dureza, masticabilidad, EC y TC (Figuras 4.49, 4.50, 4.54 y 4.55). El efecto del nivel de presión fue similar al informado por otros autores (Szerman y col., 2011 y Carballo y col., 1996). Con relación a la concentración de NaCl, los mayores valores de los parámetros se observaron a concentraciones próximas a 1 %, Sin embargo, debido a la combinación con la aplicación de APH, los mayores valores de los parámetros se observaron a la mayor presión de trabajo. Estos resultados son similares a los informados por Sikes y col. (2009) quienes informaron la disminución del esfuerzo de corte en pastas de carne tratadas con APH, cuando se incorporó NaCl a una concentración superior al 1 %, El incremento de los parámetros de textura hasta 1 % se podría deber al aumento de la fuerza iónica como consecuencia del aumento de la concentración de NaCl. Es importante resaltar que en este trabajo todas las hamburguesas se elaboraron con 0,5 % TPFS, además de los otros aditivos que formaron parte del diseño experimental. La presencia de TPFS y el incremento de concentraciones de NaCl provocaron una mayor solubilización de las proteínas miofibrilares formando así un producto más resistente. Ello se debería a una mayor interacción entre las partículas cárnicas como consecuencia de una mayor disponibilidad de proteínas miofibrilares solubles. La reducción de los parámetros de textura observados a concentraciones mayores a 1 % podría deberse al aumento de la hidratación de las proteínas miofibrilares debido al incremento de la fuerza iónica de la pasta de carne. A su vez el mayor efecto observado a las presiones más altas podría deberse a la influencia del tratamiento sobre la conformación de las proteínas miofibrilares, lo cual induciría un incremento de la interacción entre proteínas y en consecuencia un aumento de la unión entre las partículas cárnicas (Macfarlane y col. (1984). Hong y col. (2006) observaron que la fuerza de unión entre partículas de carne incrementó cuando el nivel de presión y el tiempo de mantenimiento de la presión aumentaron.

4.3.5 Pérdida de peso por cocción y humedad expresable

En la Tabla 4.30 se presentan el análisis de varianza y los coeficientes de regresión estimados para los parámetros humedad expresable (HE) y pérdida de peso por cocción (PPC) de hamburguesas. Los modelos de regresión fueron significativos ($p < 0,05$) para ambos parámetros y lograron explicar el 90 y 98 % de las respuestas observadas, respectivamente.

Tabla 4.30. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes a los parámetros humedad expresable (HE) y pérdida de peso por cocción (PPC) de hamburguesas

Términos	HE (%)	PPC (%)
Constantes	18,40	31,53
Lineales		
NaCl	3,05*	-8,58*
Romero	0,10	-0,79
Presión	-2,10*	4,15*
Cuadráticos		
NaCl ²	-2,20*	-0,33
Romero ²	-0,17	-0,24
Presión ²	-1,08	1,86
Interacciones		
NaCl x Romero	2,05	-1,01
NaCl x Presión	-0,17	1,02
Romero x Presión	-1,08	0,55
Falta de ajuste	0,117	0,601
R²	0,898	0,981
p	<0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondiente a los parámetros de humedad expresable y pérdida de peso por cocción:
 $HE = 18,05 + 3,05 NaCl - 2,12 NaCl^2 - 2,10 Presión$
 $PPC = 31,89 - 8,58 NaCl + 4,15 Presión$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % ($p < 0,05$)
NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio
Romero: Concentración de extracto de romero
Presión: Nivel de presión

La concentración de NaCl y el nivel de presión afectaron significativamente ($p < 0,05$) ambos parámetros. La concentración de NaCl afectó de manera lineal (coeficiente positivo) y cuadrática (coeficiente negativo) el parámetro HE, además el nivel presión afectó de forma lineal (coeficiente negativo) a ese parámetro. El parámetro PPC fue afectado de manera lineal (coeficiente negativo) por la concentración de NaCl, mientras que el nivel de presión tuvo un efecto lineal positivo.

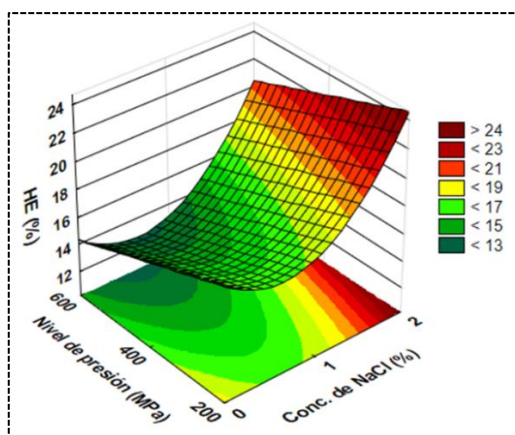


Figura 4.60. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre la humedad expresable de hamburguesas cocidas.

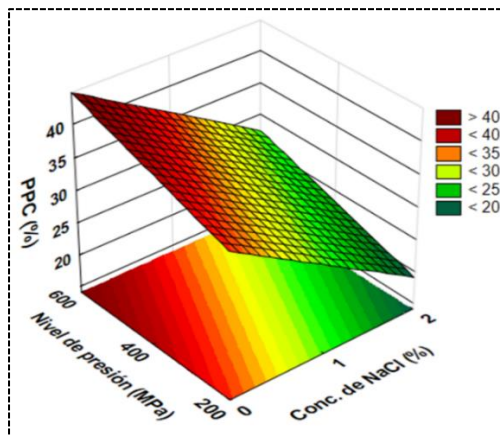


Figura 4.61. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre la pérdida de peso por cocción de hamburguesas.

En las Figuras 4.60 y 4.61 se presentan las gráficas de superficie de respuesta de los efectos de la concentración de NaCl y del nivel de presión sobre los parámetros HE y PPC. Observando los signos de los coeficientes de los términos que resultaron significativos en la Tabla 4.30 y también las tendencias que presentan las superficies de respuesta de las Figuras 4.60 y 4.61 se concluye que el efecto de los factores nivel de presión y concentración de NaCl sobre HE y PPC fueron inversos. Estas tendencias opuestas se explican debido a que un mayor valor de PPC determina una menor cantidad de agua en las muestras cocidas para ser extraída en la etapa de centrifugación, la cual se aplica en la determinación del parámetro HE.

En la Tabla 4.31 se presentan los coeficientes de regresión estimados para los parámetros (HE y PPC correspondientes a las hamburguesas en los estudios con Eritorbato de Sodio). Los modelos para ambos parámetros fueron significativos ($p < 0,05$) y lograron explicar el 96 y 97 % de las respuestas observadas. El nivel presión tuvo un efecto lineal y cuadrático (ambos coeficientes negativos) sobre la HE. A su vez, el nivel de presión (términos lineal y cuadrático ambos coeficientes positivos) y la concentración de Eritorbato de Sodio (término cuadrático negativo) tuvieron efectos significativos sobre la PPC.

Tabla 4.31. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes a los parámetros de humedad expresable (HE) y pérdida de peso por cocción (PPC) de hamburguesas

Parámetros	HE (%)	PPC (%)
Constantes	14,96	29,90
Lineales		
Romero	-0,35	0,27
Eritorbato	-0,18	-1,11
Presión	-2,07*	5,82*
Cuadráticos		
Romero ²	-0,26	-0,55
Eritorbato ²	0,42	-1,52*
Presión ²	-0,66*	2,60*
Interacciones		
Romero x Eritorbato	-0,29	0,81
Romero x Presión	0,56	0,31
Eritorbato x Presión	0,12	1,19
Falta de ajuste	0,413	0,139
R²	0,959	0,970
p	<0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondiente a los parámetros de humedad expresable y pérdida de peso por cocción:

$$HE = 15,01 - 2,07 \text{ Presión} - 0,67 \text{ Presión}^2$$

$$PPC = 29,73 + 5,82 \text{ Presión} + 2,64 \text{ Presión}^2 - 1,48 \text{ Eritorbato}^2$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % ($p < 0,05$)

Romero: Concentración de romero

Eritorbato: Concentración de Eritorbato de Sodio

Presión: Nivel de presión

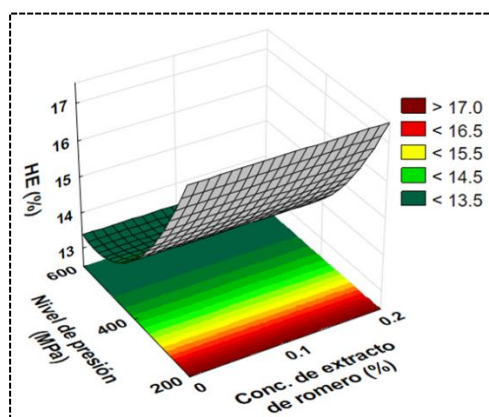


Figura 4.62. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de extracto de romero sobre la humedad expresable de hamburguesas cocidas.

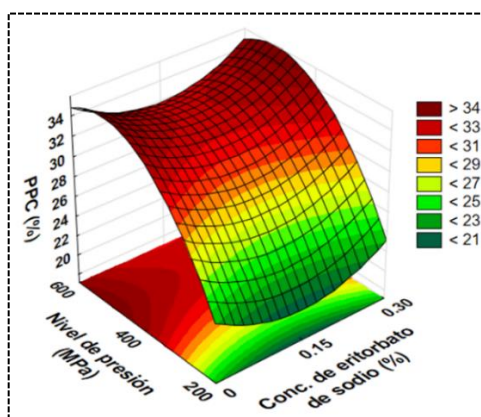


Figura 4.63. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de Eritorbato de Sodio sobre la pérdida de peso por cocción de hamburguesas.

En las Figuras 4.62 y 4.63 se presentan las gráficas de superficie de respuesta de los efectos del nivel de presión y de la concentración extracto de romero y concentración de Eritorbato de Sodio sobre los parámetros HE y PPC, respectivamente. En estas figuras, como en las Figuras 4.60 y 4.61, se observan tendencias opuestas en el efecto del nivel de presión sobre HE y PPC.

El efecto de la incorporación de sales (NaCl y TFPS) en combinación con el tratamiento con APH a emulsiones y pastas cárnicas ha sido informado por varios autores (Macfarlane y col., 1984; Iwasaki y col., 2006; Szerman y col., 2011; Villamonte y col., 2013).

Macfarlane y col. (1984) informaron menores valores de PPC en hamburguesas de carne bovina tratadas a 100 ó 150 MPa para concentraciones de 1 y 3 % NaCl. Szerman y col. (2011) informaron un efecto combinado de NaCl (0 - 2 %) y TPFS (0 - 0,5 %) en la reducción de la PPC de hamburguesas de carne bovina tratadas a 200 MPa. También Villamonte y col. (2013) observaron un efecto sinérgico de NaCl y TPFS sobre la capacidad de unión del agua de pastas de carne porcina, potenciado por el tratamiento con APH. Estos autores observaron los menores valores de PPC en pastas cárnicas tratadas a 350 MPa, con 3 % NaCl o con 1,5 % NaCl y 0,25 % Polifosfato.

En el presente trabajo se encontró un efecto significativo de la concentración de NaCl sobre la reducción de PPC y el incremento de HE, aunque también se observó un efecto significativo del nivel de presión, produciéndose un aumento de la PPC y una reducción de HE al incrementar el mismo. Szerman y col. (2011) y Ferrari y col. (2012) también, informaron que la aplicación de APH incrementó la PPC de las hamburguesas de carne bovina. Así mismo, Hayes y col. (2014) realizaron un análisis sensorial de hamburguesas tratadas con APH (400 MPa, 1 min, 4 °C) e informaron que las hamburguesas presurizadas presentaron menor jugosidad que las hamburguesas control.

En función de los antecedentes presentados en los párrafos previos, se observa que el efecto del tratamiento con APH sobre la retención de agua de las proteínas cárnicas y en consecuencia sobre los parámetros PPC y HE presenta controversia cuando se comparan los resultados del presente trabajo con los informados por Macfarlane y col. (1984), Iwasaki y col. (2006) y Villamonte y col. (2013). Speroni y col. (2014) informan que el tratamiento con APH entre 200 y 300 MPa produce la desnaturalización de las proteínas miofibrilares y la formación de diferentes agregados solubles e insolubles, dependiendo si las proteínas que forman los agregados son extraídas por las sales o integran las miofibrillas. Posiblemente la presencia de agregados insolubles, de baja capacidad de hidratación, explicaría el incremento de PPC y la disminución de HE en las hamburguesas tratadas con APH. Beltran y col. (2003) propusieron que ese aumento de la PPC puede deberse al daño de la membrana celular que ocurre debido al tratamiento con alta presión. Chapleau y de Lamballerie-Anton. (2003) indicaron que la presurización modificó la estructura de las proteínas miofibrilares conduciendo a la aparición de sitios hidrofóbicos, este efecto

explicaría parte de la disminución de la capacidad de retención de agua en las hamburguesas.

4.3.6 Análisis de los parámetros de Oxidación de Lípidos (número de TBARS) y Capacidad Antioxidante

En la Tabla 4.32 se presentan los coeficientes de regresión estimados para los parámetros de oxidación de lípidos (número de TBARS) y capacidad antioxidante de muestras de hamburguesas crudas de carne bovina.

El parámetro de oxidación de lípidos (OL) presentó un modelo significativo ($p < 0,05$) y logró describir el 97 % de las respuestas observadas. La concentración de NaCl afectó significativamente el valor de este parámetro, de manera lineal positiva, por lo que un aumento en la concentración de NaCl produjo un incremento de la OL. Con respecto a la capacidad antioxidante (CA) en las hamburguesas, este parámetro presentó un modelo significativo ($p < 0,05$), logrando explicar el 84 % de las respuestas observadas. La CA fue afectada significativamente ($p < 0,05$) por la concentración de NaCl y el nivel de presión, ambos de manera cuadrática con coeficientes negativos.

Tabla 4.32. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes a los parámetros de oxidación de lípidos (OL) y capacidad antioxidante (CA)

Términos	OL (mg MAL/kg muestra)	CA (microM FeSO4/g muestra)
Constante	0,209	392,20
Lineales		
NaCl	0,025*	28,78
Romero	0,007	-5,18
Presión	-0,010	-31,18
Cuadráticos		
NaCl ²	0,006	-25,99*
Romero ²	-0,004	-7,73
Presión ²	-0,013	-26,86*
Interacciones		
NaCl x Romero	0,009	-16,22
NaCl x Presión	-0,025	-33,37
Romero x Presión	-0,002	-12,90
Falta de ajuste	0,860	0,176
R²	0,967	0,838
p	<0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondiente a los parámetros de oxidación de lípidos y capacidad antioxidante:

$$OL = 0,206 + 0,025 NaCl$$

$$CA = 389,82 - 25,39 NaCl^2 - 26,27 presión^2$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % ($p < 0,05$)

NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio

Romero: Concentración de extracto de romero

Presión: Nivel de presión

En las Figuras 4.64 y 4.65 se presentan las superficies de respuesta correspondientes al efecto de la concentración de NaCl y del nivel de presión sobre los parámetros OL y CA. Cabe señalar que la concentración de extracto de romero no tuvo efecto significativo sobre OL ni tampoco sobre CA, según se observa en la Tabla 4.32 y en la Figura 4.64.

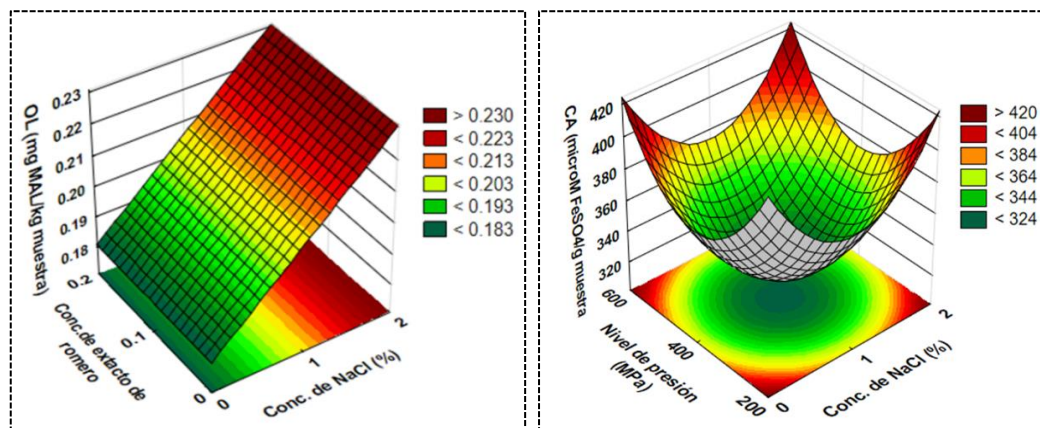


Figura 4.64. Superficie de respuesta del efecto de las concentraciones de extracto de romero y NaCl sobre la oxidación de lípidos de hamburguesas crudas.

Figura 4.65. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de NaCl sobre la capacidad antioxidante en hamburguesas crudas.

En la Tabla 4.33, se observa que la OL de las hamburguesas presentó un modelo significativo ($p < 0,05$) y logró explicar el 92 % de las respuestas observadas. Este parámetro fue afectado de manera significativa ($p < 0,05$) por la concentración de extracto de romero (término cuadrático con coeficiente positivo) y el nivel de presión (término cuadrático con coeficiente negativo). En el caso de la CA, este parámetro presentó un modelo significativo ($p < 0,05$) y logró explicar el 96 % de las respuestas observadas. Se observó que la concentración de Eritorbato de Sodio tuvo un efecto lineal positivo y la interacción de concentración de Eritorbato de Sodio x Presión también presentó un efecto positivo.

Tabla 4.33. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes a los parámetros de oxidación de lípidos (OL) y capacidad antioxidante (CA)

Parámetros	OL (mg MAL/kg muestra)	CA (microM FeSO4/g muestra)
Constantes	0,268	4476,03
Lineales		
Romero	0,034	-91,54
Eritorbato	-0,015	4374,35*
Presión	-0,022	254,43
Cuadráticos		
Romero ²	0,034*	-175,70
Eritorbato ²	-0,006	-287,79
Presión ²	-0,040*	319,96
Interacciones		
Romero x Eritorbato	0,019	97,70
Romero x Presión	0,002	478,43
Eritorbato x Presión	-0,010	937,50*
Falta de ajuste	0,292	0,067
R²	0,915	0,960
p	<0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondiente a los parámetros de oxidación de lípidos y capacidad antioxidante:

$$OL = 0,266 + 0,034 \text{ Romero}^2 - 0,039 \text{ Presión}^2$$

$$CA = 4437,76 + 4374,35 \text{ Eritorbato} + 937,50 \text{ Eritorbato} \times \text{Presión}$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % ($p < 0,05$)

Romero: Concentración de extracto de romero

Eritorbato: Concentración de Eritorbato de Sodio

Presión: Nivel de presión

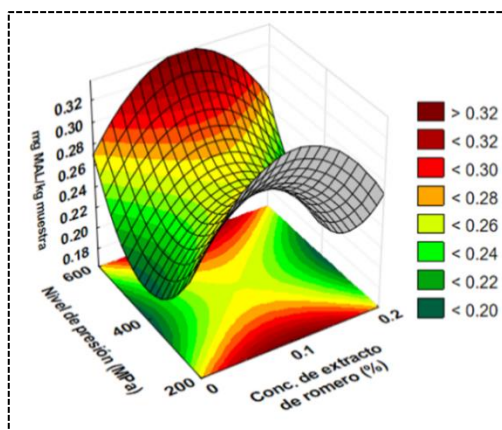


Figura 4.66. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de extracto de romero sobre la oxidación de lípidos de hamburguesas crudas.

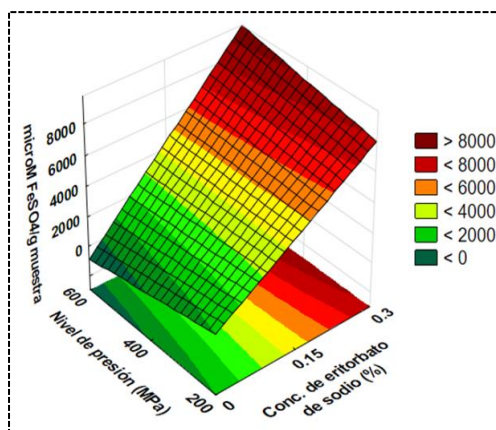


Figura 4.67. Superficie de respuesta del efecto del nivel de presión y de la concentración de Eritorbato de Sodio sobre la capacidad antioxidante en hamburguesas crudas.

Las reacciones oxidativas ocurren durante el procesamiento y el almacenamiento de la carne y de los productos cárnicos. Las hamburguesas son altamente susceptibles a la oxidación ya que el proceso de picado, la adición de sal y

la cocción promueven la formación de especies de Oxígeno reactivo –EOR o en inglés ROS- (Ladikos y Lougovois, 1990).

Beltran y col. (2004), Cheah y Ledward, (1997), Huang y col. (2012), Ma y col. (2007) informaron que los iones de metales de transición son la principal causa de la oxidación de los lípidos. Por otra parte, la capacidad del NaCl para promover la oxidación de los lípidos se debe a la presencia del ion Na^+ (Salih, 1986). Los cationes que son prooxidantes (Castell y col., 1965) pueden alterar la integridad estructural de las membranas (Rhee, 1988) o inducir cambios en los pigmentos de la carne (Rhee, 1999). En general la oxidación de lípidos por efecto del NaCl en los productos cárnicos se debe a su capacidad para alterar la interacción entre los iones Hierro y las proteínas y, en consecuencia, dejar más iones Hierro libres para interactuar con la fracción lipídica e incrementar la oxidación de los lípidos (Kanner y col., 1991). También fue informada por estudios previos la disminución de la capacidad antioxidante en productos cárnicos por efecto del NaCl. Rojas y Brewer (2007) reportaron que el uso de extracto de romero en la elaboración de hamburguesas de carne bovina y hamburguesas de carne de cerdo no fue efectivo como antioxidante en presencia de NaCl (2 %), por lo que esta sal en altas concentraciones disminuiría la capacidad antioxidante del extracto de romero.

La aplicación de APH generalmente incrementa la oxidación de lípidos en productos cárnicos (Andrés y col., 2004; Cava y col., 2009). La oxidación de los lípidos por efecto del procesamiento con APH se puede entender según la transformación de las estructuras biológicas de los alimentos que produce ese tratamiento. Por ejemplo, la liberación de radicales o precursores de radicales debido a la modificación de las membranas celulares inducidas por la alta presión, la cual es una de las causas más importantes del aumento en la oxidación de los lípidos. Además, la contribución de las enzimas prooxidativas en la oxidación de los lípidos parece ser relevante, considerando los efectos que las altas presiones tienen sobre las proteínas. (Medina Meza y col., 2014).

Carlez y col. (1995) informaron la oxidación de la oximioglobina a metamioglobina en carne bovina picada tratada a 500 MPa. Es sabido que la metamioglobina cataliza la oxidación de los lípidos, pero se ha demostrado en un sistema modelo que el tratamiento a 800 MPa durante 10 min no aumentó la actividad catalítica de la metamioglobina (Orlien y col., 2000). Campus y col. (2008) analizaron muestras de lomo de cerdo curado y observaron que, durante la presurización, la catálisis de la oxidación de los lípidos ocurrió asociada con la liberación de Hierro no

hemo y el daño a la membrana. Sin embargo, estos autores observaron diferencias en la oxidación, especialmente en el primer día de almacenamiento, donde las no presurizadas presentaron valores de TBARS más altos que las muestras presurizadas. Rodríguez y col. (2016) estudiaron la oxidación de lípidos en carne marinada presurizada y no encontraron diferencias significativas en los valores de TBARS en comparación con las muestras control. Grossi y col. (2014) también informaron que el tratamiento con APH (600 MPa) de carne de cerdo no produjo un inicio inmediato de la oxidación de lípidos. Kato y Hayashi (1999) indicaron que el grosor de la bicapa lipídica aumentó con el aumento del nivel de presión (a temperatura constante). En consecuencia, esos autores relacionaron la ausencia de efecto del tratamiento con APH sobre la oxidación lipídica a un menor daño en la bicapa de fosfolípidos.

La actividad antioxidante de los extractos de plantas se atribuye comúnmente a la eliminación de radicales y a la quelación de iones metálicos (Brewer, 2011). En el extracto de romero el compuesto fenólico ácido carnósico tiene la funcionalidad principal de la actividad antioxidante, mediante la donación de un átomo de hidrógeno a un radical, rompiéndose por lo tanto el ciclo de oxidación. Varios autores indicaron su efectividad contra la oxidación en carnes y productos cárnicos (Chen y col. 1999; Formanek y col. 2001; McCarthy y col., 2001; Djenane y col., 2003; Sánchez-Escalante y col. 2003 a, b; Han y Rhee, 2005; Lee y col. 2005; Balentine y col. 2006; Georgantelis y col. 2007). Estos autores informaron que el uso de extracto de romero en la carne disminuyó la oxidación de lípidos. En un estudio en el cual se cuantificó la formación de radicales, se observó que la adición de antioxidantes naturales, extracto de romero, ácido cafeico y ácido ascórbico a carne bovina picada, antes del tratamiento con APH (800 MPa, 10 min, 20 °C) no proporcionó protección contra la formación de radicales inducida por la presión (Bolumar y col., 2014). Los autores interpretaron que estos resultados se debieron a un mayor acceso a especies de Hierro que cataliza la generación de radicales durante la presurización, Fe^{3+} a Fe^{2+} activo (Bolumar y col., 2014). Además, Bolumar y col. (2012) no encontraron formación de radicales a presiones inferiores a 400 MPa.

El Eritorbato de Sodio tiene bajo efecto antioxidante sobre los lípidos, dada su insolubilidad en estos (Freixanet, 2017). Sin embargo, algunos autores, como Reische y col. (2002) indicaron que ese compuesto fue capaz de prevenir la oxidación de los lípidos mediante la desactivación del Oxígeno singulete, la donación de átomos de Hidrógeno y como agente reductor. También Baggio y Bragagnolo (2006 a, b, c)

informaron que la incorporación de Eritorbato de Sodio en productos cárnicos fue eficaz para retrasar la oxidación de los lípidos.

En el presente trabajo se observó un efecto significativo de la concentración de NaCl sobre la oxidación de lípidos, confirmando lo observado por otros trabajos previos. En el estudio en el cual se modificó la concentración de NaCl, este fue el único factor que afectó la oxidación de lípidos. Sin embargo, cuando se trabajó a una concentración fija de NaCl y se modificó la concentración de extracto de romero y de Eritorbato de Sodio, no se encontró efecto antioxidante del extracto de romero hasta una concentración de 0,1 % (término cuadrático con coeficiente positivo). Por el contrario, en ese rango de concentraciones se observó un efecto prooxidante ya que el aumento de su concentración provocó el incremento de los valores del número TBARS. A su vez, en el rango de concentraciones 0,1 - 0,2 % de extracto de romero si se observó un efecto antioxidante ya que se produjo una disminución de los valores del número TBARS (Figura 4.66). El efecto protector de extractos de plantas ricos en compuestos fenólicos y otros fitoquímicos suele ser ambiguo debido a la actividad redox de tales especies (Macáková y col., 2012). Varios estudios mostraron los efectos antioxidantes y prooxidativos de la adición de extractos vegetales en la carne y productos cárnicos (Vaithyanathan y col., 2011; Estévez y Cava, 2006; Utrera y col., 2012). Así, Cheah y Ledward (1997) informaron que la adición de ácido cítrico en carne picada de cerdo produjo la disminución del pH de las muestras y, en consecuencia, aceleró la oxidación de los lípidos en las mismas. A su vez, en el presente trabajo no se observó efecto significativo de la incorporación de Eritorbato de Sodio sobre la oxidación de lípidos en las hamburguesas tratadas con APH, lo cual probablemente se debió a la insolubilidad de ese compuesto en las grasas.

Con relación a la capacidad antioxidante en las hamburguesas crudas, en el estudio en el cual se modificó la concentración de NaCl se observó un efecto cuadrático de la concentración de NaCl. En este caso la capacidad antioxidante disminuyó hasta una concentración de 1 % NaCl y luego incrementó entre 1 y 2 % de NaCl. Sin embargo, cuando se trabajó a una concentración fija de NaCl y se modificó la concentración de extracto de romero y de Eritorbato de Sodio, el efecto predominante fue el de la concentración de Eritorbato de Sodio y su interacción con el nivel de presión. En este caso los mayores valores de la capacidad antioxidante se observaron a la mayor concentración de Eritorbato de Sodio (0,3 %) y al mayor nivel de presión (600 MPa).

Respecto al efecto del nivel de presión sobre la oxidación lipídica, solo fue significativo en el estudio en el que se trabajó a una concentración fija de NaCl, mientras que en el otro estudio predominó el efecto de la concentración de NaCl. El nivel de presión presentó un término cuadrático negativo por lo que los menores valores del número de TBARS se observaron a 400 MPa y los mayores a 200 y 600 MPa. La disminución del efecto entre 200 y 400 MPa podría deberse a la mayor inactivación de las enzimas prooxidantes, mientras que el incremento a presiones superiores a 400 MPa se debería al aumento de radicales libres como consecuencia del incremento de especies de hierro que catalizan su generación.

4.3.7 Análisis microbiológico

En las Tablas 4.34 y 4.35 se presentan los recuentos de microbiota alteradora de hamburguesas elaboradas con aditivos en distintas concentraciones y tratadas con diferentes niveles de presión.

Tabla 4.34. Efecto de la concentración de NaCl y de extracto de romero y del nivel de presión sobre los recuentos de la microbiota alteradora de carnes y productos cárnicos

Conc. de NaCl (%)	Conc. de extracto de romero (%)	Nivel de presión (MPa)	Log ₁₀ UFC/g			
			Enterobacterias	Aerobios Mesófilos	Bacterias Ácido Lácticas	Aerobios Psicrótrofos
0	0,1	200	1,12 ±0,49	4,60 ±0,05	6,18 ±0,01	5,41 ±0,03
1	0,0	200	1,70 ±0,18	4,35 ±0,10	5,34 ±0,13	5,56 ±0,15
1	0,2	200	2,22 ±0,15	4,30 ±0,11	5,53 ±0,12	5,52 ±0,10
2	0,1	200	2,00 ±0,11	4,07 ±0,09	5,71 ±0,09	5,04 ±0,09
0	0,0	400	NDC	2,26 ±0,04	NDC	NDC
0	0,2	400	NDC	1,78 ±0,19	NDC	NDC
2	0,0	400	NDC	2,18 ±0,16	NDC	NDC
2	0,2	400	NDC	1,77 ±1,03	NDC	NDC
0	0,1	600	NDC	NDC	NDC	NDC
2	0,1	600	NDC	NDC	NDC	NDC

NDC: No se detectó crecimiento.

Los resultados muestran que la aplicación de presiones superiores a 200 MPa a las hamburguesas tuvo un importante efecto bactericida. A 400 y 600 MPa no se detectó crecimiento de Enterobacterias, Bacterias Ácido Lácticas, y Aerobios Psicrótrofos. Con la aplicación de 200 MPa se observaron recuentos máximos de 2,2, 6,2 y 5,6 Log UFC/g de Enterobacterias, Bacterias Ácido Lácticas y Aerobios Psicrótrofos. En el caso de los Aerobios Mesófilos se observaron recuentos máximos de 4,6 Log UFC/g en las muestras tratadas a 200 MPa y de 2,3 Log UFC/g en las

hamburguesas tratadas a 400 MPa mientras que en las presurizadas a 600 MPa no se observó crecimiento de mesófilos.

Tabla 4.35. Efecto de la concentración del extracto de romero y del Eritorbato de Sodio y del nivel de presión sobre los recuentos de la microbiota alteradora de hamburguesas

Conc. de extracto de romero (%)	Conc. de Eritorbato de sodio (%)	Nivel de presión (MPa)	Log ₁₀ UFC/g			
			Entero-bacterias	Aerobios Mesófilos	Bacterias Ácido Lácticas	Aerobios Psicrótrofos
0,0	0,15	200	NDC	3,00 ±0,08	3,12 ±0,02	3,44 ±0,05
0,2	0,15	200	NDC	2,78 ±0,33	2,67 ±0,54	3,27 ±0,12
0,1	0,00	200	NDC	3,32 ±0,08	3,37 ±0,03	3,70 ±0,09
0,1	0,30	200	NDC	3,34 ±0,10	3,25 ±0,05	3,45 ±0,16
0,0	0,30	400	NDC	NDC	NDC	NDC
0,1	0,15	400	NDC	NDC	NDC	NDC

Nota: no se analizaron los recuentos de las hamburguesas tratadas a 600 MPa debido a que en las muestras tratadas a 400 MPa no se observó crecimiento de los recuentos analizados para ninguno de los tratamientos evaluados. NDC: No se detectó crecimiento.

Los resultados en la Tabla 4.35 muestran recuentos máximos de 3,3; 3,4 y 3,7 Log UFC/g en Aerobios Mesófilos, Bacterias Ácido Lácticas, y Aerobios Psicrótrofos, respectivamente, en las hamburguesas tratadas a 200 MPa. A su vez, en las hamburguesas tratadas a 400 MPa ó 600 MPa no se observó crecimiento bacteriano.

Resulta importante indicar que se observó un efecto mínimo de las concentraciones de NaCl, extracto de romero y Eritorbato de Sodio sobre los recuentos evaluados.

Jung y col. (2013) informaron que el recuento de bacterias aerobias en muestras de carne bovina picada a 300 MPa se redujo en aproximadamente 2 Log UFC/g. Durantón y col. (2012) observaron que la presurización de muestras de carne de cerdo partir de 350 MPa produjo reducciones por debajo del límite de detección de bacterias Aerobias Mesófilas y Bacterias Ácido Lácticas. Además, esos autores informaron que las Enterobacterias fueron particularmente sensibles al tratamiento con APH ya que sus recuentos se mantuvieron por debajo del límite de detección con la aplicación de 200 MPa. Estudios previos demostraron la sensibilidad de las Enterobacterias en productos cárnicos en niveles menores a 400 MPa (López-Caballero y col., 1999; Tuboly y col., 2003). Los resultados del presente trabajo demostraron que un nivel de 400 MPa fue suficiente para inducir una reducción significativa de la microbiota alteradora presente en las hamburguesas de carne bovina.

4.3.8 Análisis térmico

En la Figura 4.68 se observan termogramas de muestras de hamburguesas elaboradas con aditivos en distintas concentraciones y tratadas con APH, también se presentan muestras de hamburguesas elaboradas solo con 0,5 % TPFS; con 2 % NaCl y una muestra de hamburguesa control (a la cual no se incorporó ningún aditivo ni se aplicó tratamiento con APH). La muestra control presentó 4 transiciones parcialmente solapadas que correspondieron a la cabeza y a la cola de miosina, a las proteínas sarcoplásmicas, al colágeno y a la actina, mostrando un termograma típico de carne bovina cruda, que coincide con los resultados presentados en los estudios previos (ítems 4.1.6 y 4.2.6) y los de Speroni y col. (2014).

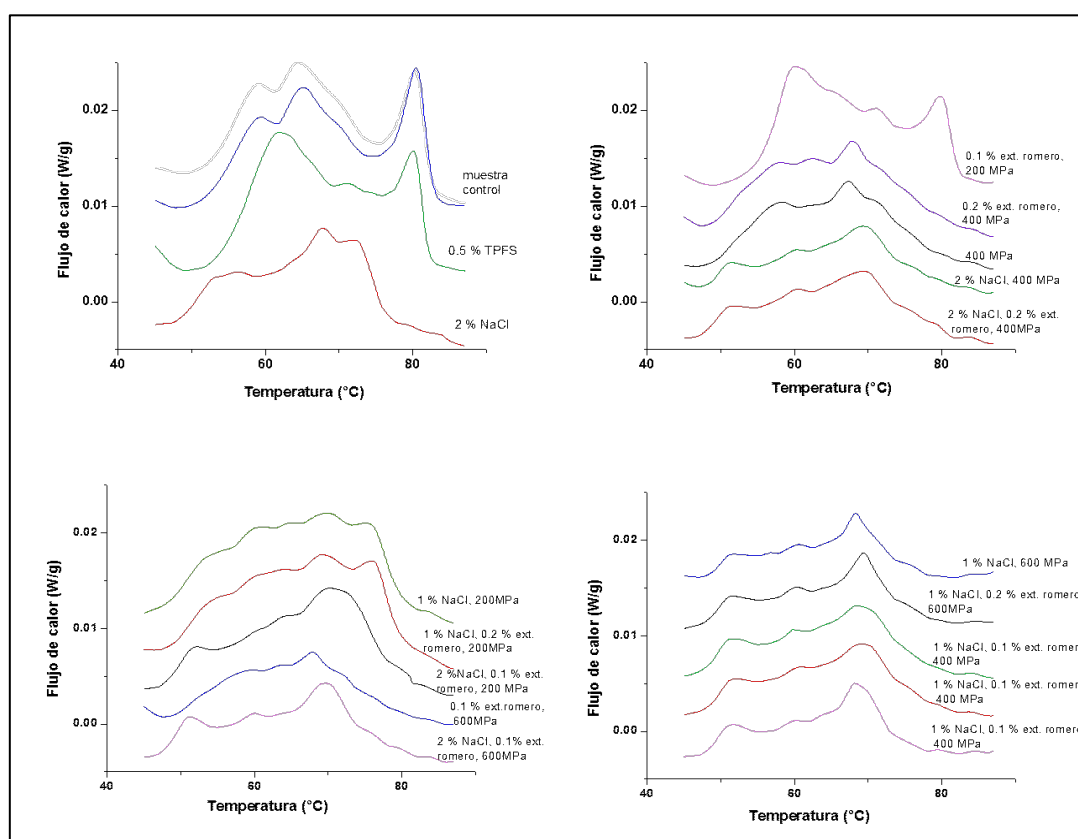


Figura 4.68. Termogramas de muestras de hamburguesas elaboradas con distintas concentraciones de aditivos y tratadas con diferentes niveles de presión.

La muestra control presentó un ΔH_d de $17,31 \pm 0,71$ J/g de proteína para el total de proteínas. La muestra con 0,5 % TPFS presentó un ΔH_d de $16,95 \pm 0,72$ J/g de proteína para el total de proteínas y si bien el TPFS modificó las Td de las transiciones, las que ocurrieron a menores temperaturas (cabeza y cola de miosina y parte de las proteínas sarcoplásmicas), el ΔH_d para el total de proteínas se mantuvo. La adición de 2 % NaCl provocó disminución de la mayoría de las Td y del ΔH_d para el

total de proteínas que fue de $11,74 \pm 1,15$ J/g de proteína, lo que indica que el NaCl produjo una desnaturalización parcial de las proteínas cárnicas.

Las Tablas 4.36 y 4.37 presentan los coeficientes de regresión de los ΔH_d del total de proteínas, de la cabeza de miosina y de la actina de muestras de hamburguesas crudas de carne bovina elaboradas con aditivos en distintas concentraciones y tratadas con APH en distintos niveles.

Tabla 4.36. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes a la entalpía de desnaturalización del total de las proteínas (ΔH_d)

Términos	ΔH_d total de proteínas (J/g de proteína)
Constante	9,14
Lineales	
NaCl	-1,52*
Romero	0,45
Presión	-3,15*
Cuadráticos	
NaCl ²	0,07
Romero ²	-0,37
Presión ²	-1,36*
Interacciones	
NaCl x Romero	0,44
NaCl x Presión	1,51
Romero x Presión	0,46
Falta de ajuste	0,451
R²	0,964
p	<0,05

Ecuación reducida correspondiente a la entalpía de desnaturalización del total de las proteínas:

$$\Delta H_d (\text{J/g de proteína}) = 9,05 - 1,52 \text{ NaCl} - 3,15 \text{ Presión} - 1,34 \text{ Presión}^2$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % ($p < 0,05$)

NaCl: Concentración de cloruro de sodio

Romero: Concentración de extracto de romero

Presión: Nivel de presión

El ΔH_d del total de proteínas mostró un modelo significativo ($p < 0,05$) que logró describir el 96 % de las respuestas observadas. Este parámetro fue afectado significativamente ($p < 0,05$) por la concentración de NaCl y el nivel de presión. El incremento de la concentración de NaCl y del nivel presión (términos lineales negativos) disminuyeron su valor. El nivel de presión también ejerció un efecto cuadrático. El nivel de presión tuvo mayor efecto que la concentración de NaCl, ya que presentó mayor coeficiente de regresión. No se observó efecto significativo ($p > 0,05$) de las interacciones.

Tabla 4.37. Coeficientes de regresión y análisis de varianza correspondientes a las entalpías de desnaturalización de la cabeza de miosina y de la actina

Términos	ΔH_d cabeza miosina (J/g de proteína)	ΔH_d actina (J/g de proteína)
Constante	1,37	1,03
Lineales		
NaCl	-0,62*	-0,35*
Romero	-0,07	-0,08
Presión	-0,57*	-0,63*
Cuadráticos		
NaCl ²	-0,17*	-0,06
Romero ²	0,10	0,02
Presión ²	-0,29*	-0,30*
Interacciones		
NaCl x Romero	-0,01	0,02
NaCl x Presión	0,16	0,23
Romero x Presión	0,10	0,16
Falta de ajuste	0,069	0,095
R²	0,921	0,940
p	<0,05	<0,05

Ecuaciones reducidas correspondientes a las entalpías de desnaturalización de la cabeza de miosina y de la actina:

$$\Delta H_d \text{ Miosina (J/g de proteína)} = 1,40 - 0,62 \text{ NaCl} - 0,18 \text{ NaCl}^2 - 0,57 \text{ Presión} - 0,30 \text{ Presión}^2$$

$$\Delta H_d \text{ Actina (J/g de proteína)} = 1,01 - 0,35 \text{ NaCl} - 0,63 \text{ Presión} - 0,30 \text{ Presión}^2$$

(*) Nivel de significancia menor al 5 % ($p < 0,05$)

NaCl: Concentración de Cloruro de Sodio

Romero: Concentración de extracto de romero

Presión: Nivel de presión

Con respecto al ΔH_d de la cabeza de miosina, este presentó un modelo significativo ($p < 0,05$) que describió el 92 % de las respuestas observadas. El valor del ΔH_d de la cabeza de miosina disminuyó significativamente ($p < 0,05$) por efecto de la concentración de NaCl y del nivel de presión (coeficientes lineales negativo). Estos factores también produjeron efectos cuadráticos (Tabla 4.37).

En cuanto al ΔH_d de actina, también presentó un modelo significativo ($p < 0,05$) que logró describir el 94 % de las respuestas observadas. La concentración de NaCl y el nivel de presión disminuyeron de manera lineal los valores de este parámetro. Además, la presión también ejerció un efecto cuadrático. La comparación de las magnitudes de los coeficientes sugiere que la actina fue menos sensible al efecto de la concentración de NaCl que la cabeza de miosina.

Speroni y col. (2014) indicaron que los efectos de NaCl y TPFS en el comportamiento térmico de las proteínas son el resultado de una combinación de mecanismos que dependen del tipo de sal (efecto caotrópico-cosmotrópico), de la concentración (fuerza iónica) y de las interacciones específicas con los sitios activos. Además, estos autores informaron la disminución del ΔH_d del total de las proteínas con

la incorporación de 2 % NaCl, y también la disminución de las T_d en hamburguesas de carne bovina, un efecto similar fue observado en el presente trabajo.

Luego de los tratamientos a 400 y 600 MPa se detectó el pico correspondiente a la estructura cuya formación fue inducida por las APH, observada también en los ítems 4.1.6 y 4.2.6. En estas muestras esta estructura tuvo una T_d de $52,36 \pm 0,20$ °C en ausencia de NaCl para 400 MPa y $52,63 \pm 0,21$ °C para 600 MPa, mientras que, en presencia de esta sal, la T_d fue menor ($51,21 \pm 0,33$ °C para 400 MPa y $51,07 \pm 0,35$ °C para 600 MPa), sin efecto del nivel de presión, 400 o 600 MPa (Figura 4.68).

La aplicación de tratamientos a 400 o 600 MPa condujo a valores similares de ΔH_d , que fueron menores a los obtenidos luego de tratamientos a 200 MPa, pero mayores a cero. Este resultado indica que ciertas proteínas cárnicas son resistentes a la desnaturalización inducida por APH a pesar de aplicar niveles tan altos como 600 MPa y que no se genera diferencia en el grado de desnaturalización entre 400 y 600 MPa. Este hallazgo podría relacionarse con lo observado en relación a parámetros como pH y L^* (ensayos con concentración de NaCl variable, ítems 4.3.1 y 4.3.2), L^* , a^* , b^* , humedad expresable y pérdidas por cocción (ensayo con concentración de NaCl constante, ítems 4.3.2 y 4.3.5) donde se encontró que los mayores cambios ocurrieron entre 200 y 400 MPa, pero con valores similares en las muestras tratadas a 400 y 600 MPa.

Iwasaki y Yamamoto (2003) y Tintchev y col. (2013) quienes analizaron proteínas miofibrilares de muestras de carne de conejo y salchichas de cerdo, respectivamente, presurizadas con niveles de hasta 600 MPa, plantearon un mecanismo en que la miosina se solubiliza y disocia en polipéptidos que luego se agregan a través de interacciones hidrofóbicas generando estructuras definidas. Según estos autores, la solubilización sería máxima en el rango de 200 – 300 MPa, mientras que a mayores valores prevalecería la insolubilización. Probablemente la transición que en las muestras de este trabajo se detectó a temperaturas ca. 51 °C corresponda a una estructura generada a través de un mecanismo similar.

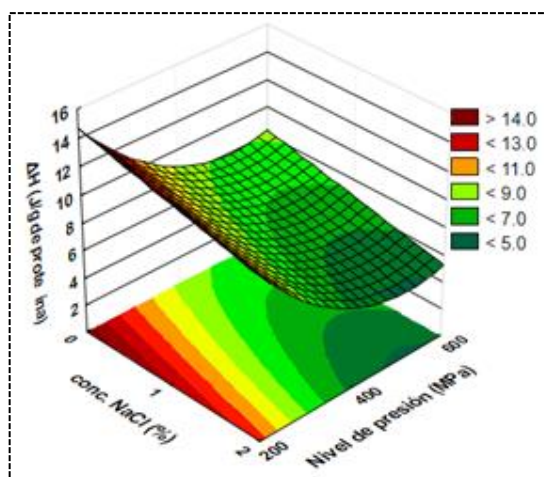


Figura 4.69. Superficie de respuesta del efecto de la concentración de NaCl y del nivel de presión sobre el ΔH_d del total de proteínas de muestras de hamburguesas.

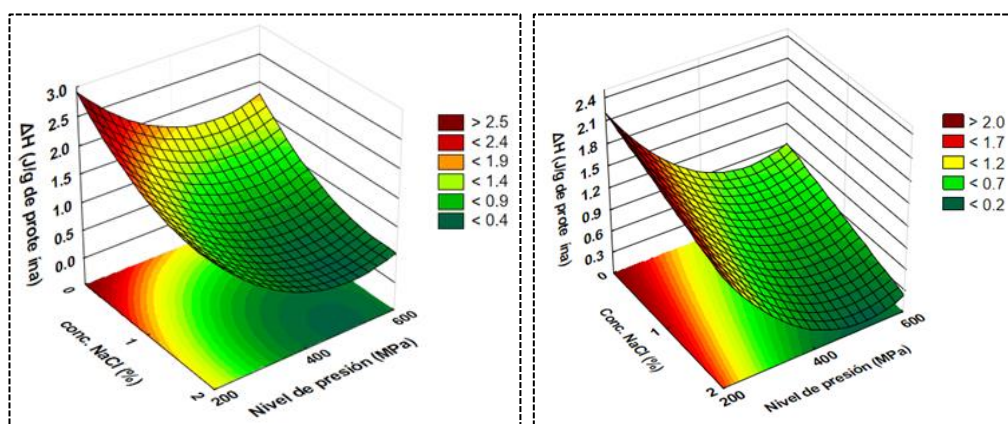


Figura 4.70. Superficie de respuesta del efecto de la concentración de NaCl y del nivel de presión sobre el ΔH_d de la cabeza de miosina de muestras de hamburguesas.

Figura 4.71. Superficie de respuesta del efecto de la concentración de NaCl y del nivel de presión sobre el ΔH_d de la actina de muestras de hamburguesas.

4.3.9 Caracterización molecular de extractos proteicos de hamburguesas

Las proteínas sarcoplásmicas fueron extraídas con B0,1 y las proteínas miofibrilares con B0,6. En los perfiles electroforéticos se presentan muestras de hamburguesa control (hamburguesa sin aditivos ni tratamiento con APH); muestra de hamburguesas adicionadas con 0,5 % TPFS; muestra de hamburguesa adicionada con 2 % NaCl; además de las muestras de hamburguesas elaboradas con 0,5 % TPFS y adicionadas con distintas concentraciones de NaCl y extracto de romero) y tratadas con distintos niveles de presión.

4.3.9.1 Caracterización de proteínas sarcoplásmicas

La muestra que contenía solo 0,5 % TPFS tuvo un perfil similar a la muestra control. Mientras que en la muestra que tuvo 2 % NaCl se observó una ligera disminución en la intensidad de algunas bandas (97, 43 y 31, Figura 4.72). La incorporación de extracto de romero no generó efectos detectables por análisis de los geles electroforéticos en las proteínas sarcoplásmicas.

En las muestras tratadas con 200 MPa en ausencia de NaCl no se encontraron diferencias con la muestra control o con la que solo contenía TPFS. Sin embargo, el tratamiento a 200 MPa en muestras que contenían NaCl provocó una ligera disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a 34 y 31 kDa.

El tratamiento a 400 MPa provocó la disminución de las bandas de 97, 47, 43 y 30 kDa y el aumento de aquellas correspondientes a 38, 36, 28, 24 y 22 kDa. Este resultado fue similar al observado en el estudio previo del ítem 4.1.7 en las muestras de carne picada tratada a 300 MPa, con algunas diferencias ya que a 300 MPa no se detectó efecto sobre la banda de 47 kDa.

Cuando las muestras fueron tratadas a 600 MPa en ausencia de NaCl se detectó un efecto sobre los mismos polipéptidos modificados por el tratamiento a 400 MPa, pero con mayor magnitud, tanto en los aumentos como en las disminuciones de intensidad de bandas. La incorporación de NaCl favoreció drásticamente la disminución de intensidad de casi todas las bandas, incluso la correspondiente a los agregados de alto peso molecular que no ingresaron al gel. Este efecto fue dependiente de la concentración por lo que a 2 % NaCl solo se detectaron las bandas a 55 y 16 kDa.

Estos resultados indican que el nivel de presión en el rango 200 – 600 MPa determinó distintos fenómenos de agregación-solubilización de las proteínas sarcoplásmicas. Notablemente, las diferencias entre 400 y 600 MPa observadas en los geles de electroforesis no fueron acompañadas por diferencias en el grado de desnaturalización. Además, la incorporación de NaCl favoreció la insolubilización inducida por las APH, principalmente a 600 MPa. Marcos y col. (2010) y Marcos y Mullen (2014) estudiaron el efecto de las APH aplicadas sobre carne sin aditivos y encontraron que la solubilidad de las proteínas sarcoplásmicas de carne bovina disminuyó en forma proporcional al nivel de presión, con mayor efecto a 600 que a 400 MPa.

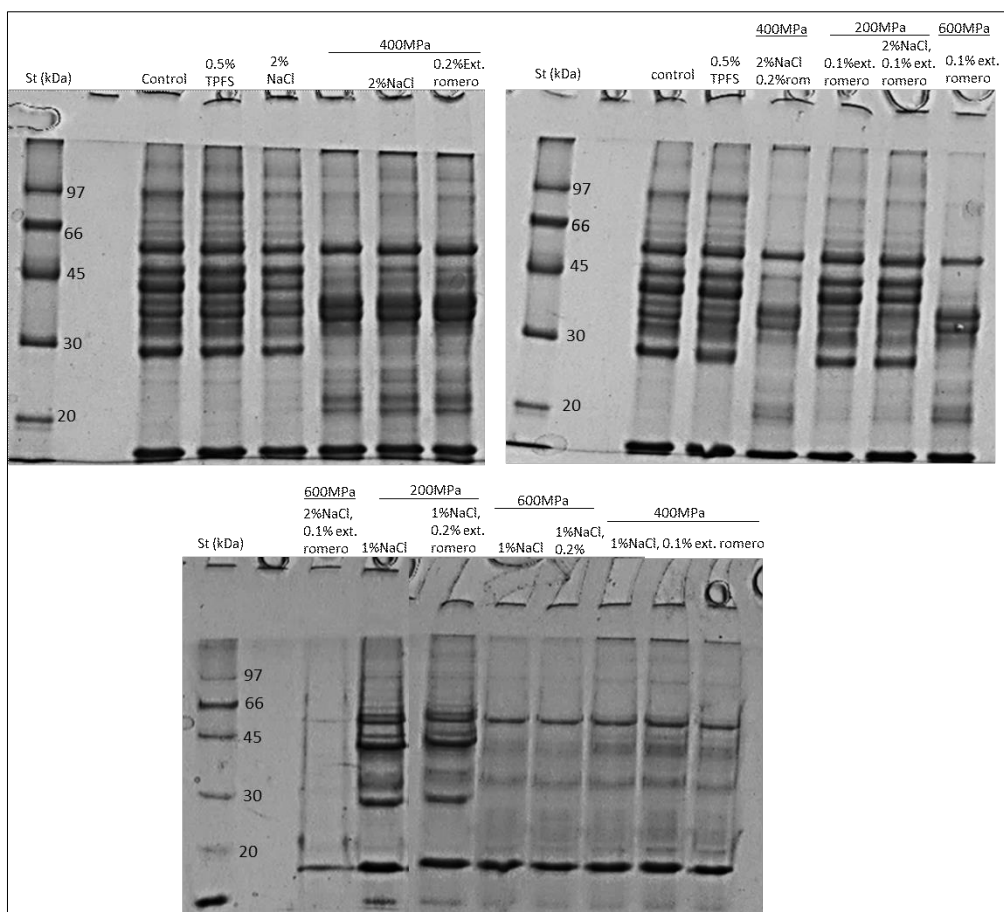


Figura 4.72 Perfiles electroforéticos de proteínas sarcoplásmicas de muestras de hamburguesas. St: muestra estándar con pesos moleculares conocidos.

4.3.9.2 Caracterización de proteínas miofibrilares

En la Figura 4.73 se presentan los perfiles electroforéticos de las proteínas miofibrilares extraídas con B0,6. La muestra control presentó un patrón de bandas típico de proteínas miofibrilares y similar al descrito en el ítem 4.1.7. Se observó que la muestra que contenía solo 0,5 % TPFS tuvo un perfil similar a la muestra control, pero con mayor intensidad en la banda correspondiente a la cadena pesada de miosina. Cuando la muestra tuvo 2 % NaCl se observó disminución de la intensidad de las bandas de la cadena pesada de miosina y de la cadena liviana (polipéptido de 24 kDa) e incremento de la intensidad de la banda de actina en comparación con el control.

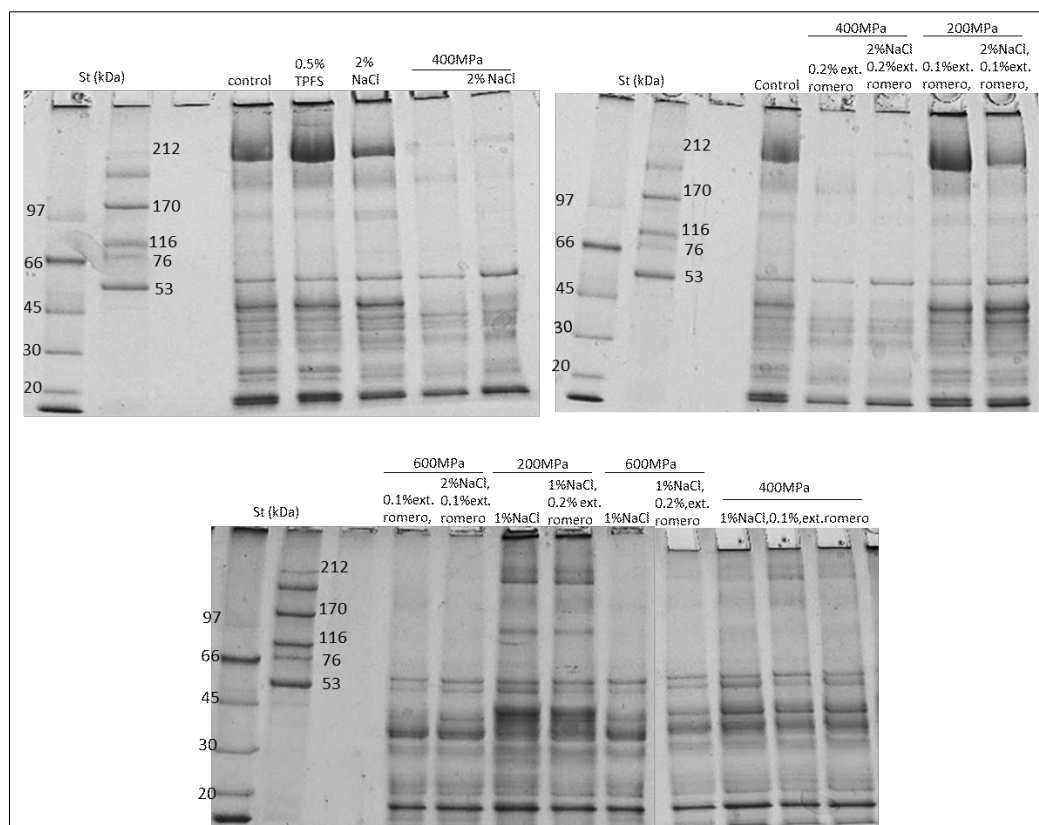


Figura 4.73. Perfiles electroforéticos de proteínas miofibrilares de muestras de hamburguesas. St: muestra estándar con pesos moleculares conocidos.

Los perfiles electroforéticos de las muestras sometidas a 200 MPa en ausencia de NaCl no tuvieron diferencias con respecto a los correspondientes a las muestras no presurizadas que contenían TPFS. Sin embargo, la incorporación de NaCl (1 y 2 %) promovió la disminución de la intensidad de las bandas de la cadena pesada de miosina y del polipéptido de 24 kDa correspondiente a la cadena liviana de miosina. Este resultado concuerda con lo observado en los ensayos de calorimetría diferencial de barrido: la presencia de NaCl favoreció la desnaturalización parcial de la cabeza de miosina dada por el tratamiento a 200 MPa, mientras que en ausencia de NaCl ese nivel de presión no provocó su desnaturalización (Figura 4.68). El efecto del NaCl sobre la sensibilización de la miosina (pero no de la actina) frente a un tratamiento a 200 MPa también se detectó en el estudio correspondiente al ítem 4.2.7.2 (Figura 4.32).

Las muestras tratadas a 400 MPa sin incorporación de NaCl exhibieron disminución de intensidad en la mayoría de las bandas; en las correspondientes a la cadena pesada de miosina y actina el efecto fue la desaparición completa de sus bandas. La presencia de NaCl generó perfiles similares, pero sin la desaparición completa de las bandas de dichas proteínas.

En las muestras presurizadas a 600 MPa se observaron perfiles similares a los obtenidos con 400 MPa. Sin embargo, a 600 MPa el NaCl no generó el efecto de solubilización parcial de la cadena pesada de miosina o de actina que se había detectado al nivel de presión intermedio.

Estos datos sugieren que en el rango 200 – 600 MPa el nivel de presión fue un factor importante en el comportamiento de agregación-insolubilización de las proteínas miofibrilares. En ausencia de NaCl el menor nivel ensayado no provocó cambios detectables por SDS-PAGE mientras que el nivel medio y el mayor tuvieron efectos similares. La presencia de NaCl afectó los comportamientos diferencialmente dependiendo del nivel de APH aplicado: a 200 MPa promovió la agregación de miosina, pero a 400 MPa revirtió parcialmente la insolubilización inducida por la presión; a 600 MPa el NaCl no tuvo efecto detectable por SDS-PAGE.

Es interesante destacar que si bien a 400 y 600 MPa las proteínas miofibrilares exhibieron el mismo grado de desnaturalización para cada concentración de NaCl (Figuras 4.70 y 4.71), el efecto de solubilización parcial del NaCl solo se detectó en las muestras tratadas a 400 MPa (y no a 600 MPa). Por su parte las proteínas sarcoplásmicas sufrieron una mayor insolubilización cuando el tratamiento a 600 MPa se realizó en presencia de NaCl. Es decir que en muestras tratadas a 600 MPa en presencia de NaCl la mayor parte de las proteínas (sarcoplásmicas y miofibrilares) se encontraban formando especies insolubles. Este excesivo grado de insolubilización que ocurrió con tratamientos a 600 MPa aplicados en presencia de altas concentraciones de NaCl (2 % en los ensayos en que la concentración de NaCl fue variable o 1,5 % en los que fue constante) explicaría el descenso (comparando con los valores de las muestras tratadas a 400 MPa) de los valores de parámetros como dureza, masticabilidad, esfuerzo y trabajo de corte y el aumento de las pérdidas por cocción (ítems 4.3.3, 4.3.4 y 4.3.5).

Diversos estudios evaluaron el efecto de la alta presión sobre las proteínas miofibrilares, informando que su aplicación afecta las interacciones inter e intramoleculares que dan como resultado la desnaturalización y agregación de proteínas (Grossi y col., 2011; Korner y Vardag, 1997). Los tratamientos con APH generan la formación de agregados, para ello se han propuesto diferentes tipos de interacciones, formación de enlaces disulfuro e interacciones hidrofóbicas (Chatton y Apichartsrangkoon, 2009), estabilización por enlaces de hidrógeno y/o interacciones electrostáticas (Ma y Ledward, 2004; Speroni y col., 2014), formación inicial de enlaces

de hidrógeno y posterior estabilización por enlaces disulfuro (Angsupanich y col., 1999).

4.3.10 Análisis de la microestructura de muestras de hamburguesa mediante microscopia electrónica de barrido

Las figuras presentadas a continuación pertenecen a micrografías que fueron obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido. Estas micrografías corresponden a muestras de hamburguesas de carne bovina que fueron elaboradas con 0,5 % de TPFS y además se les adicionó NaCl y extracto de romero en distintas concentraciones. Las hamburguesas fueron tratadas con APH en distintos niveles de presión (200-600 MPa) durante 5 min y a 5 °C. Se presenta también una muestra control, la cual correspondió a carne picada sin aditivos ni tratamiento con APH.

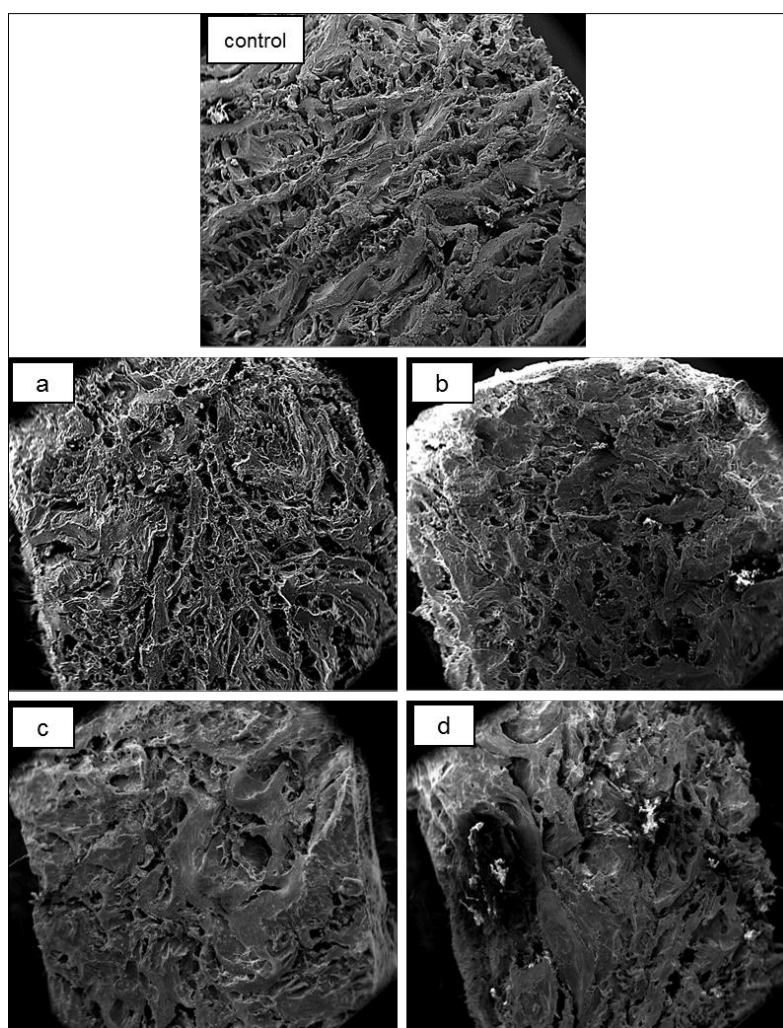


Figura 4.74. Micrografías obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido (60X) de muestras de hamburguesas. Control: sin aditivos ni tratamiento con APH; a: 400 MPa; b: 2 %

NaCl, 400 MPa; c: 2 % NaCl, 0,2 % extracto de romero, 400 MPa; d: 0,1 % extracto de romero, 200 MPa. Además, todas las muestras tuvieron 0,5 % TPFS.

La micrografía correspondiente a la muestra control (Figura 4.74) presenta una topografía muy heterogénea, con una importante disrupción del tejido cárnico debido al picado de la carne para la elaboración de las hamburguesas. La muestra presenta una estructura diferenciada, donde se observan haces de fibras en corte longitudinal y en corte transversal.

La micrografía “a” de la Figura 4.74 (400 MPa) muestra una estructura más compacta. Con aumentos mayores (250X - Figura 4.75-a) se logra diferenciar haces de fibras en corte longitudinal y transversal, en los cuales se observa una mayor compactación de las fibras que en la micrografía equivalente de la muestra control (micrografía “Control” Figura 4.74).

En la micrografía “b” de la Figura 4.74 (2 % NaCl, 400 MPa) se presenta una estructura más homogénea, observándose mayor compactación de los haces de fibra. Con aumentos mayores (250X - Figura 4.75-b) se observa con mayor detalle el efecto mencionado.

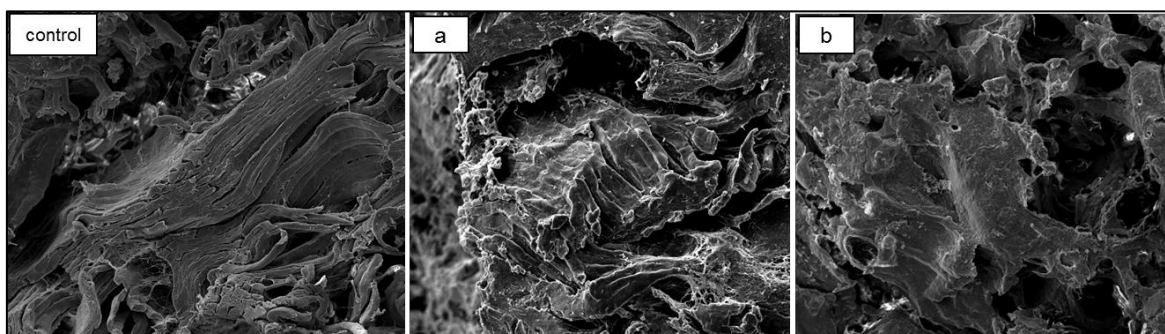


Figura 4.75. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (250X) de muestras de hamburguesas. Control: sin aditivos ni tratamiento con APH; a: 400 MPa; b: 2 % NaCl, 400 MPa. Además, todas las muestras tuvieron 0,5 % TPFS.

En la micrografía “c” de la Figura 4.74 (2 % NaCl; 0,2 % extracto de romero; 400 MPa) se observa una estructura compacta, similar a la observada en micrografía “b”. A 250X (Figura 4.76-c) se logra diferenciar haces de fibras en corte transversal y longitudinal, con una importante compactación de las fibras. En la micrografía “d” de la Figura 4.74 (0,1 % extracto de romero; 200 MPa) se presenta una estructura menos compacta que las micrografías “b” y “c”. Con aumentos de 250X (Figura 4.76-d) se diferencian haces de fibras en corte transversal y longitudinal, observándose un menor nivel de compactación de fibras.

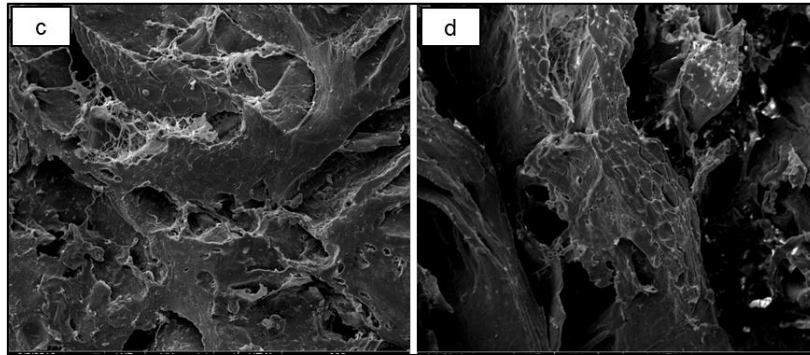


Figura 4.76. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (250X); c: 2 % NaCl, 0,2 % extracto de romero, 400 MPa; d: 0,1 % extracto de romero, 200 MPa. Además, todas las muestras tuvieron 0,5 % TPFS.

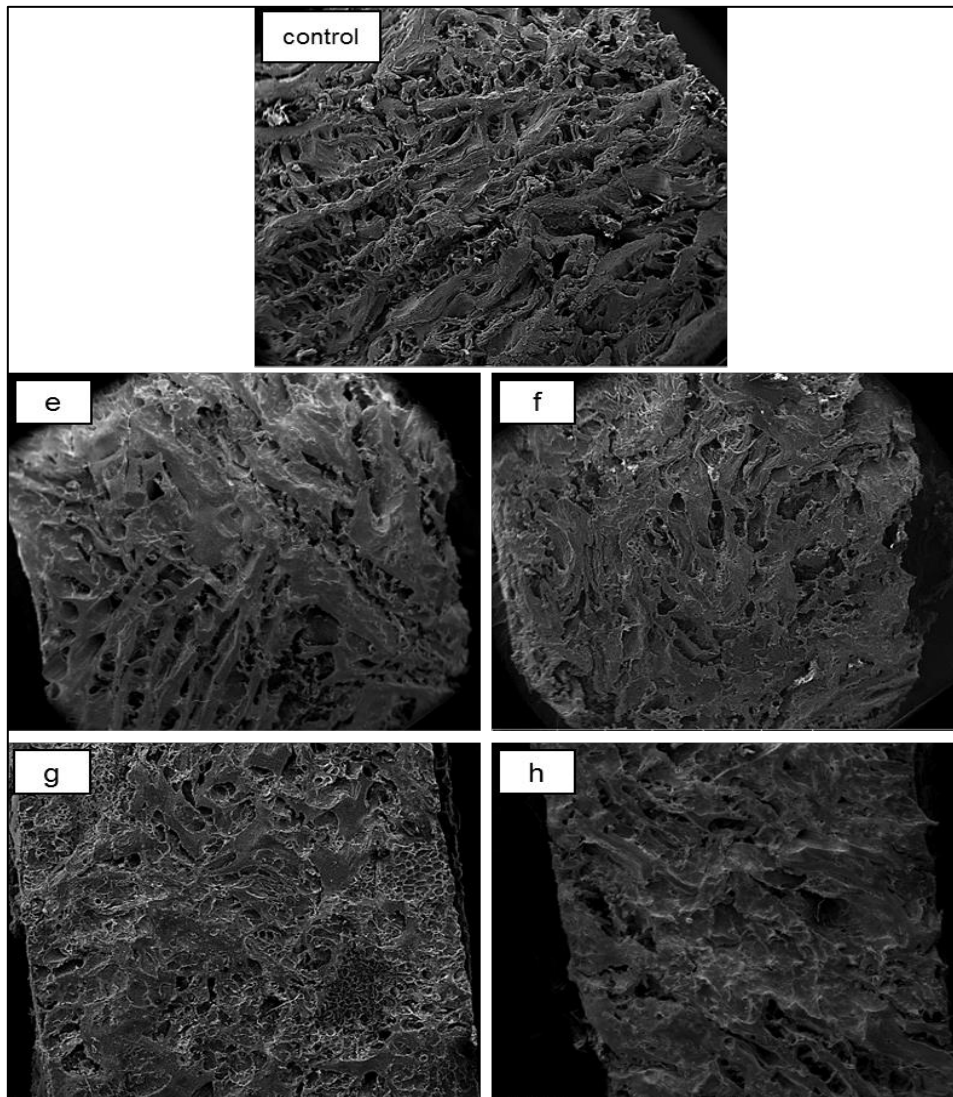


Figura 4.77. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (60X) de muestras de hamburguesas. Control: sin aditivos ni tratamiento con APH; e: 2 % NaCl, 0,1 %

extracto romero, 200 MPa; f: 0,1 % extracto de romero, 600 MPa; g: 2 % NaCl, 0,1 % extracto de romero, 600 MPa; h: 1 % NaCl, 200 MPa. Además, todas las muestras tuvieron 0,5 % TPFS.

La micrografía “e” de la Figura 4.77 (2 % NaCl, 0,1 % extracto de romero, 200 MPa) presenta una estructura más homogénea y compacta. A aumentos mayores (250X – Figura 4.78-e) se observa un importante efecto sobre las fibras en el interior de los haces, presentando estos una estructura empaquetada/compacta.

En la micrografía “f” de la Figura 4.77 (0,1 % extracto de romero, 600 MPa) se observa una estructura más homogénea que en el caso de la carne picada. Con aumentos de 250X (Figura 4.78-f) se observan haces de fibras, los cuales presentan una estructura empaquetada/compacta.

En la micrografía “g” de la Figura 4.77 (2 % NaCl, 0,1 % extracto de romero, 600 MPa) se observa una estructura muy compacta, tipo pasta. Con aumentos mayores (250X - Figura 4.78-g) se observan haces de fibras, los cuales presentan una estructura muy empaquetada/compacta, como en el caso de la micrografía “f”.

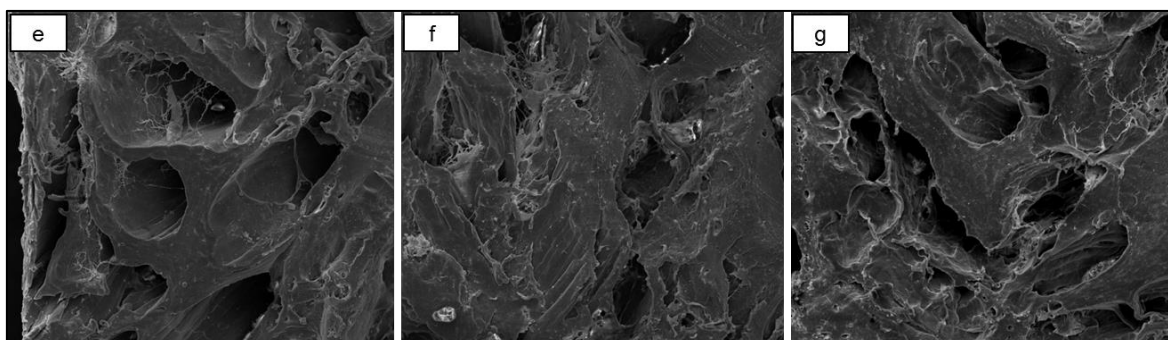


Figura 4.78. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (250X) de muestras de hamburguesas. Control: sin aditivos ni tratamiento con APH; e: 2 % NaCl, 0,1 % extracto de romero, 200 MPa; f: 0,1 % extracto de romero, 600 MPa; g: 2 % NaCl, 0,1 % extracto de romero, 600 MPa. Además, todas las muestras tuvieron 0,5 % TPFS.

La micrografía “h” de la Figura 4.77 (1 % NaCl, 200 MPa) y la micrografía “i” de la Figura 4.80 (1 % NaCl, 0,2 % extracto de romero, 200 MPa) presentan estructuras homogéneas y compactas. A aumentos de 250X para ambas muestras (Figura 4.79) se observan haces de fibras en cortes longitudinales y transversales, presentando una estructura con cierto grado de compactación.

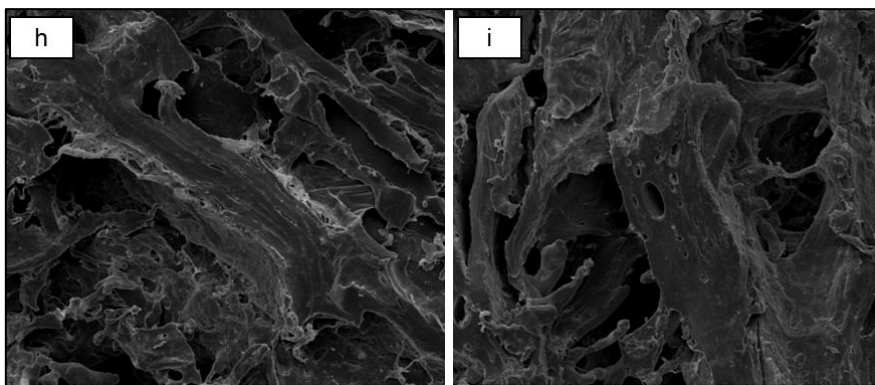


Figura 4.79. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (250X); h: 1 % NaCl, 200 MPa; i: 1 % NaCl, 0,2 % extracto de romero, 200 MPa. Además, todas las muestras tuvieron 0,5 % TPFS.

En las micrografías “j” (1 % NaCl, 600 MPa); “k” (1 % NaCl, 0,2 % extracto de romero, 600 MPa) y “l” (1 % NaCl, 0,1 % extracto de romero, 400 MPa) de la Figura 4.80 se observan estructuras homogéneas y compactas. Con aumentos mayores (250X - Figura 4.81) se observan haces de fibras en cortes longitudinales y transversales, con un importante nivel de compactación de las fibras.

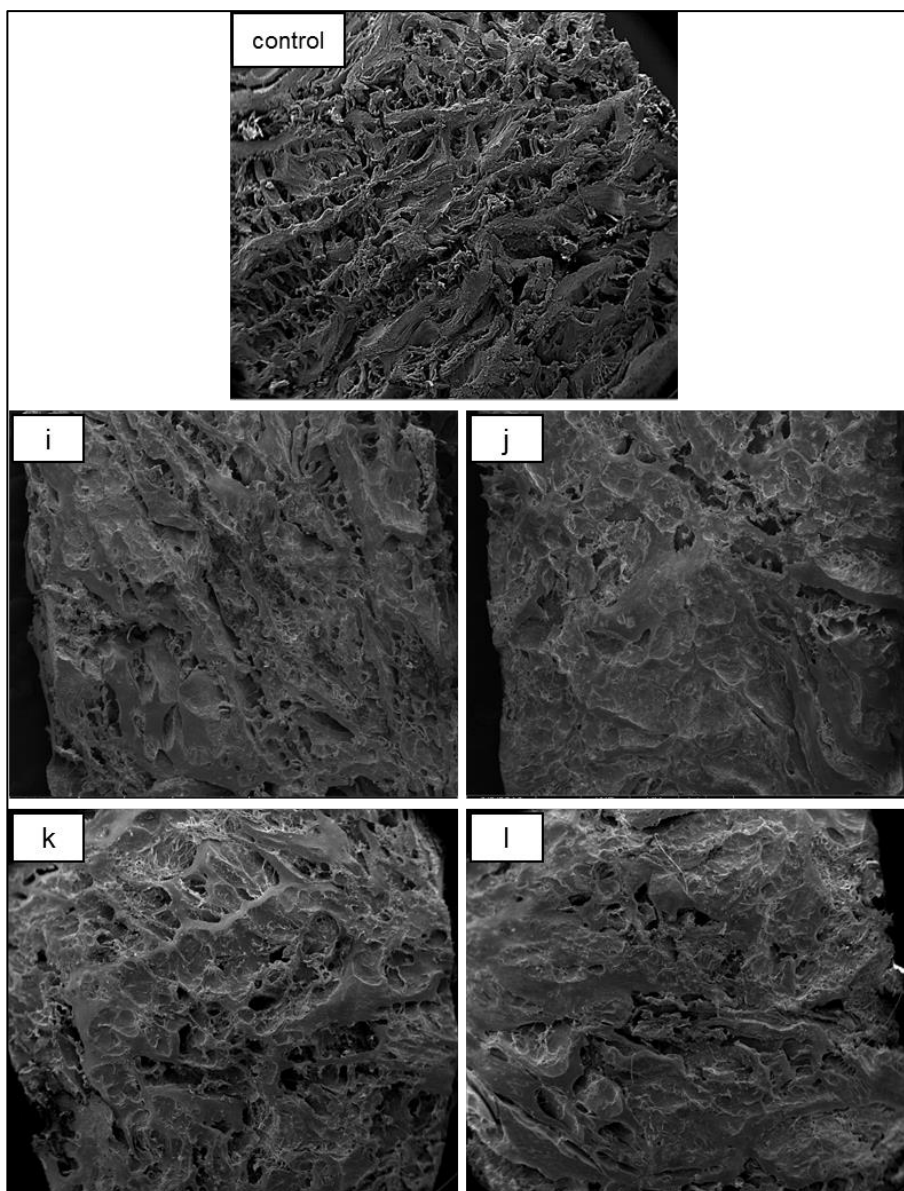


Figura 4.80. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (60X) de muestras de hamburguesas. Control: sin aditivos ni tratamiento con APH; i: 1 % NaCl, 0,2 % extracto de romero, 200 MPa; j: 1 % NaCl, 600 MPa; k: 1 % NaCl, 0,2 % extracto de romero, 600 MPa; l: 1 % NaCl, 0,1 % extracto de romero, 400 MPa. Además, todas las muestras tuvieron 0,5 % TPFS.

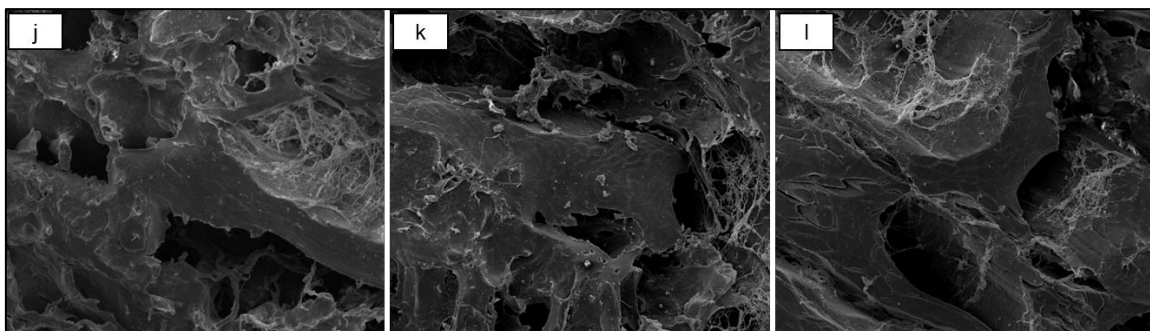


Figura 4.81. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (250X); j: 1 % NaCl, 600 MPa; k: 1 % NaCl, 0,2 % extracto de romero, 600 MPa; l: 1 % NaCl, 0,1 % extracto de romero, 400 MPa. Además, todas las muestras tuvieron 0,5 % TPFS.

El estudio mediante microscopía electrónica de barrido permitió establecer que los principales efectos sobre la microestructura del tejido cárnico se debieron al picado de la carne para la preparación de las hamburguesas, a la incorporación de NaCl y TPFS y al tratamiento con APH. La incorporación de NaCl en concentraciones crecientes hasta 2 % y 0,5 % TPFS incrementaron la fuerza iónica y el pH del tejido cárnico, permitiendo una mejor extracción y solubilización de proteínas miofibrilares y un incremento de la hidratación de las miofibrillas. Las fibras con mayor nivel de hidratación y las proteínas extraídas determinaron que los haces de fibras presenten una topografía homogénea y una importante compactación de las fibras. La incorporación de extracto de romero no tuvo ningún efecto sobre la microestructura del tejido. Con relación al efecto del nivel de presión, se observó que el incremento de este produjo un aumento de la compactación de las fibras. Este resultado guarda relación con lo informado por González y col. (2009) respecto al efecto del tratamiento con APH sobre la microestructura de carne bovina fresca. Estos autores informaron que el análisis cualitativo y cuantitativo de las micrografías de muestras de carne bovina fresca obtenidas por CryoSEM indicó que la aplicación de una presión de 400 MPa a 20 °C no afectó significativamente el tejido cuando el tiempo de tratamiento fue 1 min., mientras que a mayor tiempo de tratamiento se apreció la compactación del tejido. A su vez, el aumento de la presión a 650 MPa durante 5 min afectó la forma de las fibras, observándose mayor elongación de estas.

4.3.11 Conclusión

Las hamburguesas elaboradas con la incorporación de antioxidantes y tratadas con APH mostraron modificaciones en sus propiedades tecnológicas, fisicoquímicas y bioquímicas, presentando efectos negativos y positivos. A medida que

el nivel de presión fue incrementado desde 200 a 600 MPa, los efectos sobre los parámetros estudiados fueron cada vez más importantes, observándose efectos negativos como la decoloración de las hamburguesas y el incremento de pérdida de peso por cocción. Sin embargo, la combinación de APH con la incorporación de NaCl y TPFS en la elaboración de las hamburguesas mejoró las propiedades texturales de estas, incrementando la cohesión entre las partículas cárnicas. Por otra parte, la oxidación de los lípidos (número de TBARS) en las hamburguesas no se vio afectado por el incremento del nivel de presión, pero sí por el aumento de la concentración de NaCl. Además, la incorporación de extracto de romero contribuyó a disminuir la oxidación en el rango 0,1 a 0,2 % mientras que a concentraciones inferiores a 0,1 % tuvo efecto prooxidante en las hamburguesas cuando estas fueron tratadas con APH. La incorporación de Eritorbato de Sodio contribuyó a reducir el aumento de la luminosidad inducido por el incremento del nivel de presión. Además, ese aditivo incrementó en forma significativa la capacidad antioxidante de las hamburguesas.

En relación con los recuentos de la microbiota alteradora de las hamburguesas se lograron hasta 6 reducciones decimales, por lo que el tratamiento con APH es un método eficiente para reducir los recuentos de los microorganismos alteradores de las hamburguesas y extender su vida útil.

En cuanto a la evaluación de las proteínas cárnicas, estas presentaron desnaturalización, agregación y solubilización, efectos que también fueron dependientes de las sales que se incorporan en la elaboración de las hamburguesas. El incremento de la concentración de NaCl y del nivel de presión aumentó la desnaturalización y la insolubilización de las proteínas, además se observó que los tratamientos a 400 y 600 MPa tuvieron efectos similares en la desnaturalización de las proteínas. Los principales efectos sobre la microestructura del tejido cárnico se debieron al picado de la carne para la preparación de las hamburguesas, a la incorporación de NaCl y TPFS y al tratamiento con APH. La incorporación de extracto de romero no tuvo ningún efecto sobre la microestructura del tejido. La incorporación de sales mejoró la extracción y solubilización de proteínas miofibrilares e incrementó la hidratación de las miofibrillas, determinando que los haces de fibras presentasen una topografía más homogénea y una importante compactación de las fibras. Con relación al efecto del nivel de presión, se observó que el incremento de este produjo un aumento de la compactación de las fibras.

4.4. Evaluación del efecto del tratamiento con APH y de la formulación sobre la inactivación de un coctel de cepas nativas de STEC O157 inoculado en hamburguesas de carne bovina

El interior de los cortes enteros o músculos generalmente está libre de microorganismos, entre ellos los patógenos. Durante la faena la carcasa bovina se cuelga desde los cuartos traseros, por lo que la superficie de los cortes del cuarto delantero presenta mayor riesgo de contaminación por microorganismos patógenos presentes en el tracto gastrointestinal. Los productos cárnicos elaborados a partir de esos cortes cárnicos tendrían mayor riesgo de presentar contaminación por bacterias patógenas como *Escherichia coli* productores de toxina Shiga (STEC).

Globalmente, *Escherichia coli* O157:H7 (STEC O157) es el serotipo prevalente y al que se le atribuye mayor potencial epidémico. En Argentina, según estadísticas del INEI “Dr. Carlos G. Malbrán”, STEC O157 es también el predominante en la enfermedad humana, con más del 70 % de los casos, seguido del serotipo O145:NM con 13,6 %. La relevancia de los STEC en brotes alimentarios emergió en la década de los 80 en EE. UU. cuando dos brotes fueron asociados a hamburguesas contaminadas con STEC O157 (Riley y col., 1983). A partir de ese momento se ha demostrado repetidamente el fuerte vínculo epidemiológico entre el consumo de hamburguesas, los STEC y el síndrome urémico hemolítico (SUH). En la actualidad, las principales vías conocidas de transmisión de STEC son el consumo de alimentos cárnicos, el contacto directo con el ganado, las aguas contaminadas con deyecciones de los bovinos, y últimamente con mayor relevancia, los vegetales frescos como las espinacas (Centers for Disease Control and Prevention, consultado en octubre de 2017). En Argentina, los brotes de ETA por STEC se dan en forma esporádica y consisten en pocos casos por brote, por lo tanto, rastrear su origen resulta más difícil. Sin embargo, en Argentina, un estudio de casos control estableció que el consumo de carne poco cocida es el factor de riesgo más relevante en el caso de STEC O157 (Rivas y col., 2008). Con el fin de disminuir la exposición de la población a STEC, y el riesgo de la ETA asociada, se han propuesto medidas preventivas para las distintas etapas de la cadena agroalimentaria. Sobre el ganado en pie, y para reducir la excreción de STEC al medio ambiente, se han propuesto dos alternativas principales: la aplicación de vacunas específicas para STEC O157 o STEC genérico (Moxley y col., 2009), y el uso de bacterias probióticas en la alimentación animal (Brashears y col., 2003); también y con menor grado de desarrollo se hallan bajo estudio el empleo de bacteriófagos específicos contra STEC O157 (Sheng y col., 2006). En la etapa de

faena también se pueden aplicar tratamientos para reducir la prevalencia y el número de STEC en cueros y carcasas, tales como duchas con ácidos orgánicos débiles, o vapor antes de la entrada en cámara (Berry y Cutter, 2000). Estos métodos permitirían reducir la prevalencia y contaminación de STEC en la materia prima cárnica, sin embargo, no aseguran la eliminación del microorganismo en los productos cárnicos que llegan al consumidor. Para obtener los más altos niveles de protección es necesaria su complementación con otros procesos tecnológicos capaces de lograr la inactivación del microorganismo en el producto final.

Los tratamientos con APH a temperatura ambiente o de refrigeración permiten inactivar microorganismos vegetativos patógenos o alteradores. Es por ello que las APH han sido investigadas y aplicadas como método de pasteurización fría de productos comerciales (Heinz y Buckow, 2010). En estos productos, además del aseguramiento de la inocuidad y de la extensión de la vida útil, también se aprovecha las ventajas que brinda esta tecnología en relación con la reducción o eliminación de conservantes (etiquetado limpio), para ofrecer al mercado productos más naturales. Otra ventaja es el reconocimiento por parte de organismos de control (Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria, dependiente del USDA, EE. UU. y el Instituto de Salud de Canadá, entre otros) de las APH como proceso de pasteurización que permite controlar patógenos relevantes en productos cárnicos de origen bovino, porcino y aviar.

La inactivación microbiana asociada con APH puede estar relacionada con uno o más factores que incluyen la perturbación de la membrana celular, desnaturalización de proteínas, cambios bioquímicos y macromoleculares (inhibición de la síntesis ADN, ARN o síntesis de proteínas) así como cambios en el pH intracelular relacionados con la inactivación de las enzimas y el daño de la membrana (Smelt, 1998; Kato y Hayashi, 1999; Smelt y col., 2001; Molina-Gutierrez y col., 2002; Mañas y Mackey, 2004; Knorr y col., 2011).

A pesar del uso comercial actual de las APH, aún existen aspectos que limitan el uso generalizado de esta tecnología en la preservación de alimentos (Gänzle y Liu, 2015). Entre ellos se encuentra la resistencia bacteriana a la presión, la cual exhibe una gran variabilidad intra-especie. Además, el efecto bactericida de la presión es altamente dependiente de la matriz alimenticia y a menudo se requiere una evaluación caso por caso.

En relación con *E. coli*, algunas cepas, incluidas las STEC, resistieron a los tratamientos con APH a presiones de hasta 600 MPa y a temperatura ambiente (Benito y col., 1999; Whitney y col., 2007; Alvarez-Ordoñez y col., 2013; Masana y col., 2015). Además, en estudios que utilizaron cocteles de cepas, se observó una menor letalidad en comparación con aquellos que emplearon cepas individuales. Además de la resistencia a la presión debido a la variación natural entre las cepas de *E. coli* (Benito y col., 1999), se observó una fuerte dependencia con la matriz alimenticia, ya que su composición química puede actuar como protectora e incrementar la baro-resistencia de las bacterias (Omer y col., 2010; Jiang y col., 2015). Así, la resistencia de cepas de *E. coli* en productos cárnicos y lácteos es mayor que en productos preparados en base a frutas (Gänzle y Liu, 2015). En relación al comportamiento de diferentes cepas en distintos productos cárnicos (jamón curado, *carpaccio*, carne picada), algunos estudios informaron una reducción menor a 2 reducciones decimales luego de su tratamiento a 400 o 600 MPa a temperatura ambiente (Black y col., 2010; De Alba y col., 2013; Baccus-Taylor y col., 2015; Masana y col., 2015), mientras que otros estudios informaron una reducción superior a los 5 ciclos logarítmicos (Morales y col., 2008; Omer y col., 2010; Porto-Fett y col., 2010; Hsu y col., 2015; Jiang y col., 2015). Por su parte, Jiang y col. (2015) estudiaron el efecto del tratamiento con APH (400 MPa, 4 ciclos de 60 s, 17 °C) sobre la inactivación de cepas inoculadas de STEC no-O157 en carne bovina picada con diferentes proporciones de carne y grasa (80:20 o 90:10). Estos investigadores observaron que todos los serogrupos estudiados de STEC presentaron una mayor cantidad de células injuriadas en las muestras formuladas con una proporción mayor de grasa (80:20).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tratamiento con APH y de la formulación de las hamburguesas sobre la inactivación de un cóctel de cepas nativas de STEC O157 inoculado en las mismas, así como sobre la inactivación de la microbiota alteradora.

4.4.1 Actividad de agua

La Tabla 4.38 presenta el análisis de los resultados de actividad de agua (a_w) de muestras de hamburguesas elaboradas con distintas formulaciones, A (1 % NaCl, 10 % grasa), B (2 % NaCl, 10 % grasa), C (1 % NaCl, 20 % grasa) y D (2 % NaCl, 20 % grasa) y tratadas con distintos niveles de presión (0,1; 400; 600 MPa). Todas las formulaciones incluyeron 0,5 % de TPFS.

Tabla 4.38. Resultados y análisis de varianza correspondientes a la actividad de agua (a_w) de muestras de hamburguesas con diferentes tratamientos

Nivel de presión (MPa)	Formulación	a_w
0,1	A	0,985 (0,002) ^a
	B	0,977 (0,002) ^b
	C	0,984 (0,003) ^a
	D	0,978 (0,003) ^b
400	A	0,983 (0,003) ^a
	B	0,977 (0,004) ^b
	C	0,984 (0,005) ^a
	D	0,977 (0,001) ^b
600	A	0,984 (0,003) ^a
	B	0,976 (0,003) ^b
	C	0,982 (0,003) ^a
	D	0,977 (0,002) ^b
Valor p del modelo		
MODELO	Nivel de presión	0,185
	Formulación	0,001
	Nivel de presión x Formulación	0,753

Nota: se informa valor medio (desvío estándar). ^{a-b}, indican diferencia significativa por efecto de la formulación ($p \leq 0,001$).

El análisis de varianza correspondiente a los resultados de a_w (Tabla 4.38) mostró efecto significativo ($p \leq 0,001$) de la formulación. Así, las hamburguesas elaboradas con las formulaciones B y D (2 % de NaCl), presentaron valores de a_w significativamente menores que los correspondientes a las hamburguesas elaboradas con las formulaciones A y C (1 % de NaCl). La a_w de un alimento se puede reducir aumentando la concentración de solutos en su fase acuosa, por lo que el incremento de la concentración de NaCl en la formulación de las hamburguesas redujo su a_w . A su vez, la concentración de grasa, en el rango de estudio (10 – 20 %) no afectó la a_w . Por otra parte, no se observó efecto significativo del nivel de presión ($p=0,185$) ni de la interacción de Nivel de presión x Formulación ($p=0,753$).

En general, el término actividad de agua (a_w) se aplicó para tener en cuenta la intensidad con que el agua se asocia a los diferentes componentes no acuosos (Fennema, 2010) y se reconoce que el crecimiento de los microorganismos está significativamente influenciado por la a_w . Sin embargo, algunas bacterias halotolerantes pueden crecer a una a_w tan baja como 0,82 (Grant, 2004). En los siguientes ítems se vinculan estos resultados con la supervivencia de cepas STEC O157 y microbiota nativa en hamburguesas elaboradas con distintas concentraciones de NaCl y grasa, tratadas con diferentes niveles de presión.

4.4.2 Efecto de los distintos tratamientos sobre la inactivación de un coctel de cepas nativas de STEC O157 inoculado en hamburguesas de carne bovina

En las Figuras 4.82 y 4.83 se presenta la supervivencia de STEC O157 en hamburguesas elaboradas con las distintas formulaciones: A (1 % NaCl, 10 % grasa), B (2 % NaCl, 10 % grasa), C (1 % NaCl, 20 % grasa) y D (2 % NaCl, 20 % grasa) y tratadas con distintos niveles de presión (0,1; 400; 600 MPa); todas las formulaciones incluyeron 0,5 % de TPFS. La población de STEC O157 fue cuantificada en un medio de cultivo no selectivo (*tryptic soy agar* - TSA) y un medio selectivo (sorbitol MacConkey agar - SMAC), según se indicó en el ítem 3.6.10 del Capítulo 3.

En el caso de la cuantificación en TSA (Figura 4.82), los resultados presentaron diferencias entre los distintos tratamientos, tanto por efecto de la formulación como por el nivel de presión. En las muestras que no fueron tratadas con APH (0,1 MPa) se observó que los recuentos de STEC O157 correspondieron a la concentración de células (7 Log₁₀ UFC/g) que se inoculó en las hamburguesas (Figura 4.80). A su vez, en las muestras sin presurizar (0,1 MPa), no se observaron diferencias en los recuentos de STEC O157 por efecto de la formulación. Cuando el nivel de presión aplicado fue de 400 MPa, se observó reducción en los recuentos de STEC O157, cuantificándose 4,87 y 4,94 Log₁₀ UFC/g en las hamburguesas correspondientes a las formulaciones A y C, respectivamente. A su vez, en las hamburguesas correspondientes a las formulaciones B y D tratadas a 400 MPa, los recuentos de STEC O157 fueron 5,35 y 5,69 Log₁₀ UFC/g. Con la aplicación de 600 MPa la supervivencia de la población de STEC O157 fue menor que a 400 MPa, presentando recuentos de 2,86; 3,40; 3,27; y 3,62 Log₁₀ UFC/g en las formulaciones A, B, C y D, respectivamente.

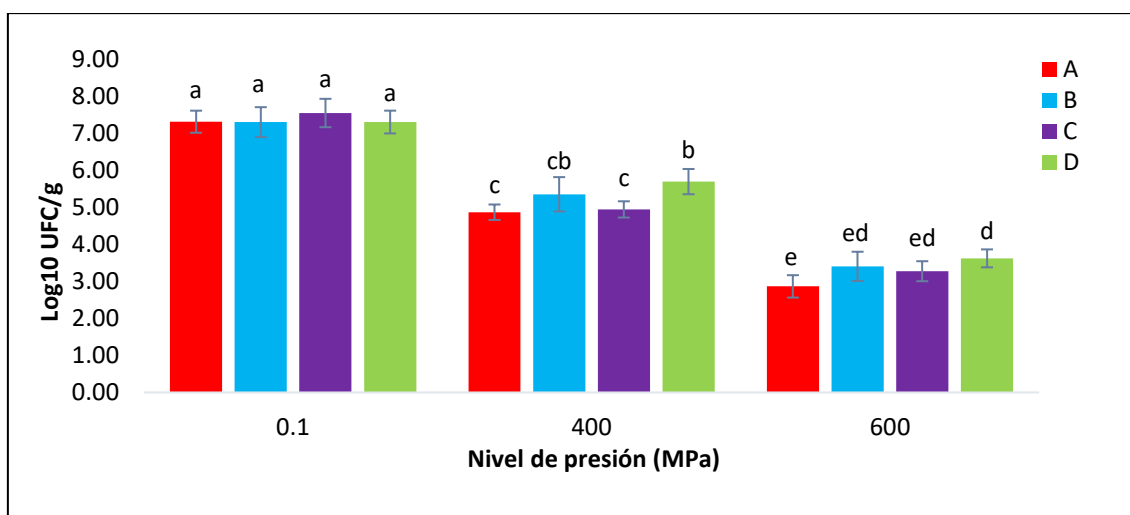


Figura 4.82. Supervivencia de STEC O157 en hamburguesas elaboradas con diferentes formulaciones, tratadas con distintos niveles de presión, cuantificadas en un medio de cultivo no selectivo (*tryptic soy agar* – TSA). ^{a,b,c,d,e} indican efecto significativo de la interacción Presión x Formulación ($p < 0,01$).

Cuando la cuantificación de STEC O157 se realizó en un medio selectivo (SMAC), el tratamiento a 400 MPa redujo los recuentos de STEC O157 a 4,06 y 3,91 Log₁₀ UFC/g en las hamburguesas correspondientes a las formulaciones A y C, respectivamente. A su vez, en las hamburguesas de las formulaciones B y D los recuentos fueron 4,26 y 4,80, respectivamente. Además, en las muestras tratadas a 600 MPa, no se detectó supervivencia de STEC O157 para ninguna de las formulaciones (Figura 4.83).

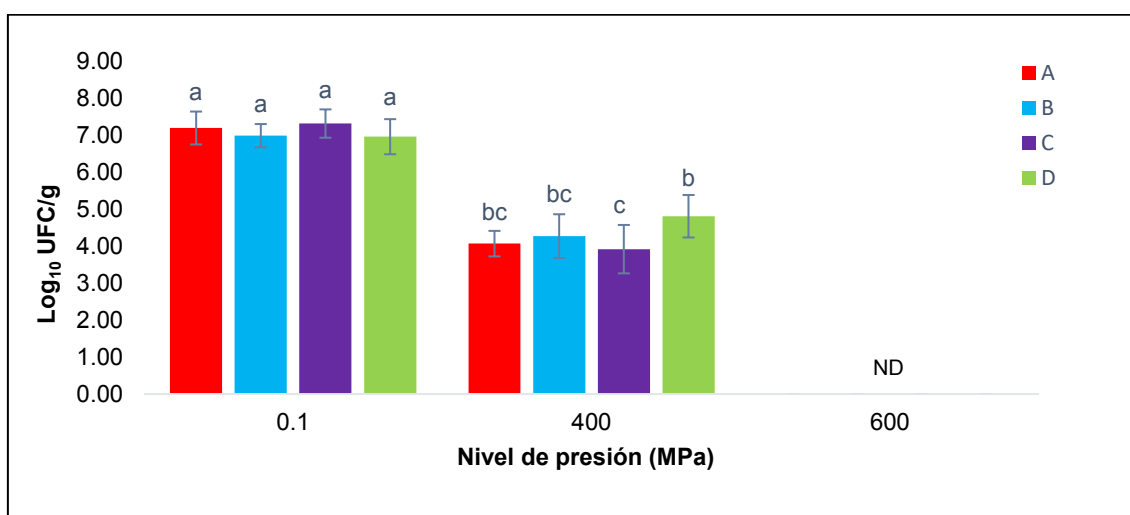


Figura 4.83. Supervivencia de STEC O157 en hamburguesas elaboradas con diferentes formulaciones, tratadas con distintos niveles de presión, cuantificadas en un medio selectivo (sorbitol MacConkey agar – SMAC). NDC (no se detectó crecimiento).

^{a,b,c} indican efecto significativo de la interacción Presión x Formulación ($p < 0,01$).

La cuantificación de la supervivencia tanto en el medio selectivo como en el no selectivo mostró que las hamburguesas formuladas con la menor concentración de NaCl (1 %, formulaciones A y C) presentaron los menores recuentos de STEC O157, aunque no difirieron estadísticamente de la formulación B (2 % NaCl, 10 % grasa). Además, las hamburguesas formuladas con mayor concentración de NaCl (2 %) y de grasa (20 %) presentaron los mayores recuentos. También se observó que el incremento del nivel de presión determinó la reducción de los recuentos de STEC O157.

En la Tabla 4.39 se presentan las reducciones decimales de STEC O157 en hamburguesas elaboradas con distintas formulaciones y tratadas con diferentes niveles de presión. Los resultados del análisis de varianza determinaron un efecto significativo ($p < 0,01$) de la formulación (A, B, C y D) y del nivel de presión (400 y 600 MPa).

Tabla 4.39. Reducciones decimales de STEC O157 en hamburguesas elaboradas con distintas formulaciones y tratadas con diferentes niveles de presión

Nivel de presión (MPa)	Formulación	STEC O157	
		Reducciones decimales (ciclos Log ₁₀ UFC/g) - TSA	Reducciones decimales (ciclos Log ₁₀ UFC/g) - SMAC
400	A	2,44 (0,46) ^{Ba}	3,12 (0,75) ^{Ba}
	B	1,95 (0,70) ^{Bb}	2,71 (0,66) ^{Bab}
	C	2,60 (0,51) ^{Ba}	3,39 (0,76) ^{Ba}
	D	1,61 (0,51) ^{Bb}	2,15 (0,84) ^{Bb}
600	A	4,45 (0,50) ^{Aa}	7,18 (0,44) ^{Aa}
	B	3,89 (0,63) ^{Ab}	6,98 (0,31) ^{Aab}
	C	4,27 (0,53) ^{Aa}	7,30 (0,38) ^{Aa}
	D	3,68 (0,41) ^{Ab}	6,95 (0,47) ^{Ab}
Valor p del modelo			
MODELO	Nivel de presión	0,001	0,001
	Formulación	0,001	0,003
	Nivel de presión x Formulación	0,732	0,191

Nota: se informa valor medio (desvío estándar). ^{A-B}, indican diferencias significativas por efecto del nivel de presión; ^{a-b}, indican diferencias significativas por efecto de la formulación. Nivel de significancia $p < 0,01$. TSA: *tryptic soy agar*; SMAC: sorbitol MacConkey agar.

Las reducciones decimales de STEC O157 cuantificadas en TSA, para el caso de hamburguesas preparadas con formulaciones B y D (2 % de NaCl) y tratadas a 400 MPa, fueron 1,95 y 1,61 ciclos Log₁₀ UFC/g, respectivamente. Estas resultaron significativamente menores ($p < 0,01$) que las reducciones decimales determinadas en las hamburguesas preparadas con las formulaciones A y C (1 % de NaCl), las cuales

fueron 2,44 y 2,60 ciclos Log_{10} UFC/g, respectivamente. A su vez, en las hamburguesas tratadas a 600 MPa, las preparadas con las formulaciones B y D presentaron reducciones decimales (3,89 y 3,68 ciclos Log_{10} UFC/g, respectivamente) significativamente menores ($p < 0,01$) que las correspondientes a las formulaciones A y C (4,45 y 4,27 ciclos Log_{10} UFC/g, respectivamente). También resulta importante indicar que la concentración de grasa no tuvo efecto significativo ($p > 0,01$) sobre la inactivación de STEC O157.

En relación con las reducciones decimales de STEC O157 cuantificadas en SMAC, para el caso de hamburguesas tratadas a 400 MPa, las hamburguesas preparadas con las formulaciones A (1 % de NaCl y 10 % de grasa), y C (1 % de NaCl y 20 % de grasa) presentaron valores significativamente mayores ($p < 0,01$) que la correspondiente a la formulación D (2 % de NaCl y 20 % de grasa). En esos casos las reducciones decimales fueron 3,12; 3,39 y 2,15 ciclos Log_{10} UFC/g, para A, C y D, respectivamente. En el caso de las hamburguesas tratadas a 600 MPa, el efecto de la formulación fue similar al observado en las tratadas a 400 MPa, aunque las reducciones decimales fueron mayores en el caso de los tratamientos a 600 MPa: 7,18; 7,30 y 6,95 para A, C y D, respectivamente.

Con relación al efecto del nivel de presión, en la Tabla 4.39 se observa, que tanto para la cuantificación mediante TSA como por SMAC, las hamburguesas tratadas a 400 MPa presentaron valores de reducciones decimales significativamente ($p < 0,01$) menores que los observados en las hamburguesas tratadas a 600 MPa.

Las diferencias observadas en los recuentos cuantificados por TSA y SMAC (Figuras 4.82 y 4.83) y en las reducciones decimales (Tabla 4.39) se deben a que en el medio no selectivo (TSA) se pueden desarrollar tanto células sanas como injuriadas, mientras que en el medio selectivo (SMAC) solo desarrollan células sanas. Entonces, las reducciones decimales calculadas mediante los recuentos determinados con TSA, corresponden a la letalidad celular producida por los tratamientos. A su vez, las diferencias entre los recuentos determinados mediante TSA y los correspondientes a SMAC permiten evaluar la injuria celular. En función de los resultados observados en la Tabla 4.39 se puede concluir que las mayores letalidades se observaron en las hamburguesas preparadas con las formulaciones A y C, tratadas tanto a 400 MPa (reducciones decimales 2,44 y 2,60) como a 600 MPa (reducciones decimales 4,45 y 4,27). A su vez, el tratamiento a 600 MPa produjo mayor cantidad de células injuriadas que el tratamiento a 400 MPa. En este sentido se puede observar que las células cuantificadas con TSA en las muestras tratadas a 600 MPa (Figura 4.82),

correspondieron a células injuriadas, ya que no se observaron recuentos en la cuantificación con SMAC en las muestras tratadas con ese nivel de presión (Figura 4.83).

En función de lo detallado en los párrafos precedentes se puede indicar que las hamburguesas que tuvieron menor a_w por la incorporación de 2 % de NaCl (B y D), fueron las que presentaron menores reducciones decimales de STEC O157 en comparación con las hamburguesas que tuvieron 1 % de NaCl (A y C). La reducción de la a_w de un medio o de un alimento, mediante la adición de solutos como azúcares y sales en altas concentraciones, aumenta la resistencia microbiana a los tratamientos térmicos (Cerf y col., 1996; Jung y Beuchat, 1999) y al tratamiento con APH (Oxen y Knorr, 1993; Patterson y col., 1995; Palou y col., 1997; Simpson y Gilmour, 1997; Van Opstal y col., 2003; Patterson, 2005; Jofré y col., 2009). En consecuencia, la reducción de a_w protege a las células vegetativas contra los efectos de la alta presión, ejerciendo un efecto baroprotector sobre los microorganismos, aun cuando los microorganismos que no son barorresistentes son generalmente más sensibles a valores bajos de a_w (Cheftel y Culioli, 1997). Se ha sugerido que la reducción de a_w puede provocar la contracción celular y el engrosamiento de la membrana celular, lo que reduce la permeabilidad y fluidez de la membrana. (Oxen y Knorr, 1993; Takahashi y col., 1993; Knorr, 1995; Palou y col., 1997; Molina-Höppner y col., 2004), estas características favorecerían a la resistencia de la bacteria contra la alta presión.

Con respecto al tratamiento con APH, estudios previos indicaron que las bacterias Gram negativas son más sensibles a la presurización que las bacterias Gram positivas (Kelemen y Sharpe, 1979; Shigehisa y col., 1991; Carlez y col., 1994; Vachon y col., 2002; Wuytack y col., 2002). Esto respalda la propuesta que indica que el tratamiento con APH inactiva bacterias vegetativas principalmente a través de una disrupción mecánica de la membrana, porque las bacterias Gram positivas tienen una capa de peptidoglicano más gruesa y por lo tanto tienen una mayor resistencia mecánica en comparación con las Gram negativas. Sin embargo, la resistencia de los microorganismos es variable, dependiendo de la cepa y la matriz del alimento. Simpson y Gilmour (1997) indicaron que la capacidad de las bacterias para sobrevivir al procesamiento con APH puede incrementar cuando se presurizan productos con alto valor nutricional, como, por ejemplo, la carne, que contiene componentes como carbohidratos, proteínas y grasa. Zhang y Rock (2008) mencionaron que la supervivencia bacteriana depende de la capacidad de ajustar la composición lipídica para aclimatar las células a diferentes entornos. Por lo tanto, los factores de

resistencia de las bacterias a la presurización son diversos, pero en general los tratamientos con APH a niveles mayores a 400 MPa a temperaturas de refrigeración, ambiente o moderada causan la inactivación de células vegetativas microbianas.

Los resultados del presente estudio demuestran que las máximas letalidades de STEC O157 se lograron en hamburguesas elaboradas con 1 % de NaCl, siendo de 2,6 y 4,45 reducciones decimales con la aplicación de 400 y 600 MPa, respectivamente. Vanlint y col. (2012) indicaron que las cepas de *Escherichia coli* se encuentran entre las células bacterianas más resistentes al tratamiento con alta presión. Masana y col. (2015) informaron alta barorresistencia de cepas STEC O157 nativas de Argentina, en un estudio realizado con *carpaccio* de carne bovina. Esos autores informaron un máximo de 2 reducciones decimales en el caso de *carpaccio* tratado congelado a 600 MPa durante 5 min y de 1,19 reducciones decimales en *carpaccio* tratado sin congelar en las mismas condiciones de presión y tiempo. Estudios previos sobre la inactivación de STEC O157 en carne picada informaron que la aplicación de 400 MPa a 25 °C durante 15 min produjo 3 reducciones decimales (Zhou y col., 2016); mientras que Hsu y col., (2015) informaron que la aplicación de 450 MPa durante 15 min fue suficiente para alcanzar 5 reducciones decimales.

En el presente estudio se observó también que el tratamiento con APH produjo injuria celular, principalmente la presurización a 600 MPa durante 5 min. Ese efecto también fue informado por Masana y col. (2015) para cepas nativas de STEC O157 inoculadas en *carpaccio* de carne bovina, el cual fue tratado a 600 MPa durante 5 min. A su vez, Jiang y col. (2015) informaron que el tratamiento con APH (400 MPa, 4 ciclos de 60 s, 17 °C) produjo injuria celular en cepas de STEC no-O157 inoculadas de carne bovina picada. Estos investigadores observaron que todos los serogrupos de STEC que estudiaron presentaron una mayor cantidad de células injuriadas en las muestras formuladas con una proporción mayor de grasa (20 %).

4.4.3 Análisis del efecto de los distintos tratamientos en la inactivación de la microbiota alterante en hamburguesas

La Figura 4.84 presentan los recuentos correspondientes a la microbiota alteradora (Enterobacterias, aerobios mesófilos, bacterias ácido-lácticas y aerobios psicrótrofos) en hamburguesas elaboradas con distintas formulaciones: A (1 % NaCl, 10 % grasa), B (2 % NaCl, 10 % grasa), C (1 % NaCl, 20 % grasa) y D (2 % NaCl, 20 % grasa) y tratadas con distintos niveles de presión (0,1; 400; 600 MPa). Además, todas las hamburguesas incluyeron 0,5 % de TPFS.

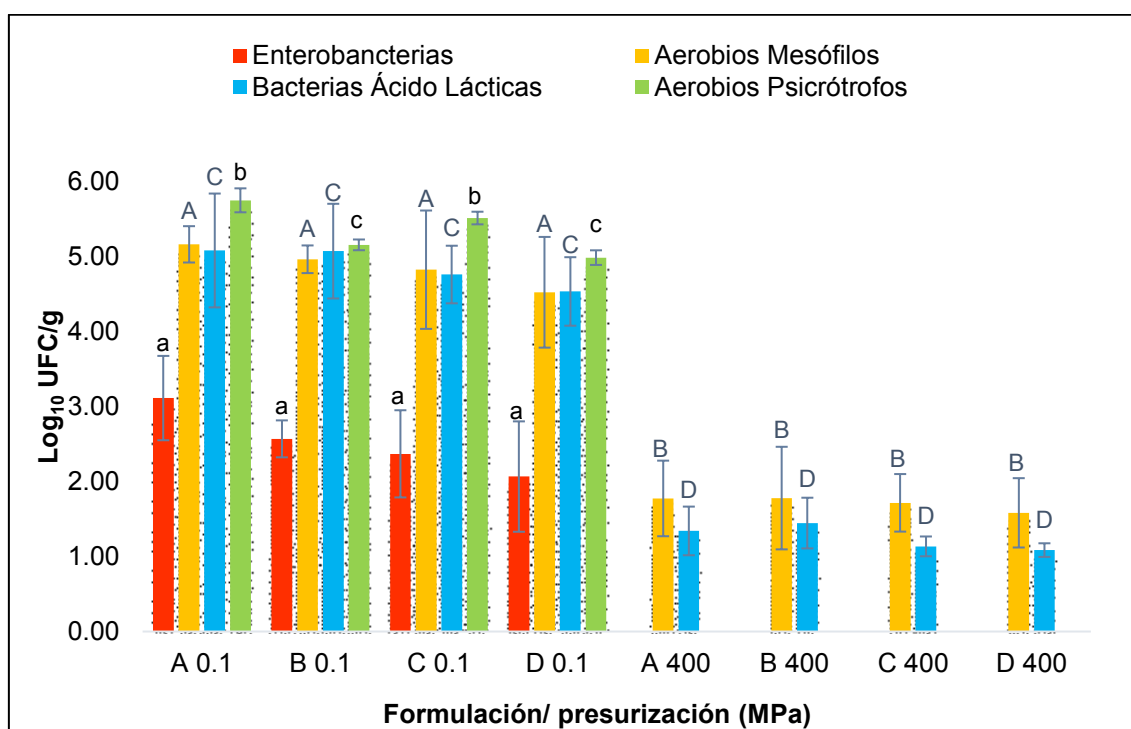


Figura 4.84. Recuentos de microbiota alteradora en hamburguesas elaboradas con distintas formulaciones y tratadas con diferentes niveles de presión. ^{a,b,c} indican diferencia significativa de la formulación ($p < 0,01$), ^{A,B,C,D} indican diferencia significativa del nivel de presión. El análisis de los recuentos se realizó por grupo bacteriano.

Con relación a las Enterobacterias y para el caso de las muestras sin presurizar (0,1 MPa), los recuentos fueron de 3 Log₁₀ UFC/g en las hamburguesas correspondientes a la formulación A y de 2 Log₁₀ UFC/g en las de la formulación D, presentando valores intermedios a esos en las formulaciones B y C. A su vez, en el caso de las muestras tratadas a 400 MPa no se observó supervivencia de Enterobacterias para ninguna de las formulaciones evaluadas. Los recuentos de aerobios mesófilos y bacterias ácido-lácticas estuvieron entre 4 y 5 Log₁₀ UFC/g, en las muestras correspondientes a las distintas formulaciones y sin la aplicación de APH (0,1 MPa). Luego de la aplicación de 400 MPa, los recuentos de aerobios mesófilos y bacterias ácido-lácticas estuvieron por debajo del límite de detección (<2 Log₁₀ UFC/g), con independencia de la formulación estudiada. A su vez, los recuentos de aerobios psicrótrofos estuvieron entre 5 y 6 Log₁₀ UFC/g en las muestras correspondientes a las distintas formulaciones y sin la aplicación de APH (0,1 MPa). Además, en las muestras tratadas a 400 MPa no se detectó supervivencia de psicrótrofos para ninguna de las formulaciones estudiadas. En las hamburguesas preparadas con las distintas formulaciones y tratadas a 600 MPa no se observó

supervivencia de la microbiota alteradora analizada, por lo que no se presentan resultados en la Figura 4.84.

Las Tablas 4.40 y 4.41 presentan las reducciones decimales observadas para la microbiota alteradora en hamburguesas elaboradas con diferentes formulaciones y tratadas con APH, observándose efectos significativos ($p < 0,01$) de la formulación (A, B, C y D) y del nivel presión (400 y 600 MPa).

Tabla 4.40. Reducciones decimales de aerobios mesófilos y bacterias ácido-lácticas en hamburguesas elaboradas con distintas formulaciones y tratadas con diferentes niveles de presión

Nivel de presión (MPa)	Formulación	Reducciones decimales (ciclos Log ₁₀ UFC/g)	
		Aerobios Mesófilos	Bacterias Ácido-Lácticas
400	A	3,39 (0,34) ^{Ba}	3,49 (0,86) ^B
	B	3,18 (0,28) ^{Bab}	3,37 (0,73) ^B
	C	3,11 (0,59) ^{Bab}	3,37 (0,89) ^B
	D	2,94 (0,71) ^{Bb}	3,20 (0,84) ^B
600	A	4,16 (0,28) ^{Aa}	4,08 (0,60) ^A
	B	3,96 (0,47) ^{Aab}	4,07 (0,78) ^A
	C	3,82 (0,39) ^{Aab}	3,76 (0,48) ^A
	D	3,52 (0,14) ^{Ab}	3,53 (0,56) ^A
Valor p del modelo			
MODELO	Nivel de Presión	0,001	0,001
	Formulación	0,008	0,602
	Nivel de Presión x Formulación	0,911	0,942

Nota: se informa valor medio (desvío estándar). ^{A-B}, indican diferencias significativas por efecto del nivel de presión; ^{a-b}, indican diferencias significativas por efecto de la formulación. Nivel de significancia, $p < 0,01$. Las reducciones logarítmicas correspondientes a los tratamientos a 600 MPa se determinaron considerando el límite de detección de la metodología (1 Log₁₀ UFC/g), ya que en las muestras tratadas a este nivel de presión no se observó crecimiento.

Las reducciones decimales de aerobios mesófilos fueron afectadas significativamente ($p < 0,01$) por la formulación y por el nivel de presión (Tabla 4.40). Tanto en las hamburguesas tratadas a 400 como a 600 MPa, las únicas reducciones decimales que difirieron significativamente ($p < 0,01$) fueron las correspondientes a las muestras preparadas con las formulaciones A y D, las que presentaron reducciones decimales de 3,39 y 2,94 Log₁₀ UFC/g a 400 MPa y de 4,16 y 3,52 Log₁₀ UFC/g a 600 MPa. Respecto al efecto del nivel de presión, en la Tabla 4.40 se observa que las hamburguesas tratadas a 400 MPa presentaron reducciones decimales de aerobios mesófilos significativamente ($p < 0,01$) menores que las observadas en las hamburguesas tratadas a 600 MPa.

Con relación a las bacterias ácido-lácticas, las reducciones decimales fueron afectadas significativamente ($p < 0,01$) por el nivel de presión, pero no por la formulación ($p > 0,01$). Así, las hamburguesas tratadas a 400 MPa presentaron una reducción decimal promedio de 3,36 Log_{10} UFC/g mientras que las tratadas a 600 MPa presentaron una reducción decimal promedio de 3,86 Log_{10} UFC/g.

Las hamburguesas elaboradas con la formulación A (1 % NaCl, 10 % grasa) presentaron mayor inactivación de aerobios mesófilos y de bacterias ácido-lácticas, tanto en muestras tratadas a 400 como a 600 MPa.

Tabla 4.41. Reducciones decimales de Enterobacterias y aerobios psicrótrofos en hamburguesas elaboradas con distintas formulaciones y tratadas con diferentes niveles de presión

Nivel de presión (MPa)	Formulación	Reducciones decimales (ciclos Log_{10} UFC/g)	
		Enterobacterias	Aerobios Psicrótrofos
400/600	A	2,11 (0,66)	4,75 (0,26) ^a
	B	1,57 (0,35)	4,15 (0,17) ^b
	C	1,37 (0,68)	4,51 (0,09) ^a
	D	1,07 (0,84)	3,98 (0,20) ^b
		Valor p del modelo	
Modelo	Formulación	0,0932	0,0001

Nota: se informa valor medio (error estándar) ^{a-b}, indican diferencias significativas por efecto de la formulación. Nivel de significancia, $p \leq 0,001$. Las reducciones logarítmicas se determinaron considerando el límite de detección de la metodología (1 Log_{10} UFC/g), ya que en las muestras tratadas a 400 y 600 MPa no se observó crecimiento

Con respecto a los recuentos de Enterobacterias no se observó efecto significativo ($p < 0,01$) de la formulación (Tabla 4.41). El mayor valor de reducción decimal de Enterobacterias se observó en las muestras preparadas con la formulación A (1 % NaCl, 10 % grasa), el cual fue de 2,11 Log_{10} UFC/g. Con relación a los aerobios psicrótrofos se observó efecto significativo ($p < 0,001$) de la formulación sobre la reducción decimal de esa microbiota. Así, las hamburguesas preparadas con las formulaciones A y C presentaron valores de reducciones decimales significativamente mayores ($p < 0,01$) que los correspondientes a las formulaciones B y D.

La reducción de a_w por la incorporación de NaCl a la mayor concentración evaluada (2 %) determinó un menor efecto del tratamiento con APH sobre la inactivación de aerobios mesófilos y psicrótrofos, ya que se observaron menores reducciones decimales de ambos recuentos en las hamburguesas preparadas con 2 %. Ese comportamiento baroprotector inducido por la reducción de a_w en los alimentos fue informado por Jofré y col. (2009) y Patterson (2005). Como ya fue indicado

previamente, la reducción de a_w provocaría la contracción celular y el engrosamiento de la membrana celular, reduciendo su permeabilidad y fluidez (Oxen y Knorr, 1993; Takahashi y col., 1993; Knorr, 1995; Palou y col., 1997; Molina-Höppner y col., 2004).

Estudios previos informaron la eficacia de los tratamientos con alta presión para la inactivación de bacterias alteradoras en carnes y productos cárnicos (Cheftel, 1995; Smelt, 1998; Farkas y Hoover, 2000; Yuste y col., 2001; Garriga y col., 2004; Grossi y col., 2014; Masana y col., 2015). Como ya se indicó, la inactivación de las células bacterianas asociada con APH puede estar relacionada con uno o más factores que incluyen la perturbación de la membrana celular, disociación de ribosomas, daño de la estructura celular, desnaturalización de proteínas, cambios bioquímicos y macromoleculares (inhibición de la síntesis ADN, ARN o síntesis de proteínas) así como cambios en el pH intracelular relacionados con la inactivación de las enzimas y el daño de la membrana (Smelt, 1998; Kato y Hayashi, 1999; Smelt y col., 2001; Molina-Gutiérrez y col., 2002; Mañas y Mackey, 2004; Abe, 2007; Moussa y col., 2009; Knorr y col., 2011; Hsu y col., 2015).

Con relación a la inactivación de la microbiota alteradora de productos cárnicos por efecto de los tratamientos con APH, los resultados observados en el presente trabajo fueron similares a lo informado por estudios previos. Así, Garriga y col. (2004) informaron que el tratamiento con APH (600 MPa, 6 min) de carne bovina produjo hasta 4 reducciones decimales en los recuentos de bacterias aeróbias mesófilas, psicrótrofas y ácido lácticas. A su vez, Carlez y col. (1994) informaron la ausencia total de crecimiento de bacterias ácido-lácticas en carne picada tratada a 450 MPa a 20 °C durante 20 min. en un periodo de almacenamiento de 22 días a 3 °C.

La marcada sensibilidad al tratamiento con APH de las Enterobacterias y de los microorganismos aerobios psicrótrofos, observada en este estudio, en comparación al efecto sobre las bacterias aerobias mesófilas, fue previamente informado por otros autores (Yuste y col., 2000 y Garriga y col., 2004). Por lo tanto, en este estudio se confirmó que el tratamiento a 400 MPa (o niveles superiores) son muy efectivos para la inactivación de Enterobacterias y microorganismos aerobios psicrótrofos y este efecto se verificó en una matriz como las hamburguesas.

4.4.4 Conclusiones

La composición de las hamburguesas fue uno de los factores que influyeron en el efecto del tratamiento con APH. La incorporación de NaCl a la mayor concentración utilizada (2 %) redujo la actividad de agua, lo cual produjo una menor eficacia del tratamiento con APH sobre la inactivación de las cepas nativas de STEC O157 inoculadas y de la microbiota alteradora.

El efecto más importante sobre la inactivación bacteriana correspondió al nivel de presión, por lo tanto, los tratamientos con APH permitirían el aseguramiento de la inocuidad y la extensión de vida útil de las hamburguesas de carne bovina, reduciendo significativamente los recuentos de STEC O157 y de la microbiota alteradora.

La formulación del producto con la menor concentración de NaCl (1 %) y el mayor nivel de presión (600 MPa) permitieron alcanzar las mayores reducciones en los recuentos de los microorganismos evaluados en el presente trabajo.

Debido a la importante injuria celular observada en las cepas de STEC O157, fundamentalmente en las hamburguesas tratadas a 600 MPa, será necesario evaluar en futuros estudios el efecto de la incorporación de agentes antimicrobianos, del tratamiento con APH a muestras congeladas y de las condiciones de almacenamiento (refrigeración, congelación, etc.) sobre el control de las células injuriadas.

Capítulo 5
CONCLUSIONES
GENERALES

5. Conclusiones generales

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral proporcionan información sobre el efecto del tratamiento con APH como asistencia en el proceso de elaboración de hamburguesas de carne bovina, con el fin de formularlas con menor contenido de Sodio. Para obtener estos resultados se desarrollaron estudios en los cuales se analizaron diferentes estrategias de aplicación de APH, además de la incorporación de diferentes aditivos. En esta Tesis Doctoral se estudió el efecto de los tratamientos sobre las propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y bioquímicas, la microestructura y las propiedades térmicas y moleculares de las proteínas cárnicas, las últimas aportaron información para explicar los resultados correspondientes a las propiedades macroscópicas de las hamburguesas tratadas.

El estudio de la aplicación de APH sobre la materia prima (carne bovina picada) para la elaboración de hamburguesas (preparadas con concentraciones reducidas en NaCl y TPFS, 1 y 0,25 % respectivamente), mostraron que ninguna propiedad estudiada, excepto la humedad expresable de las hamburguesas, fue afectada por el tratamiento a 150 MPa, ya que estas tuvieron valores similares a los de las muestras control. Sin embargo, el tratamiento a 300 MPa produjo efectos negativos como la alteración de los parámetros cromáticos, el incremento de pérdida de peso por cocción y una menor cohesión de los haces de fibra y de las fibras cárnicas, por lo que los valores de dureza y esfuerzo de corte tuvieron menores valores. La aplicación de APH previa a la incorporación de NaCl y TPFS promovió la agregación de proteínas miofibrilares no extraídas de la célula. Si bien se solubilizaron algunas proteínas con esta estrategia, el efecto predominante fue la desnaturalización y la agregación de las proteínas no extraídas de la fibra, impidiendo la formación de un gel que uniera las partículas y haces de fibra, lo que generó hamburguesas con menor capacidad de retención de agua y menores valores de los parámetros de textura.

Los resultados sugieren que la aplicación de APH a 300 MPa sobre la materia prima no fue favorable para la mayoría de las propiedades y parámetros evaluados. El tiempo de mantenimiento de la presión (1 y 5 min) también fue un factor importante en los parámetros evaluados, ya que los efectos mencionados se vieron acentuados con un tiempo de 5 min. Por lo tanto, la presurización de la materia prima no presentó resultados y efectos favorables, por eso se decidió en los estudios siguientes aplicar APH directamente sobre las hamburguesas.

La aplicación de APH directamente sobre hamburguesas que fueron elaboradas con la incorporación de NaCl, TPFS, enzima transglutaminasa y fibra cítrica presentó efectos similares en algunos parámetros evaluados en comparación a las elaboradas con materia prima presurizada, como el incremento de la luminosidad, el pH, la pérdida de peso por cocción, la disminución del parámetro a^* y la humedad expresable, siendo los efectos proporcionales al nivel de presión. Uno de los efectos distintos e importantes que se encontró en este estudio fue el incremento de los valores de los parámetros esfuerzo y trabajo de corte con el incremento del nivel de presión, mientras que la presurización de la materia prima disminuía los valores de estos parámetros. El efecto del orden de aplicación de APH y aditivos fue más importante para las proteínas miofibrilares que para las sarcoplásmicas. Esto probablemente se debió a que las miofibrilares tienen una solubilidad muy sensible a las sales utilizadas en este estudio, mientras que las sarcoplásmicas son solubles tanto con o sin aditivos. De esta manera el tratamiento con APH en presencia de aditivos se realizaría sobre miofibrilares y sarcoplásmicas solubles, mientras que en ausencia de aditivos, solo las sarcoplásmicas se encontrarían solubles durante la presurización. Las proteínas miofibrilares fueron extraídas por las sales y luego de la presurización se observó insolubilización de estas proteínas.

Por otra parte, la adición de TG promovió la polimerización de las proteínas solubilizadas por el NaCl, el posterior tratamiento con APH de estos polímeros resultó en un mayor nivel de agregación e insolubilización,

comprometiendo casi la totalidad de proteínas miofibrilares con el nivel de presión de 300 MPa. Por lo tanto, la incorporación de TG y fibra cítrica en combinación con los tratamientos con APH modificaron la microestructura de las hamburguesas, mejorando la unión de los haces de fibras y fibras cárnicas, aportándoles efectos favorables a las propiedades de textura. Además, la adición de fibra cítrica contrarrestó el efecto de la alta presión sobre la retención de agua, disminuyendo significativamente la pérdida de peso por cocción. Por lo tanto, la adición de TG y fibra permitirían disminuir la concentración de NaCl, obteniendo hamburguesas con menor contenido de Sodio, siendo por lo tanto más saludables para el consumidor.

La incorporación de antioxidantes (extracto de romero y Eritorbato de Sodio) en la formulación de hamburguesas no afectó la mayoría de los parámetros fisicoquímicos y tecnológicos evaluados. En cuanto a la aplicación de APH se observó que los parámetros luminosidad, pérdida de peso por cocción y la desnaturalización de proteínas incrementaron con el aumento de la presión desde 200 a 600 MPa. Sin embargo, la combinación de APH con la incorporación de NaCl y TPFS en la elaboración de las hamburguesas mejoró las propiedades texturales de estas, incrementando la cohesión entre las partículas cárnicas.

La oxidación de los lípidos (número de TBARS) en las hamburguesas no fue afectada por el tratamiento con APH, pero sí por el aumento de la concentración de NaCl. Cabe mencionar que la evaluación de la oxidación de los lípidos se realizó en el primer día con posterioridad al tratamiento con APH de las hamburguesas. Se podría postular que la aplicación de APH hasta 600 MPa inactivó las enzimas prooxidantes.

Por otra parte, la incorporación de extracto de romero contribuyó a disminuir la oxidación en el rango 0,1 a 0,2 % mientras que a concentraciones inferiores a 0,1 % tuvo efecto prooxidante en las hamburguesas cuando estas fueron tratadas con APH. Sin embargo, la incorporación de Eritorbato de Sodio tuvo un efecto positivo, contribuyendo a reducir el aumento de la luminosidad inducido por el incremento del nivel de presión. Además, ese aditivo incrementó

en forma significativa la capacidad antioxidante de las hamburguesas. Para estudios futuros se podría incluir la incorporación de otros antioxidantes naturales (carnosina, ácido ascórbico) o la combinación de estos en la formulación de las hamburguesas, para prevenir la decoloración de las mismas por efecto del tratamiento con APH.

En el estudio de la supervivencia de un cóctel de cepas nativas de *Escherichia coli* O157:H7 (STEC O157) inoculado en las hamburguesas, se observó que la efectividad del tratamiento con APH sobre la inactivación de los microorganismos fue influenciada por la composición de las hamburguesas, observándose las menores reducciones decimales a la mayor concentración de NaCl evaluada (2 %). Por lo tanto, el incremento de la concentración de NaCl tuvo un efecto baroprotector de la microbiota, lo cual se debería a la reducción de la actividad de agua. La disminución de la concentración de NaCl, además de permitir formular hamburguesas más saludables, posibilitó que el tratamiento con APH resulte más efectivo sobre la inactivación de la microbiota. No obstante, el efecto más importante sobre la inactivación microbiana correspondió al nivel de presión, alcanzando hasta 4,5 reducciones decimales de células STEC O157 con la aplicación de 600 MPa en hamburguesas elaboradas con 1 % de NaCl, así como aproximadamente 4 reducciones decimales en los recuentos de la microbiota alteradora. Con estos resultados se puede concluir que la aplicación de APH a las hamburguesas de carne bovina, permitió reducir significativamente el recuento de STEC O157 y la microbiota alteradora, siendo un método eficaz para asegurar la inocuidad y extender la vida útil de las hamburguesas. Sin embargo, debido a la importante injuria celular observada en las cepas de STEC O157, fundamentalmente en las hamburguesas tratadas a 600 MPa, será necesario evaluar en futuros estudios el efecto de la incorporación de agentes antimicrobianos, del tratamiento con APH a muestras congeladas y de las condiciones de almacenamiento (refrigeración, congelación, etc.) sobre el control de las células injuriadas.

Los estudios realizados demuestran que sería posible la elaboración de hamburguesas con la aplicación de APH y la incorporación de aditivos no convencionales como TG y fibra, los cuales mejorarían las propiedades de este producto cárnico y permitirían obtener hamburguesas reducidas en Sodio, además de asegurar su inocuidad, lo cual contribuiría a obtener hamburguesas más saludables para el consumidor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, F. (2007). Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(10), 2347-2357.

Akoh, C.C. (1998). Fat replacers. *Food Technology*, 52 (3), pp. 47-53.

Aktaş, N., Kiliç, B. (2005). Effect of microbial transglutaminase on thermal and electrophoretic properties of ground beef. *LWT-Food Science and Technology*, 38(8), 815-819.

Aleson-Carbonell, L., Fernández-López, J., Pérez-Alvarez, J. A., Kuri, V. (2005). Characteristics of beef burger as influenced by various types of lemon albedo. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(2), 247-255.

Álvarez-Ordóñez, A., Alvseike, O., Omer, M. K., Heir, E., Axelsson, L., Holck, A., Prieto, M. (2013). Heterogeneity in resistance to food-related stresses and biofilm formation ability among verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains. *International journal of food microbiology*, 161(3), 220-230.

Andersson, A., Andersson, K., Tornberg, E. (2000). A comparison of fat-holding between beef burgers and emulsion sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5), 555-560.

Andrés, A. I., Cava, R., Ventanas, J., Muriel, E., Ruiz, J. (2004). Lipid oxidative changes throughout the ripening of dry-cured Iberian hams with different salt contents and processing conditions. *Food Chemistry*, 84(3), 375-381.

Andrés, S., Murray, I., Navajas, E. A., Fisher, A. V., Lambe, N. R., & Bünger, L. (2007). Prediction of sensory characteristics of lamb meat samples by near infrared reflectance spectroscopy. *Meat science*, 76(3), 509-516.

Ang, J.F., Miller, W.B. (1991). Multiple functions of powdered cellulose as a food ingredient. *Cereal Foods World* 36(7): 558–564.

Angsupanich, K., Edde, M., & Ledward, D. A. (1999). Effects of high pressure on the myofibrillar proteins of cod and turkey muscle. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(1), 92-99.

Antonini, E. (1965). Interrelationship between structure and function in hemoglobin and myoglobin. *Physiological reviews*, 45(1), 123-170.

Asghar, A., Samejima, K., Yasui, T., Henrickson, R. L. (1985). Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 22(1), 27-106.

Baccus-Taylor, G. S. H., Falloon, O. C., Henry, N. (2015). Pressure resistance of cold-shocked *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef, beef gravy and peptone water. *Journal of applied microbiology*, 118(6), 1521-1529.

Baggio, S. R., Bragagnolo, N. (2006a). Fatty Acids, Cholesterol Oxides and Cholesterol in Brazilian Processed Chicken Products. *Italian journal of food science*, 18(2).

Baggio, S. R., Bragagnolo, N. (2006b). Cholesterol oxide, cholesterol, total lipid and fatty acid contents in processed meat products during storage. *LWT-Food Science and Technology*, 39(5), 513-520.

Baggio, S. R., Bragagnolo, N. (2006c). The effect of heat treatment on the cholesterol oxides, cholesterol, total lipid and fatty acid contents of processed meat products. *Food Chemistry*, 95(4), 611-619.

Bailey, A. J. (1982). Muscle proteins and muscle structure. *Food proteins*, 245-260. Applied Science Publishers, Essex, England.

Bajovic, B., Bolumar, T., Heinz, V. (2012). Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. *Meat science*, 92(3), 280-289.

Balasubramaniam, V. M., Farkas, D. (2008). High-pressure Food Processing. *Food Science and Technology International*, 14(5), 413-418.

Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'bryan, C.A., Duong, D.Q. and Balny, C., Masson, P. (1993). Effects of high-pressure on proteins. *Food Reviews International*, 9: 611-628.

Barbut, S., Josephson, D. B., Maurer, A. J. (1985). Antioxidant properties of rosemary oleoresin in turkey sausage. *Journal of Food Science*, 50(5), 1356-1359.

Baublits, R. T., Pohlman, F. W., Brown Jr, A. H., Yancey, E. J., Johnson, Z. B. (2006). Impact of muscle type and sodium chloride concentration on the quality, sensory, and instrumental color characteristics of solution enhanced whole-muscle beef. *Meat Science*, 72(4), 704-712.

Bechtel, P.J. (1986). *Muscle Development and Contractile Proteins*. En: *Muscle as Food*. Food Science and Technology. Ed. P.J. Bechtel. Series ed. B.S. Schweigert. Academic Press, Inc., New York (USA).

Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*. 4th ed. Berlin, Germany: Springer-Verlag. p 1070.

Beltran, E., Pla, R., Yuste, J., Mor-Mur, M. (2003). Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat Science*, 64(1), 19-25.

Beltran, E., Pla, R., Yuste, J., Mor-Mur, M. (2004). Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries. *Meat Science*, 66(3), 719-725.

Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M., Robinson, T., Mackey, B. (1999). Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Applied and environmental microbiology*, 65(4), 1564-1569.

Berry, E. D., Cutter, C. N. (2000). Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157: H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Applied and environmental microbiology*, 66(4), 1493-1498.

Black, E. P., Hirneisen, K. A., Hoover, D. G., Kniel, K. E. (2010). Fate of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef following high-pressure processing and freezing. *Journal of applied microbiology*, 108(4), 1352-1360.

Bodwell, C. E. (1977). *Evaluation of proteins for humans*. Avi. Publ. Co., Wesport, Connecticut. p 327.

Bodwell, C. E., Adkins, J. S., Hopkins, D. T., (1981). *Protein quality in humans: Assessment and in Vitro Estimation*. Avi. Publ. Co., Wesport, Connecticut. 430- 455.

Bodwell, C.E., McClain, P.E. (1971). *Chemistry of animal tissues. Proteins*. En: *The Science of Meat and Meat Products*. Eds. J.F. Price y B.S. Schweigert. San Francisco.

Bolumar, T., Andersen, M. L., Orlie, V. (2014). Mechanisms of radical formation in beef and chicken meat during high pressure processing evaluated by electron spin resonance detection and the addition of antioxidants. *Food chemistry*, 150, 422-428.

Bolumar, T., La Peña, D., Skibsted, L. H., Orlie, V. (2016). Rosemary and oxygen scavenger in active packaging for prevention of high-pressure induced lipid oxidation in pork patties. *Food Packaging and Shelf Life*, 7, 26-33.

Bolumar, T., Skibsted, L. H., Orlie, V. (2012). Kinetics of the formation of radicals in meat during high pressure processing. *Food chemistry*, 134(4), 2114-2120.

Bourne, M. C. (1982). Effect of temperature on firmness of raw fruits and vegetables. *Journal of food science*, 47(2), 440-444.

Box, G. E. P., Behnken, D. W. (1960). Simplex-sum designs: a class of second order rotatable designs derivable from those of first order. *The Annals of Mathematical Statistics*, 31(4), 838-864.

Brashears, M. M., Jaroni, D., Trimble, J. (2003). Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157: H7 in cattle. *Journal of food protection*, 66(3), 355-363.

Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10(4), 221-247.

Bridgman PW. (1914). The coagulation of albumen by pressure. *Journal of Biological Chemistry*. 19:511–12.

Buckley, D. J., Gray, J. I., Asghar, A., Price, J. F., Crackel, R. L., Booren, A. M., Pearson, A.M, Miller, E. R. (1989). Effects of dietary antioxidants and oxidized oil on membranal lipid stability and pork product quality. *Journal of Food Science*, 54(5), 1193-1197.

Buckow, R., Sikes, A., Tume, R. (2013). Effect of high pressure on physicochemical properties of meat. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(7), 770-786.

Cámara de la industria y comercio de carnes y derivados de la republica argentina – CICCRA. (2017). Informe económico mensual Documento N° 192, Buenos Aires, Argentina.

Campus, M., Flores, M., Martinez, A., Toldrá, F. (2008). Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin. *Meat science*, 80(4), 1174-1181.

Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary research*, 36(3), 289-311.

Carballo, B., López de Torre, G. (1991). Manual de bioquímica y tecnología de la carne. Servicio de Investigación Agraria de la Junta de Extremadura.

Carballo, J., Fernández, P., Colmenero, F. J. (1996). Texture of uncooked and cooked low-and high-fat meat batters as affected by high hydrostatic pressure. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(7), 1624-1625.

Carlez A. (1994). Traitements par hautes pressions d'aliments d'origine musculaire: destruction microbienne, modification de couleur, gélification protéique. Thèse, Université Montpellier II. Montpellier.

Carlez, A., Rosec, J. P., Richard, N., Cheftel, J. C. V. (1994). Bacterial growth during chilled storage of pressure-treated minced meat. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*, 27, 48 – 54.

Carlez, A., Veciana-Nogues, T., Cheftel, J. C. (1995). Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. *LWT-Food Science and Technology*, 28(5), 528-538.

Carvalho, G. R. D., Milani, T. M. G., Trinca, N. R. R., Nagai, L. Y., Barretto, A. C. D. S. (2017). Textured soy protein, collagen and maltodextrin as extenders to improve the physicochemical and sensory properties of beef burger. *Food Science and Technology*, 37, 10-16.

Casadei, M. A., Manas, P., Niven, G., Needs, E., Mackey, B. M. (2002). Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5965-5972.

Castell, C. H., MacLean, J., Moore, B. (1965). Rancidity in Lean Fish Muscle: IV. Effect of Sodium Chloride and Other Salts. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 22(4), 929-944.

Cava, R., Ladero, L., González, S., Carrasco, A., Ramírez, M. R. (2009). Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation

of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(1), 76-81.

Centers for Disease Control and Prevention. National Health and Nutrition Examination Survey. (Consultado en octubre de 2017) Disponible en: <https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/index.htm>.

Cerf, O., Davey, K. R., Sadoudi, A. K. (1996). Thermal inactivation of bacteria—a new predictive model for the combined effect of three environmental factors: temperature, pH and water activity. *Food Research International*, 29(3-4), 219-226.

Chan, K. M., Cker, E. A., Means, W. J. (1993). Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *Journal of Food Science*, 58(1), 1-4.

Chapleau, N. J., de Lamballerie-Anton, M. I. (2003). Changes in myofibrillar proteins interactions and rheological properties induced by high-pressure processing. *European Food Research and Technology*, 216(6), 470-476.

Chapman, P.A., Siddons, C.A., Wright, D.J., Norman, P., Fox, J., Crick, E. (1992). Cattle as a source of verotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Veterinary Record*, 131, 323-324.

Chattong, U., Apichartsrangkoon, A. (2009). Dynamic viscoelastic characterization of ostrich-meat yor (Thai sausage) following pressure, temperature and holding time regimes. *Meat science*, 81(3), 426-432.

Cheah, P. B., Ledward, D. A. (1997). Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat. *Journal of Food Science*, 62(6), 1135-1139.

Cheah, P.B., Ledward, D.A. (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science*, 43: 123-134.

Cheftel, J. C. (1991). High pressure applications in food technology. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 108: 141-153.

Cheftel, J. C. (1995). High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food science and technology international*, 1(2-3), 75-90.

Cheftel, J. C., Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat science*, 46(3), 211-236.

Chen, H., Guan, D., Hoover, D. G. (2006). Sensitivities of foodborne pathogens to pressure changes. *Journal of Food protection*, 69(1), 130-136.

Chen, X., Jo, C., Lee, J. I., Ahn, D. U. (1999). Lipid oxidation, volatiles and color changes of irradiated pork patties affected by antioxidants. *Journal of Food Science*, 64(1), 16-19.

Chilton, P., Isaacs, N. S., Mackey, B., Stenning, R. (1997). The effects of high hydrostatic pressure on bacteria. In K. Heremans (Ed.), *High pressure research in the biosciences and biotechnology* (p. 225 – 228). Belgium' Leuven University Press.

Clydesdale, F.M., Francis, F.J. (1971). The chemistry of meat colour. *Food Prod. Dev.* 5, 81-84.

Código Alimentario Argentino (CAA) - Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp. Capítulo VI, Alimentos Cárneos y Afines. (Actualizada octubre de 2017).

Cofrades, S., Guerra, M. A., Carballo, J., Fernández-Martín, F., Colmenero, F. J. (2000). Plasma protein and soy fiber content effect on bologna sausage properties as influenced by fat level. *Journal of food science*, 65(2), 281-287.

Cohen, C., Holmes, K. C. (1963). X-ray diffraction evidence for α -helical coiled-coils in native muscle. *Journal of molecular biology*, 6(5), 423- 432 IN11.

Crehan, C. M., Troy, D. J., Buckley, D. J. (2000). Effects of salt level and high hydrostatic pressure processing on frankfurters formulated with 1.5 and 2.5 % salt. *Meat Science*, 55(1), 123-130.

Cross, H.R., Durland, P.R., Seideman, S.C. (1986). *Sensory Qualities of Meat*. En: *Muscle as Food*. Food Science and Technology. Ed. P.J. Bechtel. Series ed. B.S. Schweigert. Academic Press, Inc. New York.

Crossland, B. (1995). The development of high pressure equipment. In D.A. Ledward., D.E. Johnston., R.G. Earnshaw., A.P.M. Hasting (Eds.), *High Pressure Processing of Foods* (pp. 7–26). Nottingham: Nottingham University Press.

Daoudi, L. (2004). Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre el gazpacho y zumo de uva. Tesis doctoral, C.E.R, Planta de Tecnología de Alimentos, UAB.

De Alba, M., Bravo, D., Medina, M. (2013). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in dry-cured ham by high-pressure treatments combined with biopreservatives. *Food control*, 31(2), 508-513.

Dean-Nystrom, E. A., Bosworth, B. T., Cray, W. C., Moon, H. W. (1997). Pathogenicity of *Escherichia coli* O157: H7 in the intestines of neonatal calves. *Infection and immunity*, 65(5), 1842-1848.

Del Olmo, A., Morales, P., Ávila, M. et al. (2010) Effect of single-cycle and multiple-cycle high-pressure treatments on the colour and texture of chicken breast fillets. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 441–444.

Depetris, G., Santini, F. (2005). Calidad de carne asociada al sistema de producción. Grupo de Nutrición, Metabolismo y Calidad de Producto. INTA. Estación Experimental Balcarce, Argentina.

Derringer, G., Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of quality technology*, 12(4), 214-219.

Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat science*, 74(1), 188-196.

Djenane, D., Sanchez-Escalante, A., Beltran, J. A., Roncales, P. (2002). Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 76(4), 407-415.

Djenane, D., SÁnchez-Escalante, A., Beltrán, J.A., Roncalés, P. (2003). Extension of the shelf life of beef steaks packaged in a modified atmosphere by treatment with rosemary and displayed under UV-free lighting. *Meat Sci.* 64, 417–426.

Dransfield, E., Francombe, M. A., Whelehan, O. P. (1984). Relationships between sensory attributes in cooked meat. *Journal of texture studies*, 15(1), 33-48.

Durand, P. (2002). Capítulo 4: Ingredientes y aditivos. En: *Tecnología de los productos de chacutería y salazones*. p 85-129. Coord: Durand, P. Acribia S.A. Zaragoza, España.

Duranton, F., Guillou, S., Simonin, H., Chéret, R., de Lamballerie, M. (2012). Combined use of high pressure and salt or sodium nitrite to control the growth of endogenous microflora in raw pork meat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 373-380.

Earnshaw RG. (1995). Kinetics of high pressure inactivation of microorganisms. En: *High Pressure Processing of Foods*. Ledward LA, Johnston DE, Earnshaw RG and Hasting APM (eds). Mottingsm University Prss, Leicestershire, UK. pp. 37-46.

Earnshaw, R.G. (1996). High pressure food processing. *Nutrition and Food Science*. 2: 8-11.

Egan, A.F., Shay, B.J., Stanley, G. (1980). Meat Res. In CSIRO (Ann. Rpt.), 30. Citado por: Ledward, D.A. 1984. Haemoproteins in meat and meat

products. Ch. 2. In *Developments in Food Proteins –3*. (B.J.F. Hudson, ed.) pp. 33. Elsevier Appl. Sci. Publ. Co., New York.

Eim, V. S., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A. (2008). Effects of addition of carrot dietary fibre on the ripening process of a dry fermented sausage (sobrassada). *Meat Science*, 80(2), 173-182.

Estévez, M., Cava, R. (2006). Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. *Meat Science*, 72(2), 348-355.

FAO. (2016). *Carne y Productos Cárnicos- consumo de carne*. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/home.html>.

FAOSTAT. (2014). *FAOSTAT Agriculture Data*. FAO, Rome, Italy. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/FBS>.

Farkas, D. F., Hoover, D. G. (2000). High pressure processing. *Journal of Food Science*, 65(s8), 47-64.

Farmer, L. J., Hagan, T. D., Paraskevas, O. (1999). Role of selected precursors in meat flavor formation. In *Quality attributes of muscle foods* (pp. 159-172). Springer US.

Faustman, C., Cassens, R. G. (1990). The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. *Journal of Muscle Foods*, 1(3), 217-243.

FDA/CFSAN (1992b). *Escherichia coli O157:H7*. United States Food and Drug Administration and the Center for Food Safety and Applied Nutrition, <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap15.html>.

Fennema, O. R., Tannenbaum, S. R. (2001). *Introducción a la química de los alimentos*.

Fernández-Garfa, E., McGregor, J. U., Traylor, S. (1998). The Addition of Oat Fiber and Natural Alternative Sweeteners in the Manufacture of Plain Yogurt1. *Journal of dairy science*, 81(3), 655-663.

Fernández-Martin, F., Cofrades, S., Carballo, J., Jiménez-Colmenero, F. (2002). Salt and phosphate effects on the gelling process of pressure/heat treated pork batters. *Meat Science*, 61(1), 15-23.

Fernández-Martín, F., Fernández, P., Carballo, J., Jiménez Colmenero, F. (1997). Pressure/heat combinations on pork meat batters: protein thermal behavior and product rheological properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(11), 4440-4445.

Fernández-Martín, F., Otero, L., Solas, M. T., Sanz, P. D. (2000). Protein Denaturation and Structural Damage during High-Pressure-Shift Freezing of Porcine and Bovine Muscle. *Journal of food science*, 65(6), 1002-1008.

Ferrari, R., Szerman, N., Sanow, C., Sancho, A., Vaudagna, S. (2012). Study of the application of high pressure processing for the production of beef patties with low sodium concentration. In: 16th World Congress of Food Science and Technology (IUFoST). Foz de Iguazú, Paraná, Brasil. ISSN 2304-7992.

Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandao, G. C., Da Silva, E.G.P., Portugal, L.A, Dos Reis, P.S, Souza, A,S and Dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597(2), 179-186.

Fischer, C., Hamm, R. (1980). Biochemical studies on fast glycolysing bovine muscle. *Meat science*, 4(1), 41-49.

Formanek, Z., Kerry, J. P., Higgins, F. M., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., Farkas, J. (2001). Addition of synthetic and natural antioxidants to α -tocopheryl acetate supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. *Meat science*, 58(4), 337-341.

Forrest, J. C., Aberle, E. D., Hedrick, H. B., Judge, M. D., Merkel, R. A. (1975). Principles of meat science. WH Freeman and Company.

Forrest, J.C., Aberle, E.D., Hedrick, H.B., Judge, M.D., Merkel, R.A. (1979). Fundamentos de ciencia de la carne. Acibia, Zaragoza, España.

FOX, J.B. (1966). The Chemistry of meat pigments. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 14:207-210.

Freixanet L. (Consultado en setiembre de 2017). Additives and ingredients in the manufacture of whole muscle cooked meat products. Manufacturing process for whole muscle cooked meat products IV: Stuffing and moulding. Disponible en: www.metalquimia.com

Fuentes, V., Ventanas, J., Morcuende, D., Estévez, M., Ventanas, S. (2010). Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. Meat science, 85(3), 506-514.

Gänzle, M., Liu, Y. (2015). Mechanisms of pressure-mediated cell death and injury in Escherichia coli: from fundamentals to food applications. Frontiers in microbiology, 6, 599.

Garriga, M., Grebol, N., Aymerich, M. T., Monfort, J. M., Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 5(4), 451-457.

Gekko, K., Koga, S. (1983). The effect of pressure on thermal stability and in vitro fibril formation of collagen. Agricultural and Biological Chemistry, 47(5), 1027-1033.

Georgantelis, D., Blekas, G., Katikou, P., Ambrosiadis, I. and Dimitrios, J.F. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and a-tocopherol on lipid oxidation and color stability during frozen storage of beef burgers. Meat Sci. 75, 266–274.

Gill, C. O. (1986). The control of microbial spoilage in fresh meats, p. 49–88. In A. M. Pearson and T. R. Dutson (ed.), *Advances in meat research*, vol. 2. Meat and poultry microbiology. AVI Publishing Co., Inc., Westport, Conn.

Gill, C. O. (2000). HACCP in primary processing: red meat. HACCP in the Meat Industry, 81-122. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Godber, J. S. (1994). Nutritional value of muscle foods. In *Muscle Foods* (p. 430-455). Springer, Boston, MA.

Goll, D.E., Robson, R.M. and Stromer, M.H. (1977). Muscle proteins. In *Food Proteins*, (J.R. Whitaker and S.R. Tannenbaum, eds.) p. 121-174, AVI Publishing Co., Westport, CT.

Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B., & Gómez-Guillén, M. C. (2007). Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food chemistry*, 105(2), 511-520.

Goutefongea, R., Rampon, V., Nicolas, N., Dumont, J. P. (1995). Meat color changes under high pressure treatment. In *Proceedings 41st International Congress of Meat Science and Technology* (pp. 384–385), 20–25 August 1995, San Antonio, Texas.

Granger, B.L. y Lazarides, E. (1978). The existence of an insoluble Z disc scaffold in chicken skeletal muscle. *Cell* 15, 1253-1256.

Grant, W. D. (2004). Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1448), 1249-1267.

Gross, M., Jaenicke, R. (1994). Proteins under pressure. *European Journal of Biochemistry*, 221(2), 617-630.

Grossi, A., Bolumar, T., Søltoft-Jensen, J., Orlie, V. (2014). High pressure treatment of brine enhanced pork semitendinosus: Effect on microbial

stability, drip loss, lipid and protein oxidation, and sensory properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 11-21.

Grossi, A., Søltoft-Jensen, J., Knudsen, J. C., Christensen, M., Orlie, V. (2011). Synergistic cooperation of high pressure and carrot dietary fibre on texture and colour of pork sausages. *Meat science*, 89(2), 195-201.

Hamm R. (1960). Biochemistry and meat hydration. In: Chichester CO, Mrak EM, Stewart GF, editors. *Advances in Food Research* (Vol 10). New York: Academic Press, Inc. p 356-443.

Hamm R. (1972). *Kolloidchemie des Fleisches*. Paul Parey Co, Berlin.

Hamm, R. (1961). Biochemistry of meat hydration. In *Advances in food research* (Vol. 10, pp. 355-463). Academic Press.

Hamm, R. (1977) In *Physical, Chemical and Biological Changes in Food caused by Thermal Processing*, eds T. Hoyem and O. Kvale, p. 101. Applied Science Publishers, London.

Hamm, R., Deatherage, F. E. (1960). Changes in hydration, solubility and charges of muscle proteins during heating of meat. *Journal of Food Science*, 25(5), 587-610.

Han, J. and Rhee, K.S. (2005). Antioxidant properties of selected Oriental non-culinary/nutraceutical herb extracts as evaluated in raw and cooked meat. *Meat Science*. 70, 25–33.

Harel, S., Kanner, J. 1985. Hydrogen peroxide generation in ground muscle tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33:5178.

Hayes, J. E., Raines, C. R., De Pasquale, D. A., Cutter, C. N. (2014). Consumer acceptability of high hydrostatic pressure (HHP)-treated ground beef patties. *LWT-Food Science and Technology*, 56(1), 207-210.

Heinz, V., Buckow, R. (2010). Food preservation by high pressure. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5(1), 73-81.

Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 9(5), 197-203.

Heremans, K. (1992). From Living systems to biomolecules. *High-Pressure and biotechnonology*. p. 37-44.

Hermansson, A. M. (1986). Water- and fat-holding. In D. A. Ledward and J. R. Mitchell (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp. 273–314). London: Elsevier.

Hiperbaric. (Consultado en agosto de 2017). Disponible en: <http://www.hiperbaric.com/en/high-pressure>.

Hite, B.H. (1899). The effect of pressure in the preservation of milk: a preliminary report. *West Va. Agr. Exp. Stat. Bull.* 58:15–35.

Hong, G. P., Chin, K. B. (2010). Effects of microbial transglutaminase and sodium alginate on cold-set gelation of porcine myofibrillar protein with various salt levels. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 444-451.

Hong, G. P., Xiong, Y. L. (2012). Microbial transglutaminase-induced structural and rheological changes of cationic and anionic myofibrillar proteins. *Meat science*, 91(1), 36-42.

Hong, G.P., Park, S.H., Kim, J.Y., Min, S.G. (2006a). The effects of high pressure and various binders on the physico-chemical properties of restructured pork meat. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19, 1484–1489.

Honikel, K.O. (1988). The water binding of meat *Fleishwirtschaft International*, 1, pp. 14-22.

Hood, D.E., Riordan, E.B. (1973). Discoloration in pre-packaged beef measurement by reflectance spectrophotometry and shopper discrimination. *J. Food Technol.* 8, 333-343.

Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F., Knorr, D. (1989) Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology* 43, 99-107.

Hopkins, D. L. (1981). Protein quality in humans: Assessment and in vitro estimation. *Avi Publ. Co., Westport, Connecticut.* p. 169-194.

Howell, N. K., R. A. Lawrie (1984). "Functional aspects of blood plasma proteins II. Gelling properties." *Journal of Food Technology* 19: 289-295.

Hsu, H., Sheen, S., Sites, J., Cassidy, J., Scullen, B., Sommers, C. (2015). Effect of high pressure processing on the survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (Big Six vs. O157: H7) in ground beef. *Food microbiology*, 48, 1-7.

Huang, Y., He, Z., Li, H., Li, F., Wu, Z. (2012). Effect of antioxidant on the fatty acid composition and lipid oxidation of intramuscular lipid in pressurized pork. *Meat science*, 91(2), 137-141.

Huff-Lonergan, E., Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat science*, 71(1), 194-204.

Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat science*, 62(3), 359-371.

Hughes, J. M., Oiseth, S. K., Purslow, P. P., Warner, R. D. (2014). A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness. *Meat science*, 98(3), 520-532.

Hui, Y. H. (2001). Handbook of meat and meat processing (pp. 381–398) (2nd ed).

ICMSF. (1998). Microorganisms in foods 6. Microbial ecology of food commodities. London: Blackie Academic and Professional.

Institute of Medicine /Food and Nutrition Board. (2005). Dietary Reference Intakes (DRI) for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate. DC: The National Academies Press. Washington. <https://www.nap.edu/download/10925>.

Instituto de investigaciones económicas-Bolsa de comercio de Córdoba (2013). Informe anual del balance de la economía Argentina Capitulo 1.7 – Sector Agropecuario.

Ismail H.A., Lee E.J., Ko K.Y., Paik H.D., Ahn D.U. (2009). Effect of antioxidant application methods on the color, lipid oxidation, and volatiles of irradiated ground beef. *Journal of Food Science* 74: 25-32.

ISO 11036. (1994). Sensory analysis. Methodology. Texture profile.

Iwasaki, T., Noshiroya, K., Saitoh, N., Okano, K., Yamamoto, K. (2006). Studies of the effect of hydrostatic pressure pretreatment on thermal gelation of chicken myofibrils and pork meat patty. *Food Chemistry*, 95(3), 474–483.

Iwasaki, T., Yamamoto, K. (2003). Changes in rabbit skeletal myosin and its subfragments under high hydrostatic pressure. *International journal of biological macromolecules*, 33(4-5), 215-220.

Jensen, L.B. (1945). *Microbiology of Meats*. Champaign, Ill. USA: The Garrard Press.

Jiang, Y., Scheinberg, J. A., Senevirathne, R., Cutter, C. N. (2015). The efficacy of short and repeated high-pressure processing treatments on the reduction of non-O157: H7 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in ground beef patties. *Meat science*, 102, 22-26.

Jiménez- Colmenero, F. (2002). Muscle protein gelation by combined use of high pressure/temperature. *Trends in Food Science & Technology*, 13(1), 22-30.

Jiménez Colmenero, F., Carballo, J., Fernández, P., Barreto, G., Solas, M. T. (1997). High-pressure-induced changes in the characteristics of low-fat and high-fat sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(1), 61–66.

Jimenez-Colmenero, F. (1996) Tecnologías para el desarrollo de productos de carne de bajo contenido graso *Tendencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 7 (1996), p. 41 – 48.

Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., Carballo, J., Fernández, P., Fernandez-Martin, F. (1998a). Heating of chicken and pork meat batters under pressure conditions: protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4706-4711.

Jofré, A., Aymerich, T., Grèbol, N., Garriga, M. (2009). Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge tests on convenience meat products. *LWT-Food Science and Technology*, 42(5), 924-928.

Jowitt, R. (1974). The terminology of food texture. *Journal of Texture Studies*, 5(3), 351-358.

Jung, S., Ghoul, M., De Lamballerie-Anton, M. (2003). Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36, 625–631.

Jung, S., Nam, K. C., Ahn, D. U., Kim, H. J., Jo, C. (2013). Effect of phosvitin on lipid and protein oxidation in ground beef treated with high hydrostatic pressure. *Meat science*, 95(1), 8-13.

Jung, Y. S., Beuchat, L. R. (1999). Survival of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in egg powders as affected by water activity and temperature. *International journal of food microbiology*, 49(1-2), 1-8.

Kanner, J., Harel, S., Jaffe, R. (1991). Lipid peroxidation of muscle food as affected by sodium chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(6), 1017-1021.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123-140.

Kato, M., Hayashi, R. (1999). Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 63(8), 1321-1328.

Kelemen, M.V. and Sharpe, J.E.E. (1979) Controlled cell disruption: a comparison of the forces required to disrupt different microorganisms. *J Cell Sci* 35, 431–441.

Kijowski, J. (2001). *Chemical and Functional Properties of Food Proteins*. Muscle proteins. Z. E. Sikorski. Lancaster, PA, Technomic Publishing Company Inc.

King, J.N., Whyte, R. (2006). Does it look cooked? A review of factors that influence cooked meat color. *Journal of food science*. 71:31–39.

Knorr, D. (1993) Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technol.*, 47 (6) 156–161.

Knorr, D. (1995). Hydrostatic pressure treatment of food: microbiology. In *New methods of food preservation* (pp. 159-175). Springer, Boston, MA.

Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., Schoessler, K. (2011). Emerging technologies in food processing. *Annual review of food science and technology*, 2, 203-235.

Knorr, D., Schlüter, O., Heinz, V. (1998). Impact of high hydrostatic pressure on phase transitions of foods. *Food Technology*, 52:42–45.

Korner, P., Vardag, T. (1997). High pressure engineering. *Chemie Ingenieur Technik*, 69, 1743–1745.

Kuehl, R. (2000). *Design of Experiments-Statistical. Principles of Research Design and Analysis*, 2nd edn. Duxbury-Thomson Learning, London.

Labuza, T. P., Busk, G. C. (1979). An analysis of the water binding in gels. *Journal of Food Science*, 44(5), 1379-1385.

Ladikos, D., Lougovois, V. (1990). Lipid oxidation in muscle foods: a review. *Food chemistry*, 35(4), 295-314.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.

Lamballerie-Anton, M. D., Taylor, R. G., Culioli, J. (2002). *Meat Processing: Improving Quality*. Chapter 16. High pressure processing of meat. Cambridge, UK. Florida, USA. Woodhead Publishing Limited. CRC Press LLC.

Lawrie, R.A. (1979). *Meat Science*. 4^o Ed. Pergamon Press, Oxford.

Lawrie, R.A. (1985). *Meat Science*. Pergamon Press Ltd. Headington Hill Hall. London.

Ledward, D.A. (1979). Meat. In: J. PR (ed) *Effect of heating on food-stuffs*. Applied Science Publishers, London, pp 121-157.

Lee, S., Decker, E. A., Faustman, C., Mancini, R. A. (2005). The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in n- 3 oil fortified ground beef patties. *Meat Science*, 70(4), 683-689.

Lehrer, S.S. (1975). Intramolecular crosslinking of tropomyosin via disulfide bond formation: Evidence for chain register. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 3377-3381.

Livingston, D.J., Lamar, G.N., Brown, W.D. (1983). Myoglobin diffusion in bovine heart muscle. *Science*, 220:71.

López-Caballero, M. E., Carballo, J., Jiménez-Colmenero, F. (1999). Microbiological changes in pressurized, prepackaged sliced cooked ham. *Journal of Food Protection*, 62(12), 1411-1415.

López-López, I., Cofrades, S., Yakan, A., Solas, M. T., Jiménez-Colmenero, F. (2010). Frozen storage characteristics of low-salt and low-fat beef patties as affected by Wakame addition and replacing pork backfat with olive oil-in-water emulsion. *Food Research International*, 43(5), 1244-1254.

Lorinczy, D., Belagyi, J. (1995). Effects of nucleotide on skeletal muscle myosin unfolding in myofibrils by DSC. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217(2), 592–598.

Lowey, S., Goldstein, L., Lick, S. (1969). Isolation and characterization of a helical subunit from heavy meromyosin. *Biochem. Z.* 345, 248-257.

Ludwig, H., Schreck, C.h. (1997). The inactivation of vegetative bacteria by pressure. En: *High Pressure Research in the Bioscience and Biotechnology*. Heremans K (ed). Leuven University Press, Leuven, Bélgica. pp. 221-224.

Lundberg, B., Pan, X., White, A., Chau, H., Hotchkiss, A. (2014). Rheology and composition of citrus fiber. *Journal of Food Engineering*, 125, 97-104.

Ma, H. J., Ledward, D. A. (2004). High pressure/thermal treatment effects on the texture of beef muscle. *Meat science*, 68(3), 347-355.

Ma, H. J., Ledward, D. A., Zamri, A. I., Frazier, R. A., Zhou, G. H. (2007). Effects of high pressure/thermal treatment on lipid oxidation in beef and chicken muscle. *Food Chemistry*, 104(4), 1575-1579.

Ma, H., Ledward, D. (2004). High pressure/thermal treatment effects on the texture of beef muscle. *Meat Science*, 68(3), 347–355.

Macáková, K., Mladěnka, P., Filipický, T., Říha, M., Jahodář, L., Trejtnar, F., Bovicelli, P., Silvestri, I.P., Hrdina, R., Saso, L. (2012). Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food chemistry*, 135(4), 2584-2592.

MacDougall, D. B. (1970). Characteristics of the appearance of meat I. The luminous absorption, scatter and internal transmittance of the lean of bacon manufactured from normal and pale pork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21(11), 568-571.

Macfarlane, J. J., McKenzie, I. J., Turner, R. H., Jones, P. N. (1981). Pressure treatment of meat: effects on thermal transitions and shear values. *Meat Science*, 5(4), 307-317.

Macfarlane, J. J., McKenzie, I. J., Turner, R. H., Jones, P. N. (1984). Binding of comminuted meat: effect of high pressure. *Meat Science*, 10(4), 307-320.

Mackey, B. M., Forestiere, K., Isaacs, N. (1995). Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*, 9(1-2), 1-11.

Mackey, B. M., Forestiere, K., Isaacs, N. S., Stenning, R., Brooker, B. (1994). The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Letters in Applied Microbiology*, 19(6), 429-432.

Mañas, P., Mackey, B. M. (2004). Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential-and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: relationship with cell death. *Applied and environmental microbiology*, 70(3), 1545-1554.

Mancini, R. A., Hunt, M. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1), 100-121.

Mandava, R., Fernandez, I., Juillerat, M. (1994). Effect of high hydrostatic pressure on sausage batters. In Proceedings 40th International Congress of Meat Science and Technology, The Hague, Netherlands.

Mannherz, H. G., Goody, R. S. (1976). Proteins of contractile systems. Annual review of biochemistry, vol. 45, no 1, p. 427-466.

Manzoni, C. En el país del asado, la hamburguesa se convirtió en una reina. [en línea]. Diario La Nación. Buenos Aires, Argentina. 6 de junio de 2015. [Fecha de consulta: 5 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://www.lanacion.com.ar/1807621-en-el-pais-del-asado-la-hamburguesa-se-convirtio-en-la-reina/>.

Marcos, B., Kerry, J. P., Mullen, A. M. (2010). High pressure induced changes on sarcoplasmic protein fraction and quality indicators. Meat Science, 85(1), 115–120.

Marcos, B., Mullen, A. M. (2014). High pressure induced changes in beef muscle proteome: Correlation with quality parameters. Meat science, 97(1), 11-20.

Mariutti, L. R., Orlie, V., Bragagnolo, N., Skibsted, L. H. (2008). Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. European Food Research and Technology, 227(2), 337-344.

Maruyama, K., Kimura, S., Ishii, T., Kuroda, M., Ohashi, K., Muramatsu, S. (1977a). β -actinin, a regulatory protein of muscle: Purification, characterization and function. J. Biochem 81, 215-227.

Maruyama, K., Kimura, S., Ohashi, K., Kuwano, Y. (1981). Connectin, an elastic protein of muscle. Identification of "Titin" with connectin. J. Biochem 89, 701-712.

Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., Kimura, S., Ohashi, K., Marukami, F., Handa, S., Eguchi, G. (1977b). Connectin, an elastic

protein of muscle: characterization and function. *J. Biochem* 82, 317-330.

Masaki, T. y Takaiti, O. 1972. Purification of M-protein. *J. Biochem.*

Masaki, T., Takaiti, O. (1972). Purification of M-protein. *J. Biochem* 66, 637-646.

Masaki, T., Takaiti, O. (1974). M-protein. *J. Biochem* 75, 367-375.

Masana, M. O., Barrio, Y. X., Palladino, P. M., Sancho, A. M., Vaudagna, S. R. (2015). High pressure treatments combined with sodium lactate to inactivate *Escherichia coli* O157: H7 and spoilage microbiota in cured beef carpaccio. *Food Microbiology*, 46, 610-617.

McCarthy, T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B., Buckley, D. J. (2001b). Assessment of the antioxidant potential of natural food and plant extracts in fresh and previously frozen pork patties. *Meat Science*, 57(2), 177-184.

McArdle, R. A., Marcos, B., Kerry, J. P., Mullen, A. M. (2011). Influence of HPP conditions on selected beef quality attributes and their stability during chilled storage. *Meat Science*, 87(3), 274-281.

McCarthy T.L., Kerry J.P., Kerry J.F., Lynch P.B., Buckley D.J. (2001a) Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science* 57: 45-52.

Mead, G. C. (2000). HACCP in primary processing: poultry, p. 123-153. En Brown M. (ed.), HACCP in the meat industry. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Metrick, C., Hoover, D. G., Farkas, D. F. (1989). Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science*, 54(6), 1547-1549.

Ministerio de Salud de la Nación e INDEC. (2015). Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo para Enfermedades No Transmisibles. Buenos Aires, Argentina. p 169. ISSN 9789503802182.

Molina-Gutierrez, A., Rademacher, B., Gänzle, M. G., Vogel, R. F. (2002). Effect of sucrose and sodium chloride on the survival and metabolic activity of *Lactococcus lactis* under high-pressure conditions. In *Progress in Biotechnology* (Vol. 19, pp. 295-302). Elsevier.

Molina-Höppner, A., Doster, W., Vogel, R. F., Gänzle, M. G. (2004). Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments. *Applied and environmental microbiology*, 70(4), 2013-2020.

Møller, S. M., Grossi, A., Christensen, M., Orlie, V., Søltøft-Jensen, J., Straadt, I. K. (2011). Water properties and structure of pork sausages as affected by high pressure processing and addition of carrot fibre. *Meat Science*, 87(4), 387-393.

Morales, P., Calzada, J., Avila, M., Nunez, M. (2008). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef by single-cycle and multiple-cycle high-pressure treatments. *Journal of food protection*, 71(4), 811-815.

Morita, R.Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39: 144-167.

Mor-Mur, M. (2010). Alimentos tratados por alta presión. Aspectos nutricionales. *Actividad Dietética*, 14(2), 53-58.

Moss, C., Offer, G., Starr, R., Bennett, P. (1975). Interaction of C-protein with myosin, myosin rod and light meromyosin. *J. Mol. Biol.* 97, 1-9.

Motoki, M., Aso, H., Seguro, K., Nino, N. (1987). as1- Casein film prepared using transglutaminase. *Agricultural and biological chemistry*, 48, 1257–1261.

Motoki, M., Seguro, K. (1998) Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Sci.Tech.* 9: 204-210.

Moussa, M., Espinasse, V., Perrier-Cornet, J. M., Gervais, P. (2009). Pressure treatment of *Saccharomyces cerevisiae* in low-moisture environments. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(1), 165-174.

Moxley, R. A., Smith, D. R., Luebbe, M., Erickson, G. E., Klopfenstein, T. J., Rogan, D. (2009). *Escherichia coli* O157: H7 vaccine dose–effect in feedlot cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7), 879-884.

Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., Balny, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 24(1), 81-91.

Murai, S., Arata, T., Inoue, A. (1995). Binding of myosin and its subfragment-1 with antibodies specific to the two heads of the myosin molecule. *The Journal of Biochemistry*, 117(5), 974-979.

Nakatani, N. (1992). Natural antioxidants from spices. In: Huang MT, Ho CT, Lee CY, editors. *Phenolic compounds in food and their effects on health. II. Antioxidants and cancer prevention.* ACS Symposium Series 507. Washington, D.C.: American Chemical Society. P 72–86.

Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142-201.

Nino, N., Motoki, M., Takinami, K. (1985). Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. *Agricultural and biological chemistry*, 49, 2283.

Offer, G., Knight, P. (1988). The structural basis of water-holding in meat. Part 1: General principles and water uptake in meat processing. In: R. A. Lawrie (Ed.), *Developments in meat science* (p. 63–171, Vol. 4).

O'Flynn, C. C., Cruz-Romero, M. C., Troy, D. J., Mullen, A.M., Kerry, J. P. (2014). The application of high-pressure treatment in the reduction of salt levels in reduced-phosphate breakfast sausages. *Meat Science* 96: 1266–1274.

Ohashi, K., Maruyama, K. (1980). A new structural protein located in the Z line of chicken skeletal muscle. En: *Muscle contraction: Its Regulatory Mechanisms*. Eds. S. Ebashi, K. Maruyama y M. Endo. Japan Science Society Press, Tokyo, Japón.

Ohashi, K., Masaki, T., Maruyama, K. (1977). I-protein, a new regulatory protein from vertebrate skeletal muscle. II. Localization. *J. Biochem* 81, 237-246.

Omer, M. K., Alvseike, O., Holck, A., Axelsson, L., Prieto, M., Skjerve, E., Heir, E. (2010). Application of high pressure processing to reduce verotoxigenic *E. coli* in two types of dry-fermented sausage. *Meat science*, 86(4), 1005-1009.

Orlien, V., Hansen, E., Skibsted, L. H. (2000). Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism. *European Food Research and Technology*, 211(2), 99-104.

Orrù, S., Caputo, I., D'Amato, A., Ruoppolo, M., Esposito, C. (2003). Proteomics identification of acyl-acceptor and acyl-donor substrates for transglutaminase in a human intestinal epithelial cell line Implications for celiac disease. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 31766-31773.

Orskov, F.: Genus I. (1984) *Escherichia*. In Krieg, N.R. and Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Williams and Wilkins, London, pp. 420-423.

Oxen, P., Knorr, D. (1993). Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *LWT-Food Science and Technology*, 26(3), 220-223.

Palou, E., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G. V., Welti-Chanes, J., Swanson, B. G. (1997). Effect of water activity on high hydrostatic pressure inhibition of *Zygosaccharomyces bailii*. *Letters in Applied Microbiology*, 24(5), 417-420.

Patterson, M. F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of applied microbiology*, 98(6), 1400-1409.

Patterson, M.F., Margey, D.M., Mills, G., Simpson, R., Gilmour, A. (1997). The effect of high pressure treatment on microorganisms in foods. In: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*. Heremans K (ed). Leuven University Press, Leuven. pp. 269-272.

Pearson, A. M., Gillett, T. A. (1999). *Processed Meats*. Aspen Press, Gaithersburg, Maryland.

Pohlman, F.W. (2006). The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Sci.* 73, 413–421.

Porto-Fett, A. C., Call, J. E., Shoyer, B. E., Hill, D. E., Pshebniski, C., Cocoma, G. J., Luchansky, J. B. (2010). Evaluation of fermentation, drying, and/or high pressure processing on viability of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* spp., and *Trichinella spiralis* in raw pork and Genoa salami. *International journal of food microbiology*, 140(1), 61-75.

Poulter, R. G., Ledward, D. A., Godber, S., Hall, G., Rowlands, B. (1985). Heat stability of fish muscle proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, 20(2), 203-217.

Price, J.F. y Schweigert, B.S. (1987). *The science of meat and meat producís*. W.H. Freeman and Company. San Francisco, E.U. pp 11-77.

Price, J.F., Schweigert, B.S. (1994). *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Ed. Acribia, Zaragoza.

Rastogi NK, Raghavarao KSM, Balasubramaniam VM, Niranjana K, Knorr D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47:1–44.

Regenstein, J. M. and C. E. Regenstein (1984). *Food Protein Chemistry*. Orlando, Academic Press.

Reische, D.W., Lillard, D.A., and Eitenmiller, R.R. (2002). Antioxidants. In: Akoh, C.C., and Min, D.B., Eds., *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Marcel Dekker, New York.

Rhee, K. S. (1988.) Enzymic and nonenzymic catalysis of lipid oxidation in muscle foods. *Food Technol.* 42, 127–132.

Rhee, K. S. (1999). Storage stability of meat products as affected by organic and inorganic additives and functional ingredients. In *Quality attributes of muscle foods* (pp. 95-113). Springer, Boston, MA.

Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308, 681 – 685.

Rivas, M., Sosa-Estani, S., Rangel, J., Caletti, M. G., Vallés, P., Roldán, C. D., Balbi, L., Marsano, M.C., Amoedo, D., Miliwebsky, E., Chinen, I., Hoekstra, R.M., Mead, P., Griffin, P.M (2008). Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerging infectious diseases*, 14(5), 763.

Rodrigues, I., Trindade, M. A., Caramit, F. R., Candoğan, K., Pokhrel, P. R., Barbosa-Cánovas, G. V. (2016). Effect of high pressure processing on physicochemical and microbiological properties of marinated beef with reduced sodium content. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38, 328-333.

Rojas, M. C., Brewer, M. S. (2007). Effect of natural antioxidants on oxidative stability of cooked, refrigerated beef and pork. *Journal of food science*, 72(4).

Ruusunen, M., Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat science*, 70(3), 531-541.

Salih, A. M. (1986). Lipid stability in turkey meat as influenced by cooking refrigerated and frozen storage, salt, metal cations and antioxidants. Ph.D. thesis, Michigan State University, East Lansing, MI.

Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torresco, G., Beltrán, J. A., Roncalés, P. (2001). The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science*, 58(4), 421-429.

Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torresco, G., Beltrán, J. A., Roncales, P. (2003a). Antioxidant action of borage, rosemary, oregano, and ascorbic acid in beef patties packaged in modified atmosphere. *Journal of Food Science*, 68(1), 339-344.

Sánchez-Escalante, A., Torresco, G., Djenane, D., Beltrán, J.A. and Roncalés, P. (2003b). Combined effect of modified atmosphere packaging and addition of lycopene rich tomato pulp, oregano and ascorbic acid and their mixtures on the stability of beef patties. *Food Sci. Technol. Int.* 9, 77–85.

Sebranek, J. G., Sewalt, V. J. H., Robbins, K., Houser, T. A. (2005). Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat science*, 69(2), 289-296.

Selani, M. M., Shirado, G. A., Margiotta, G. B., Rasera, M. L., Marabesi, A. C., Piedade, S. M., Contreras-Castillo, C.J., Canniatti-Brazaca, S. G. (2016). Pineapple by-product and canola oil as partial fat replacers in low-fat beef burger: Effects on oxidative stability, cholesterol content and fatty acid profile. *Meat science*, 115, 9-15.

Serdaroglu, M., Yildiz-Turp, G., Ergezer, H. (2008). Effects of reducing salt levels on some quality characteristics of turkey meatball. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 11(2), #26.

Sheng, H., Lim, J. Y., Knecht, H. J., Li, J., Hovde, C. J. (2006). Role of *Escherichia coli* O157: H7 virulence factors in colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Infection and immunity*, 74(8), 4685-4693.

Shigehisa, T., Ohmori, T., Saito, A., Taji, S., Hayashi, R. (1991). Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 12(2-3), 207-215.

Sikes, A. L., Tobin, A. B., Tume, R. K. (2009). Use of high pressure to reduce cook loss and improve texture of low-salt beef sausage batters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 405-412.

Simpson, R. K., Gilmour, A. (1997). The effect of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and model food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 83(2), 181-188.

Siu, N. C., Ma, C. Y., Mine, Y. (2002). Physicochemical and structural properties of oat globulin polymers formed by a microbial transglutaminase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(9), 2660-2665.

Smelt, J. P. P. M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in food science and technology*, 9(4), 152-158.

Smith, G. C., Belk, K. E., Sofos, J. N., Tatum, J. D., Williams, S. N. (2000). Economic implications of improved color stability in beef. *Antioxidants in muscle foods: Nutritional strategies to improve quality*. Wiley, New York, NY, 397-426.

Sofos, J.N (1989). Phosphates in meat products. S. Thorne (Ed.), *Developments in food preservation – 5*, Elsevier Applied Science, New York, pp. 207-252.

Soukoulis, C., Lebesi, D., Tzia, C. (2009). Enrichment of ice cream with dietary fibre: Effects on rheological properties, ice crystallisation and glass transition phenomena. *Food Chemistry*, 115(2), 665-671.

Speroni, F., Szerman, N., Vaudagna, S. R. (2014). High hydrostatic pressure processing of beef patties: Effects of pressure level and sodium tripolyphosphate and sodium chloride concentrations on thermal and aggregative properties of proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 23, 10-17.

Stabursvik, E., Martens, H. (1980). Thermal denaturation of proteins in post rigor muscle tissue as studied by differential scanning calorimetry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(10), 1034–1042.

Stone, D., Smillie, L. B. (1978). The amino acid sequence of rabbit skeletal alpha-tropomyosin. The NH₂-terminal half and complete sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 253(4), 1137-1148.

Straub, F.B. y Feuer, G. (1950). Adenosinetriphosphate. The functional group of actin. *Biochem. Biophys. Acta* 4, 455-461.

Styles, M. F., Hoover, D. G., Farkas, D. F. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 56(5), 1404-1407.

Suzuki, A., Watanabe, M., Ikeuchi, Y., Saito, M., Takahashi, K. (1993). Effects of high-pressure treatment on the ultrastructure and thermal behaviour of beef intramuscular collagen. *Meat science*, 35(1), 17-25.

Swatland, H.J. (1991). *Estructura y desarrollo de los animales de abasto*. Ed. Acribia, Zaragoza.

Szczesniak, A. S. (1963). Classification of textural characteristics. *Journal of food science*, 28(4), 385-389.

Szerman, N., Guibaldo, C., Sanow, C., Vaudagna, S.R. (2011). Efecto de la aplicación de altas presiones hidrostáticas sobre las propiedades fisicoquímicas de medallones de carne vacuna, *La industria cárnica latinoamericana*, vol 173, pág.42-49.

Takahashi K, Ishii H, Ishikawa H (1993) Sterilization of bacteria and yeast by hydrostatic pressurization at low temperature: effect of temperature, pH and the concentration of proteins, carbohydrates and lipids. In: Hayashi R (ed) *High pressure bioscience and food science*. San-ei Publishing Co., Kyoto, Japan, pp 244–249.

Thebaudin, J.Y., Lefebvre, A.C., Harrington M., Burgués, C.M. (1997). Las fibras dietéticas: interés nutricional y tecnológica *Tendencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8 (1997), pp. 41 – 48.

Tintchev, F., Bindrich, U., Toepfl, S., Strijowski, U., Heinz, V., Knorr, D. (2013). High hydrostatic pressure/temperature modeling of frankfurter batters. *Meat science*, 94(3), 376-387.

Toldrà, M., Dàvila, E., Sagner, E., Fort, N., Salvador, P., Parés, D., Carretero, C. (2008). Functional and quality characteristics of the red blood cell fraction from biopreserved porcine blood as influenced by high pressure processing. *Meat science*, 80(2), 380-388.

Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins—Implications on structure and quality of meat products. *Meat science*, 70(3), 493-508.

Toyoda, N., Maruyama, K. 1978. Fine structure of connection net in cardiac myofibrils. *J. Biochem* 84,239-246.

Trespalacios, P., Pla, R. (2007). Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels. *Food Chemistry*, 100(1), 264-272.

Trout, G. R., Schmidt, G. R. (1986). Effect of phosphates on the functional properties of restructured beef rolls: the role of pH, ionic strength, and phosphate type. *Journal of Food Science*, 51(6), 1416-1423.

Troutt, E. S., Hunt, M. C., Johnson, D. E., Claus, J. R., Kastner, C. L., Kropf, D. H. (1992). Characteristics of low-fat ground beef containing texture-modifying ingredients. *Journal of Food Science*, 57(1), 19-24.

Tseng, T. F., Chen, M. T., Liu, D. C. (2002). Purification of transglutaminase and its effects on myosin heavy chain and actin of spent hens. *Meat science*, 60(3), 267-270.

Tuboly, E., Lebovics, V. K., Gaál, Ö., Mészáros, L., Farkas, J. (2003). Microbiological and lipid oxidation studies on mechanically deboned turkey meat treated by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 56(2-3), 241-244.

Ulmer, H. M., Gänzle, M. G., Vogel, R. F. (2000). Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1.460. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3966-3973.

Utrera, M., Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Estévez, M. (2012). Formation of lysine-derived oxidation products and loss of tryptophan during processing of porcine patties with added avocado byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(15), 3917-3926.

Vachon, J. F., Kheadr, E. E., Giasson, J., Paquin, P., Fliss, I. (2002). Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*, 65(2), 345-352.

Vaithyanathan, S., Naveena, B. M., Muthukumar, M., Girish, P. S., Kondaiah, N. (2011). Effect of dipping in pomegranate (*Punica granatum*) fruit juice phenolic solution on the shelf life of chicken meat under refrigerated storage (4 C). *Meat science*, 88(3), 409-414.

Van der Plancken, I., Van Loey, A., Hendrickx, M. E. (2005). Combined effect of high pressure and temperature on selected properties of egg white proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(1), 11-20.

Van Opstal, I., Vanmuysen, S. C., Michiels, C. W. (2003). High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 1-9.

Vanlint, D., Rutten, N., Michiels, C. W., Aertsen, A. (2012). Emergence and stability of high-pressure resistance in different food-borne pathogens. *Applied and environmental microbiology*, 78(9), 3234-3241.

Vaudagna, S. R., Gonzalez, C. B., Guignon, B., Aparicio, C., Otero, L., Sanz, P. D. (2012). The effects of high hydrostatic pressure at subzero temperature on the quality of ready-to-eat cured beef carpaccio. *Meat science*, 92(4), 575-581.

Venel, C., Mullen, A. M., Downey, G., Troy, D. J. (2001). Prediction of tenderness and other quality attributes of beef by near infrared reflectance spectroscopy between 750 and 1100 nm; further studies. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 9(3), 185-198.

Vigoreaux, J. O. (1994). The muscle Z band: lessons in stress management. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 15(3), 237-255.

Villamonte, G., Simonin, H., Durantou, F., Chéret, R., de Lamballerie, M. (2013). Functionality of pork meat proteins: Impact of sodium chloride and phosphates under high-pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18, 15–23.

Wackerbarth, H., Kuhlmann, U., Tintchev, F., Heinz, V., Hildebrandt, P. (2009). Structural changes of myoglobin in pressure-treated pork meat probed by resonance Raman spectroscopy. *Food chemistry*, 115(4), 1194-1198.

Wang, K., McClure, J., Tu, A. (1979). Titin: a major myofibrillar component. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 3698-3705.

Wang, S. F., Smith, D. M., Steffe, J. F. (1990). Effect of pH on the dynamic rheological properties of chicken breast salt-soluble proteins during heat-induced gelation. *Poultry Science*, 69(12), 2220-2227.

Welti-Chanes, J., López-Malo, A., Palou, E., Bermúdez, D., Guerrero-Beltrán, J. A., Barbosa-Cánovas, G. V. (2005). Fundamentals and applications of high pressure processing to foods. *Novel food processing technologies*, 157-181.

Whitney, B. M., Williams, R. C., Eifert, J., Marcy, J. (2007). High-pressure resistance variation of *Escherichia coli* O157: H7 strains and *Salmonella* serovars in tryptic soy broth, distilled water, and fruit juice. *Journal of food protection*, 70(9), 2078-2083.

Williams P, Warwick L. (1980). *Gray's Anatomy*. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Wirth, F. (1990). "Salado y curado de embutidos cocidos y productos curados cocidos". *Fleishwirtsch español*, 2, p. 52-57.

Wood, J. D. (1990). Consequences for meat quality of reducing carcass fatness. *Consequences for meat quality of reducing carcass fatness*, 344-397.

World Health Organization. Sodium intake for adults and children. Geneva: WHO, 2013 (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77985/1/9789241504836_eng.pdf?ua=1&ua=1).

Wouters, P. C., Glaasker, E., Smelt, J. P. (1998). Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 509-514.

Wright, D. J., Wilding, P. (1984). Differential scanning calorimetric study of muscle and its proteins: Myosin and its subfragments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(3), 357–372.

Wuytack, E. Y., Diels, A. M., Michiels, C. W. (2002). Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 77(3), 205-212.

Yamamoto, K., Yoshida, Y., Morita, J. I., Yasui, T. (1994). Morphological and physicochemical changes in the myosin molecules induced by hydrostatic pressure. *The Journal of Biochemistry*, 116(1), 215-220.

Yang, H., Han, M., Bai, Y., Han, Y., Xu, X., Zhou, G. (2015). High pressure processing alters water distribution enabling the production of reduced-fat and reduced-salt pork sausages. *Meat science*, 102, 69-78.

Yang, H., Khan, M. A., Yu, X., Zheng, H., Han, M., Xu, X., Zhou, G. (2016). Changes in protein structures to improve the rheology and texture of reduced-fat sausages using high pressure processing. *Meat science*, 121, 79-87.

Yasui, T., Ishioroshi, M., & Samejima, K. (1982). Effect of actomyosin on heat-induced gelation of myosin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(4), 1049-1059.

Yasui, T., Ishioroshi, M., Samejima, K. (1980). Heat-induced gelation of myosin in the presence of actin. *Journal of Food Biochemistry*, 4(2), 61-78.

Yu L., Scanlin L., Wilson J., Schmidt G. (2002). Rosemary extracts as inhibitors of lipid oxidation and color change in cooked turkey products during refrigerated storage. *Journal of Food Science* 67: 582-585.

Yuste, J., Capellas, M., Pla, R., Fung, D. Y., Mor-Mur, M. (2001). High pressure processing for food safety and preservation: a review. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 9(1), 1-10.

Yuste, J., Pla, R., Capellas, M., Ponce, E., Mor-Mur, M. (2000). High-pressure processing applied to cooked sausages: bacterial populations during chilled storage. *Journal of Food Protection*, 63(8), 1093-1099.

Zayas, J. F. (1997). Solubility of proteins. In *Functionality of proteins in food* (pp. 6-75). Springer, Berlin, Heidelberg.

Zhang, H., Li, L., Tatsumi, E., Isobe, S. (2005). High-pressure treatment effects on proteins in soy milk. *LWT-Food Science and Technology*, 38(1), 7-14.

Zhang, Y. M., Rock, C. O. (2008). Thematic review series: Glycerolipids. Acyltransferases in bacterial glycerophospholipid synthesis. *Journal of lipid research*, 49(9), 1867-1874.



Zheng, W., Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(11), 5165-5170.

Zhou, Y., Karwe, M. V., Matthews, K. R. (2016). Differences in inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 strains in ground beef following repeated high pressure processing treatments and cold storage. *Food microbiology*, 58, 7-12.

Ziegler, G. R., Acton, J. C. (1984). Mechanisms of gel formation by proteins of muscle tissue. *Food Technology*.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica del extracto de romero

 Basel <i>Tecnología en Vegetales</i>		Warries 1446 Lanus Oeste Pcia. Bs.As Argentina Te: 5411-4262-9018 y Rotativas E-mail: Info@laboratoriobasel.com.ar mail: cotizacion@laboratoriobasel.com.ar www.laboratoriobasel.com		E-
ROMERO EXTRACTO ACUOSO				
Lote Analysis		RRT 555	Manufactura Vencimiento	Sep-15 / SEP. 17
Analisis Macro - Microscopico				
Nombre Cientifico	Rosmarius Officinalis			Cumple
Familia	Labiadas			Cumple
Parte Usada	Hoja			Cumple
Origen	Argentina			Cumple
Droga / Extracto	5:1			Cumple
Metodo de Extraccion	Acuoso			Cumple
Analisis Cual-Cuantitativo				
Aspecto	Liquido de color marron con olor y sabor caract.			Cumple
Identificacion	TLC-			Cumple
Principio Activo	Aceites esenciales- Diosmina			Cumple
Perdida por Desecacion	105º en 2 Hs			6,70%
Granulometria	no presenta particulas en suspension			Cumple
Solubilidad	Soluble en agua y alcohol			Cumple
Solvente Residual	Negativo			Cumple
Presencia de Arsenico	Negativo			Cumple
Presencia de Plomo	Negativo			Cumple
Presencia de Mercurio	Negativo			Cumple
Presencia de Sulfato	Negativo			Cumple
Pesticidas	Negativo			Cumple
PH	4-8			Cumple
Cenizas	>5%			6,40%
Densidad	0.9920 grs/ml			Cumple
Bibliografia	Farmacopea Europea			Cumple
Analisis Microbiologico				
E. Coli	Negativo			Cumple
Salmonella sp.	Negativo			Cumple
Staphilococcus Aerius	Negativo			Cumple
Pseudomona	Negativo			Cumple
Aerobios	<= 1000 CFU / G			Cumple
Hongos y Levaduras	<= 100 CFU / G			Cumple
Enterobacterias	<= 100 CFU / G			Cumple
Bacterias Coliformes	<= 10 CFU / G			Cumple
Aflatoxinas	Negativo			Cumple
Conservar en envase original bien cerrado, protegido de la humedad, calor y luz solar.				
 Farm. M. K. D. de PONS M. P. 17348				

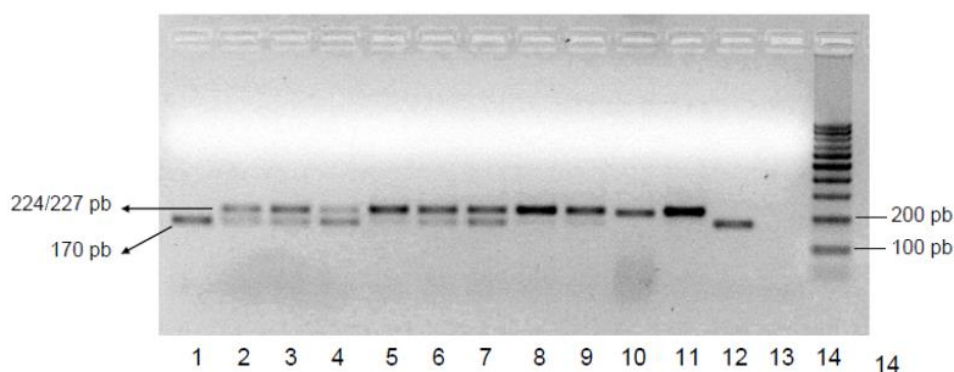
Anexo 2. Procedimiento para la detección de STEC 0157

Manual de Procedimientos "Detección de STEC O157 y no-O157 en alimentos por SIM y PCR"

4.7.- PCR MK para la detección de los genes *stx1* y *stx2*

Se utilizan los "primers" MK1 y MK2 que amplifican un fragmento de 224/227 pb de la región conservada del gen *stx* para *Stx1* y *Stx2*.

Primer	Secuencia del primer (5'- 3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
MK1	TTTACGATAGACTTCTCGAC	224 o 227
MK2	CACATATAAATTATTTTCGCTC	



Productos de amplificación por PCR para la detección del gen *stx* en cepas de referencia y en cepas STEC de distinto origen. Línea 1: *E. coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia. Línea 2: *E. coli* O157:H7 (*stx1*, *stx2*). Línea 3: *E. coli* ONT:H21 (*stx2d*-Ount). Línea 4: *E. coli* O157:H7 (*stx2a*). Línea 5: *E. coli* O111:NM (*stx1*, *stx2*). Línea 6: *E. coli* O25:H2 (*stx2*). Línea 7: *E. coli* ONT:H19 (*stx2*). Línea 8: *E. coli* O26:H11 (*stx1*). Línea 9: *E. coli* O8:H19 (*stx2*). Línea 10: *E. coli* (*stx2vh-b*). Línea 11: control positivo. Línea 12: control negativo. Línea 13: control de reactivos (mezcla sin templado). Línea 14: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

Referencia

- Karch H, Meyer T. (1989). Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 2751-2757.

Anexo 3. Procedimiento para la detección de STEC 0157

Manual de Procedimientos "Detección de STEC O157 y no-O157 en alimentos por SIM y PCR"

Protocolo PCR MK

Programa de amplificación

Paso N°	Etapa	Temperatura °C	Tiempo	Va al paso N°	N° veces
1	Desnaturalización	94	5 min		
2	Desnaturalización	94	1 min		
3	Pegado de primers o Annealing	53	1 min		
4	Extensión	72	1 min	2	29
5	Extensión	72	2 min		
6	Pausa	4	pausa		

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 2,5% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño del fragmento amplificado

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
MK1 / MK2	224-227