UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***“Efectos de la aplicación de tecnologías no térmicas
(altas presiones hidrostáticas y ozono gaseoso) en las
características fisicoquímicas, microbiológicas y
parámetros de calidad de carnes bovinas”***

Tesista: María Belén Giménez

Director/a: Natalia Graiver

Codirector/a: Noemí Zaritzky

Año: 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

“Efectos de la aplicación de tecnologías no térmicas (altas presiones hidrostáticas y ozono gaseoso) en las características fisicoquímicas, microbiológicas y parámetros de calidad de carnes bovinas”

Tesis Doctoral

Autor: María Belén Giménez

Directora: Natalia Graiver

Co-Directora: Noemí Zaritzky

Lugar de Trabajo: CIDCA. Centro de Investigación y Desarrollo en
Criotecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas.

UNLP-CONICET. Calle 47 y 116 s/n° La Plata (1900) Argentina

Tel/Fax: (0221) 424-9287 / 425-4853.

Año 2019

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Exactas fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET-Facultad de ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), bajo la dirección de la Dra. Natalia Graiver y la co-dirección de la Dra Noemí Zaritzky.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que contribuyeron para que este trabajo pueda ser realizado:

- ❖ *A mis directoras, Natalia y Mimi, que me dieron la oportunidad de transitar esta etapa tan importante, me guiaron y acompañaron durante este tiempo y siempre estuvieron presente. Quisiera agradecerles el tiempo, la dedicación y la confianza que depositaron*
 - ❖ *A las autoridades del centro de investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) y todas las personas que trabajan en el instituto por haberme permitido realizar la Tesis y utilizar todas las facilidades disponibles.*
 - ❖ *Al CONICET por otorgarme la beca que me permitió la realización de este trabajo.*
 - ❖ *A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por la formación de grado que me brindó.*
 - ❖ *A los investigadores Hernan Rodriguez del INIFTA y a Leda Gianuzzi por permitirme realizar trabajos con ellos y enseñarme técnicas nuevas.*
 - ❖ *A los miembros del ITA-INTA-CASTELAR, Sergio Vaudagna y Claudio Sanow, por facilitarme el uso del equipo de alta presión y ayudarme en la preparación de las muestras.*
 - ❖ *A mis compañeros de grupo, Juliana, John y los del grupo de hidrocoloides e histología con quienes compartí muchas horas de laboratorio y de escritorio. Con ellos formamos un muy buen grupo de trabajo y siempre me brindaron ayuda, consejos, mates y sobre todo mucha comprensión!*
 - ❖ *A Vicente Valente por la colaboración con la preparación de los medios de cultivo y el envasado al vacío de las muestras*
-

-
- ❖ *A toda mi familia. Mama y Papa gracias por darme la posibilidad de poder estudiar una carrera que me gustaba, por apoyarme y siempre confiar en que podía hacer las cosas. A mis hermanos por bancarme todos estos años.*
 - ❖ *A mis compañeros de la Cátedra de Química Analítica Instrumental, Ale, Lu, Susan, Dani, Cristian, Meli, Ezequiel, Pato y Mario, con quienes comparto una de las vocaciones más lindas como es la docencia.*
 - ❖ *A todos mis amigos generados en la ciudad de la plata, por darme la posibilidad de ser parte del grupo y hacer más linda la estadía en esta ciudad. Por estar en los momentos buenos y malos.*
 - ❖ *A mis compañeras de box Juli, Estefa, Clau, Andre, Nati, Nati, Gaby, Lucho, Vicky y Feli, que generaban esas ganas de ir a trabajar con buena gente. Con los que compartí mates, tortas en la semana de castigo, muchas risas sobre todo con Vicky.*
 - ❖ *A mis amigas de toda la vida, por estar conmigo a la distancia durante mi carrera, por apoyarme cuando lo necesite.*
 - ❖ *A las buenas personas que conocí en el instituto, que compartieron su lugar y me brindaron su ayuda cuando lo necesitaba,*
 - ❖ *Y no me puedo olvidar del grupo de los viernes dulce-Salado, con los cuales compartimos todos los viernes un lindo almuerzo donde todos se esmeran para que cada uno disfrute del momento y deguste cosas más que ricas.*

¡A todos mis más sinceros agradecimientos!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1: Introducción general

1.1	Tratamientos de conservación	1
1.2	Consideraciones generales de consumo de carne.....	2
1.3	Carne bovina.....	5
1.3.1	Estructura del músculo esquelético.....	6
1.3.2	Cambios en el músculo post-mortem.....	11
1.4	Pigmentación.....	13
1.4.1	La mioglobina y sus estados químicos.....	14
1.5	Microbiología de la carne.....	17
1.5.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	18
1.5.2	Modelado matemático del desarrollo microbiano.....	19
1.6	Métodos no térmicos de preservación de alimentos.....	21
1.6.1	Proceso de ozonización.....	21
1.6.1.1	Características del ozono.....	23
1.6.1.2	Generación de ozono.....	25
1.6.1.3	Factores críticos que afectan la eficacia del ozono.....	27
1.6.1.3.1	Factores extrínsecos.....	28
1.6.1.3.2	Factores intrínsecos.....	29
1.6.1.4	Aplicación de ozono en la industria cárnica.....	30
1.6.2	Proceso de alta presión hidrostática.....	32
1.6.2.1	Equipos de alta presión para procesamiento de alimento....	34
1.6.2.2	Etapas del proceso.....	36
1.6.2.3	Alta presión hidrostática y microorganismos patógenos.....	39
1.6.2.4	Alta presión hidrostática y carne vacuna.....	41

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.6.2.5	Curado.....	43
1.6.2.5.1	Cloruro de sodio.....	44
1.6.2.5.1.1	Funciones de la sal.....	44
1.6.2.5.1.2	Penetración de la sal en la carne.....	45
1.6.2.5.1.3	Cuantificación de la sal.....	46
1.6.2.5.2	Nitritos y nitratos.....	46
1.6.2.5.2.1	Funciones.....	48
1.6.2.5.2.2	Toxicidad del nitrito.....	52
1.6.2.5.2.3	Cuantificación de nitrito.....	54
1.6.2.5.2.4	Valores límites.....	55
1.6.2.5.3	Ácido ascórbico.....	55
1.6.2.5.3.1	Funciones.....	56
1.7	Objetivos de la tesis.....	58
1.7.1	Generales.....	58
1.7.2	Objetivos específicos:.....	58

CAPÍTULO 2: Materiales y Métodos

2.1	Materia prima.....	60
2.2	Caracterización de la materia prima.....	61
2.2.1	Análisis de composición centesimal del tejido cárneo.....	61
2.2.1.1	Humedad (método 24.002, AOAC, 1984).....	61
2.2.1.2	Ceniza (método 24.009, AOAC, 1984).....	61
2.2.1.3	Proteínas (método 24.027, AOAC, 1984).....	61
2.2.1.4	Lípidos (método 24.005, AOAC, 1984).....	62

ÍNDICE DE CONTENIDOS

2.2.2 pH	62
2.3 Color	63
2.3.1 Determinación de color superficial.....	63
2.3.2 Reflectancia difusa.....	65
2.4 Análisis de textura.....	66
2.5 Exudado	67
2.6 Actividad acuosa.....	68
2.7 Oxidación lipídica.....	68
2.8 Determinaciones Analíticas.....	70
2.8.1 Determinación analítica de nitrito.....	71
2.8.2 Determinación del contenido de cloruro de sodio en el tejido cárneo.....	72
2.9 Calorimetría diferencia de barrido.....	74
2.10 Espectroscopia infrarroja con transformada de fourier (FTIR).....	75
2.11 Microscopía electrónica de barrido ambiental.....	81
2.12 Recuentos microbianos.....	82
2.13 Inoculación y supervivencia <i>Listeria monocytogenes</i>	85
2.14 Análisis sensorial.....	86
2.15 Almacenamiento refrigerado.....	87
2.16 Análisis Estadístico.....	88

CAPÍTULO 3: Caracterización de la materia prima

3.1 Carne bovina.....	89
3.2 Composición de la carne.....	90
3.3 Textura.....	91

ÍNDICE DE CONTENIDOS

3.4	Exudado y actividad acuosa.....	92
3.5	Color.....	93
3.6	Oxidación lipídica.....	95
3.7	Recuentos microbianos.....	96
3.8	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	97
3.9	Espectroscopia Infrarroja con transformada de fourier (FTIR).....	99
3.10	Microscopía electrónica de barrido ambiental.....	105

CAPÍTULO 4: Tratamiento con ozono gaseoso

4.1	Tratamiento con ozono.....	107
4.2	Cuantificación de ozono por iodometría.....	108
4.2.1	Técnica analítica.....	110
4.2.2	Determinación de la concentración de entrada al tanque de ozonización.....	112
4.2.3	Modelado matemático de la evolución de la concentración de ozono en la cámara de ozonización.	112
4.3	Aplicación de ozono.....	114
4.3.1	Ensayo con ozono.....	115
4.4	Resultados	118
4.4.1	Ensayos A, B y C	118
4.4.1.1	Color	118
4.4.1.2	Textura.....	120
4.4.1.3	Recuentos microbianos.....	121
4.4.2	Ensayo D	123

ÍNDICE DE CONTENIDOS

4.4.2.1	Color	123
4.4.2.2	Textura, aw y oxidación lipídica	125
4.4.2.3	Recuento de microorganismos heterótrofos	127
4.5	Optimización del tratamiento con ozono	130
4.6	Efecto del ozono sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	132
4.6.1	Resultados	133
4.7	Análisis sensorial	136
4.8	Conclusiones parciales	140

CAPÍTULO 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

5.1	Altas presiones hidrostáticas.....	143
5.2	Equipo y metodología	143
5.2.1.	Aplicación del tratamiento de altas presiones hidrostáticas	143
5.2.2.	Soluciones utilizadas.....	145
5.2.3.	Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre las muestras de carne fresca	145
5.3	Resultados	146
5.3.1.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	146
5.3.2.	Espectroscopía Infrarroja (FTIR).....	147
5.3.3.	Color	149
5.4	Selección de aditivos a incorporar en la solución de inmersión.....	151
5.4.1.	Resultados y discusión.....	155
5.4.1.1.	Color.....	155

ÍNDICE DE CONTENIDOS

5.4.2. Textura.....	159
5.5 Optimización del pre-tratamiento.....	162
5.5.1. Efecto de las concentraciones de ácido ascórbico y NaNO_2 en la solución de inmersión en el color y textura de las muestras de carne.....	162
5.5.2. Metodología de superficie de respuesta (RSM).....	162
5.5.3. Optimización de múltiples respuestas	164
5.5.4. Diseño de los experimentos de optimización de la composición de la solución de inmersión.....	166
5.6 Resultados.....	168
5.6.1. Metodología de superficie de respuesta.....	169
5.6.2. Validación experimental de la concentración óptima predicha.....	176
5.6.3. Efecto de las soluciones de inmersión y el tratamiento de APH sobre las proteínas miofibrilares.....	178
5.7 Conclusiones parciales.....	182

CAPÍTULO 6: Tratamiento por APH: efecto de la concentración de NaCl y almacenamiento refrigerado

6.1 Consumo de sodio y sus efectos adversos en la salud.....	185
6.2 Efecto de la concentración de cloruro de sodio en la solución de inmersión.....	186
6.3 Resultados.....	187
6.3.1. Cuantificación de la concentración residual de NaCl y NaNO_2 en el tejido cárnicos.	187
6.3.2. Microscopia electrónica de barrido ambiental (ESEM).....	188
6.3.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	189

ÍNDICE DE CONTENIDOS

6.3.4. Espectroscopía infrarroja (FTIR)	192
6.3.5. Coloración superficial	195
6.4 Reflectancia difusa.....	198
6.4.1. Espectros de reflectancia difusa en carne fresca.....	199
6.4.1. Teoría de Kubelka-Munk	201
6.4.2. Ecuaciones de la Teoría de Kubelka-Munk para tejido muscular que contiene oxi, mio y metamioglobina.....	202
6.4.3. Determinación de reflectancia para los pigmentos mio, meta, oxi y nitrosomioglobina en muestras de tejido (muestras de referencia).....	207
6.4.4. Resultados de reflectancia difusa en muestras sometidas a tratamiento químico y altas presiones.....	214
6.4.5. Efecto del tratamiento químico y la presión aplicada en la decoloración de las muestras utilizando reflectancia difusa.....	222
6.5 Análisis sensorial de las muestras tratadas con los preservadores químicos.....	225
6.6 Conclusiones parciales.....	229

CAPÍTULO 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

7.1 Estabilidad fisicoquímica durante el almacenamiento refrigerado a 4°C en muestras sometidas a dos tratamientos químicos y dos niveles de APH.....	232
7.1.1 Color	233
7.1.2 Textura	239
7.1.3 Oxidación lipídica	240
7.2 Recuentos microbianos de heterótrofos (hongos y levaduras, bacterias	

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ácido lácticas, mesófilas, psicrotóficas y enterobacterias).....	243
7.3 Efecto del tratamiento con aditivos químicos y APH sobre el desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> y parámetros fisicoquímicos durante el almacenamiento refrigerado a 4 y 10°C.....	248
7.3.1 Color y Textura.....	249
7.3.2 Desarrollo de <i>L. monocytogenes</i>	251
7.3.2.1 Inoculación	251
7.3.2.2 Modelado Matemático del desarrollo microbiano: modelo de Gompertz.....	252
7.3.2.3 Desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> y modelado de los resultados.....	254
7.4 Conclusiones parciales.....	262

CAPÍTULO 8: Conclusiones y publicaciones

Conclusiones Generales.....	264
Publicaciones realizadas.....	270

BIBLIOGRAFÍA.....	273
-------------------	-----

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Valores de banda de absorción de IR y los movimientos vibracionales que las provocan en los enlaces moleculares de mayor interés biológico.....	79
Tabla 3.1: Composición centesimal de la carne vacuna.....	90
Tabla 3.2: Fuerza en función del tiempo (semanas) de almacenamiento refrigerado de la carne fresca.....	92
Tabla 3.3: Evolución de la actividad acuosa (aw) y el exudado durante el	

ÍNDICE DE CONTENIDOS

almacenamiento refrigerado de la carne fresca.....	92
Tabla 3.4.: Evolución de los parámetros cromáticos durante el almacenamiento refrigerado de la carne fresca.....	94
Tabla 3.5: N° TBARS en función del tiempo (semanas) de almacenamiento refrigerado de la carne fresca.....	95
Tabla 3.6: Recuento microbiano durante el almacenamiento refrigerado de la carne fresca.....	97
Tabla 3.7: Posición de la banda amida I de diferentes elementos de estructura secundaria. (H. Torii, M. Tasumi (1996)).....	102
Tabla 3.8: Porcentaje de estructuras de proteínas (β -Sheet, Estructura desordenada, α -Hélice, β -Turn) de carne.....	105
Tabla 4.1: Evolución de la concentración de ozono dentro de la cámara en función del tiempo.....	114
Tabla 4.2: Diseño experimental empleado.....	118
Tabla 4.3: Efecto del tratamiento con ozono sobre la fuerza.....	121
Tabla 4.4: Recuentos de la flora heterótrofa en las muestras control (CF) y en carne vacuna tratado con 218 mg/m ³ de ozono durante los distintos periodos de tratamiento.....	122
Tabla 4.5: Variaciones de color superficial de muestras tratadas con ozono durante los distintos tiempos de ozonización.....	124
Tabla 4.6: Efecto del tratamiento con ozono sobre la textura, aw y oxidación lipídica en muestras cárneas.....	127
Tabla 4.7: Efecto del tratamiento con ozono sobre la inactivación de heterótrofos totales en muestras cárneas.....	128
Tabla 4.8: Efecto del tratamiento con ozono sobre la inactivación de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> en muestras cárneas inoculadas con 10 ³ UFC/ml.....	134
Tabla 4.9: Seis ordenes de presentación de una prueba triangular.....	137
Tabla 4.10: Prueba binomial de un extremo. Probabilidad de X o más juicios correctos en <i>n</i> pruebas ($p=1/3$).....	139

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Tabla 5.1: Diseño experimental empleado para la selección de otros aditivos a incorporar en la solución de inmersión.....	154
Tabla 5.2: Concentraciones de las diferentes salmueras utilizadas en el DCC.....	167
Tabla 5.3: Concentración remanente de nitrito de sodio y cloruro de sodio.....	169
Tabla 5.4: Parámetros de color experimental y predicho de las muestras de carne sumergidas en la solución conservante optimizada y tratadas con APH a 300 y 600 MPa.....	177
Tabla 5.5: Comparación de los parámetros a^* y b^* entre la carne fresca y la carne tratada con la solución óptima	178
Tabla 5.6: Variación de entalpía total (ΔH , w/g) en las diferentes condiciones empleadas	180
Tabla 6.1: Puntos isosbéticos entre los diferentes pigmentos.....	212
Tabla 6.2: Comparación de proporción K/S para los pigmentos de la carne.....	214
Tabla 7.1: Parámetros de color L^* , a^* durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C de muestras de carne fresca (control).....	233
Tabla 7.2: Efecto de APH presiones (400 y 600 MPa) y la concentración de cloruro de sodio en la solución de inmersión (S1: 30 g NaCl/l y S2: 60 g NaCl/l) en el ΔE^* durante almacenamiento refrigerado a 4°C de las muestras de carne de res.....	234
Tabla 7.3: Efecto de APH presiones (400 y 600 MPa) y la concentración de cloruro de sodio en la solución de inmersión (S1: 30 g NaCl/l y S2: 60 g NaCl/l) en el parámetro de color L^* durante almacenamiento refrigerado a 4°C de las muestras de carne de res.....	236
Tabla 7.4: Parámetro de color a^* de muestras de carne en función de la solución de inmersión (S1 y S2) y altas presiones (400 y 600 MPa) durante almacenamiento refrigerado a 4 °C	238

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Tabla 7.5. Aplicación del modelo de Gompertz al desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> en un medio de cultivo de producto cárneo mantenido a 4 °C y 10 ° C y sometido a 400 y 600 MPa. Inóculo 10 ³ UFC/g	259
--	-----

Tabla 7.6. Aplicación del modelo de Gompertz al desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> en un medio de cultivo de producto cárneo mantenido a 4 °C y 10 ° C y sometido a 400 y 600 MPa. Inóculo 10 ⁵ UFC/g	260
--	-----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Exportaciones argentinas de carne vacuna.....	3
Figura 1.2: Consumo de carne vacuna promedio anual.....	4
Figura 1.3: Esquema del músculo esquelético.....	7
Figura 1.4: Estructura de una fibra muscular.....	7
Figura 1.5: Estructura microscópica de la miofibrilla.....	9
Figura 1.6: Estructura filamento fino.....	10
Figura 1.7: Estados químicos de la mioglobina.....	14
Figura 1.8: Estructura de la mioglobina donde se aprecia el grupo hemo (en rojo) y los ocho segmentos en hélice- α	15
Figura 1.9: Áreas de aplicación del ozono en la elaboración de alimentos.....	23
Figura 1.10: Configuración espacial de la molécula de ozono ($\rho = 0.126 \pm 0.002$ nm, $\alpha = 127 \pm 3^\circ$).....	23
Figura 1.11: Esquema de efecto corona.....	26
Figura 1.12: Ejemplos de productos RTE presurizados, actualmente comercializados. Incluyendo: 1) productos cárnicos, 2) productos de la pesca, 3) lácteos, zumos, y platos preparados de vegetales y/o pasta.....	39
Figura 1.13: Modificaciones de la mioglobina en la carne curada.....	51
Figura 1.14: Formación de nitrosaminas y de un agente alquilante.	54

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Figura 2.1: Nalga de adentro sin tapa.....	60
Figura 2.2.: Medicion de pH en carne fresca.....	63
Figura 2.3: Diagrama en el cual se observan la variación en la escala de color CIE Lab* descrito por los parámetros de luminosidad L* y de cromaticidad a* y b*.....	64
Figura 2.4: Colorímetro minolta triestímulo.....	64
Figura 2.5: Espectrofotómetro UV-visible de doble haz.....	65
Figura 2.6: Esfera integradora.....	66
Figura 2.7: Texturometro TA-xT2i Texture Analyser.....	67
Figura 2.8: Equipo Aqualab serie 4TE.....	68
Figura 2.9: Reacción entre el MDA y el TBA en el ensayo de cuantificación de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico.....	69
Figura 2.10: Formación de un colorante azoico por la reacción entre el ácido nitroso y el ácido sulfanílico con una 1-naftol, en medio ligeramente básico. (Reacción de Zambelli).....	72
Figura 2.11: Curva de calibración típica del electrodo selectivo para cloruro.....	73
Figura 2.12: Equipo de calorimetría diferencial de barrido.....	75
Figura 2.13: Espectros de absorción IR.....	76
Figura 2.14: Espectro IR con zonas delimitadas correspondientes a los distintos grupos que absorben a determinados números de onda.....	78
Figura 2.15: Espectrómetro infrarrojo.....	80
Figura 2.16.: Microscopio FEI-Quanta 200.....	82
Figura 2.17: Esquema de diluciones seriadas.....	83
Figura 2.18: Equipo de flujo laminar.....	83
Figura 3.1: Transiciones térmicas de las proteínas cárnicas estudiadas por DSC. Fuente: Findlay y col. (1989).....	98
Figura 3.2: Termogramas obtenido por calorimetría diferencial de barrido	

ÍNDICE DE CONTENIDOS

(DSC) de dos muestras de carne fresca.....	99
Figura 3.3: Estructura secundaria de las proteínas: α -helice (superior) y en hoja plegada o estructura β (inferior)	101
Figura 3.4: Espectro de FTIR de tres muestras de carne fresca.....	103
Figura 3.5: Espectro de deconvolución con las bandas subyacentes	104
Figura 3.6: imagen de ESEM de muestras procesadas tejido del músculo <i>aductor femoris y semimembranoso</i> vacuno a una magnificación 800x.....	105
Figura 4.1: Esquema de la cámara de ozonización.....	108
Figura 4.2: Cámara conectada al equipo de generación de ozono.....	108
Figura 4.3: Tren de tres frascos lavadores en serie.....	109
Figura 4.4: Cámaras de ozonización con las muestras de carne colocadas en los racks.	116
Figura 4.5: Disposición de las muestras cárnicas dentro de la cámara de ozonización.....	117
Figura 4.6: Efecto del ozono sobre los parámetros de color. (■) Parámetro L*, (■) parámetro a*, (■) parámetro b*.....	120
Figura 4.7: Coloración superficial de las muestras ozonizadas según los diferentes tratamientos aplicados.....	125
Figura 4.8: Medios de cultivo sembrados con diluciones del homogeneizado de la carne fresca y la carne tratada con ozono.....	128
Figura 4.9: Recuentos de mesófilos (→) y N° TBARS (—) en función del tiempo de tratamiento con ozono a una concentración media de 279.5 mg/m ³	131
Figura 4.10: Recuentos de mesófilos (→) y Δa^* (→) en función del tiempo de tratamiento con ozono a una concentración media de 279.5 mg/m ³	132
Figura 4.11: Planilla de respuesta para la prueba triangular.....	138
Figura 5.1: Equipo de Alta Presión Hidrostática.	144
Figura 5.2: Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido	

ÍNDICE DE CONTENIDOS

(DSC) de dos muestras de carne fresca sometida a tratamiento de APH. 0 MPa (—), 100 MPa (—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—).....	147
Figura 5.3: Ejemplo de espectro FTIR de carne fresca (—), carne fresca sometida a 400 MPa (—) y carne fresca sometida a 600 MPa (—).....	148
Figura 5.4: Porcentaje de estructuras de proteínas ((β -Sheet (■), Estructura desordenada (■), α -Hélice (■), β -Turn(■)) de muestras de carne fresca sometida a diferentes presiones (100-600 MPa).....	149
Figura 5.5: Efecto de la presión sobre los parámetros de color. (■) Parámetro L*, (■) parámetro a*, (■) parámetro b*.....	150
Figura 5.6: Cambios de coloración en muestras cárnicas frescas y muestras sometidas a presiones entre 100 y 600 MPa.....	151
Figura 5.7: Variación de la luminosidad (L*) de las muestras cárneas en función de las condiciones de pre-tratamiento (C, WA y A) a las diferentes presiones ensayadas 0 MPa (■), 150 MPa (■), 300 MPa (■) y 600 MPa (■).....	156
Figura 5.8: Variación del parámetro a* de las muestras cárneas en función de las condiciones de pre-tratamiento (C, WA y A) a las diferentes presiones ensayadas 0 MPa (■), 150 MPa (■), 300 MPa (■) y 600 MPa (■).....	157
Figura 5.9: Variación del parámetro b* de las muestras cárneas en función de las condiciones de pre-tratamiento (C, WA y A) a las diferentes presiones ensayadas 0MPa (■), 150MPa (■), 300MPa (■) y 600MPa (■).....	158
Figura 5.10: a) 0 MPa, b) 150 MPa, c) 300 MPa y d) 600 MPa, empezando desde la izquierda se encuentra la carne fresca (CF), luego las muestras WA,A.....	159
Figura 5.11: Variación de la Fuerza máxima de las muestras cárneas en función de las condiciones de pre-tratamiento (C, WA y A) a las diferentes presiones ensayadas 0 MPa (■), 150 MPa (■), 300 MPa (■) y 600 MPa	

ÍNDICE DE CONTENIDOS

161
Figura 5.12: Diagrama del diseño central compuesto	164
Figura 5.13: Variación del parámetro a^* en función de la concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico en la salmuera de inmersión para el tratamiento a 300 MPa	170
Figura 5.14: Variación de la luminosidad (L^*) en función de la concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico en la salmuera de inmersión para el tratamiento a 300 MPa	171
Figura 5.15: Variación del parámetro de la luminosidad (L^*) en función de las concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico en la solución de inmersión sometido a 600 MPa	172
Figura 5.16: Variación del parámetro cromático b^* en función de las concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico en la salmuera de inmersión sometido a 600 MPa	173
Figura 5.17: Variación del parámetro cromático a^* en función de las concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico en la salmuera de inmersión sometido a 600 MPa	174
Figura 5.18: Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de carne fresca (—), carne sumergida en la solución de inmersión (—), carne fresca sometida a 300 MPa (—), a 600 MPa (—) y carne sumergida y sometida a 300 MPa (—) y 600 MPa (—)	179
Figura 6.1: microestructura de la carne sometida al pretratamiento con la solución S1 y APH. a) fibras musculares a una magnificación 700X y b) 800X 0MPa, c) 800 X y 400 MPa, d) 800X y 600 MPa	188
Figura 6.2: microestructura de la carne sometida al pretratamiento con la solución S1 y APH. a) fibras musculares a una magnificación 700X y b) 700X 0MPa, c) 800 X y 400 MPa, d) 800X y 600 MPa	189
Figura 6.3: Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de dos muestras de carne fresca sometida a tratamiento de APH. 0	

ÍNDICE DE CONTENIDOS

MPa (—), 100 MPa (—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—).....	190
Figura 6.4: Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de muestras de carne tratadas con la solución: a) S1 y b) S2 Sometida a APH. 0 MPa (—), 100 MPa (—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—)	191
Figura 6.5: Ejemplo de espectro FTIR de carne fresca (—), carne sumergida S1 (3%) y sometida a 400 MPa (—) y carne sumergida S2 (6%) a 400 MPa (—).....	193
Figura 6.6: Porcentaje de estructuras de proteínas: β -Sheet (■), Estructura desordenada (■), α -Hélice (■), β -Turn(■) de carne sumergida en la solución S1 (3%) y luego sometida a diferentes presiones.....	194
Figura 6.7: Porcentaje de estructuras de proteínas: β -Sheet (■), Estructura desordenada (■), α -Hélice (■), β -Turn(■) de carne sumergida en la solución S2 (6%) y luego sometida a diferentes presiones.....	195
Figura 6.8: Cambios de coloración en muestras cárnicas frescas (CF) y tratadas con 3 y 6 % de NaCl sometidas a 100 y 600 MPa.....	196
Figura 6.9: Variación de la luminosidad (L^*) de las muestras cárnicas en función de las condiciones de curado a las diferentes presiones ensayadas. Carne fresca (■), carne sumergida en la solución S1 (3%) (■) y carne sumergida en la solución S2 (6%) (■)	197
Figura 6.10: Variación del parámetro a^* de las muestras cárnicas en función de las condiciones de curado a las diferentes presiones ensayadas. Carne fresca (■), carne sumergida en la solución S1 (3%) (■) y carne sumergida en la solución S2 (6%) (■).....	198
Figura 6.11: Espectros de reflectancia difusa de 3 muestras de carne fresca de musculo para evidenciar las diferencias entre animales	200
Figura 6.12: Espectro de reflectancia de diferentes estados de la mioglobina (Snyder, 1965).	201
Figura 6.13: Espectro de reflectancia en función de la longitud de onda para	

ÍNDICE DE CONTENIDOS

muestras Matriz (—), Metamioglobina (—), Mioglobina (—), Oximioglobina (—), Nitrosomioglobina (—).....209

Figura 6.14: Espectro de la función de Kubelka Munk en función de la longitud de onda para muestras Matriz (—), Metamioglobina (—), Mioglobina (—), Oximioglobina (—), Nitrosomioglobina (—).....210

Figura 6.15: Espectro de la función de Kubelka Munk normalizado en función de la longitud de onda para muestras Matriz (—), Metamioglobina (—), Mioglobina (—), Oximioglobina (—), Nitrosomioglobina (—).....211

Figura 6.16: Comparación de las curvas obtenidas para los patrones y la encontrada en bibliografía. Oximioglobina (—), mioglobina (—), metamioglobina (—) y matriz (—). Bevilacqua y Zaritzky, 1986.....212

Figura 6.17: Carne fresca a) Espectro de reflectancia difusa, b) Espectro de la función de Kubelka Munk de: Matriz (—), 0 MPa (—), 100 MPa(—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—).....216

Figura 6.18: Carne sumergida en la solución de inmersión S1, a) espectro de reflectancia difusa, b) Espectro de la función de Kubelka Munk de: Matriz (—), 0 MPa (—), 100 MPa(—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—).....217

Figura 6.19: Carne sumergida en la solución de inmersión S2, a) espectro de reflectancia difusa, b) Espectro de la función de Kubelka Munk de: Matriz (—), 0 MPa (—), 100 MPa(—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—).....218

Figura 6.20: Proporción de las especies de mioglobina presentes luego de la aplicación de APH a muestras de carne fresca. Mioglobina (—), oximioglobina (—) y metamioglobina (—).....219

Figura 6.21: Relación $r_{572/525}$ para las muestras tratadas con la solución S1 (▲) y con la solución S2 (◆), y relación $r_{473/525}$ para las muestras tratadas con la solución S1(●) y con la solución S2 (■) en función de la

ÍNDICE DE CONTENIDOS

presión, comparadas el patrón de nitrosomioglobina (○).....	220
Figura 6.22: Función de Kubelka-Munk de las muestras con tratamiento químico con las soluciones S1, S2 y sometidas a presión y del patrón de nitrosomioglobina.....	221
Figura 6.23: $\Delta F525$ normalizado en función de la presión para las muestras de Carne fresca (●), carne sumergida en la solución S1 (●) y carne sumergida en la solución S2 (●).....	224
Figura 6.24: porcentaje de decoloración en función de la presión para las muestras de Carne fresca (●), carne sumergida en la solución S1 (●) y carne sumergida en la solución S2 (●).....	224
Figura 6.25: Planilla presentada a los evaluadores para realizar el análisis sensorial de los productos.....	226
Figura 6.26: Expresión gráfica de los perfiles sensoriales de muestras de carne fresca (—), carne tratada con la solución S1(—) y tratadas con la solución S2 (—).....	228
Figura 6.27: Atributos sensoriales obtenidos para las diferentes muestras analizadas. Carne fresca (—), carne tratada con la solución S1(—) y tratadas con la solución S2 (—).....	228
Figura 7. 1: variación de la textura durante el almacenamiento refrigerado a 4°C de: Carne sumergida en la solución S1 y sometida a 400 MPa (■), sometida a 600 MPa (■) y carne sumergida en la solución S2 sometida a 400 MPa (■) y a 600 MPa (■).....	239
Figura 7.2: Exudado de las muestras sumergidas en la solución S2 y sometidas a 600 MPa y 400 MPa.....	240
Figure 7.3: Oxidación lipídica en la carne no tratada durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C	241
Figura 7.4: Efecto de APH en la oxidación lipídica en muestras cárnicas durante almacenamiento refrigerado a 4 ° C. (■) carne sumergida en solución S1 sin APH. Carne sumergida en solución S1 y tratada con 400 MPa (■)	

ÍNDICE DE CONTENIDOS

o 600 MPa (■). Barras verticales indican la desviación estándar.....	242
Figura 7.5: Efecto de APH en la oxidación de lípidos en las muestras cárnicas durante almacenamiento refrigerado a 4 ° C. (■) carne sumergida en solución S2 sin APH. Carne sumergida en solución S2 y tratada con 400 MPa (■) o 600 MPa (■). Barras verticales indican la desviación estándar.....	242
Figura 7.6: Crecimiento microbiano de bacterias mesófilos en muestras de carne sometidas a APH a 400 MPa (a) y a 600 MPa (b), durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C. (▲) carne sin APH; carne tratada con la solución S1 (●) o S2 (▲) antes del tratamiento de APH. S1 + APH (◆) y S2 + APH (◐). Barras verticales indican el error estándar o la media	246
Figura 7.7: Crecimiento microbiano de bacterias Acido laticas en muestras de carne sometidas a APH a 400 MPa (a) y a 600 MPa (b), durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C. (▲) carne sin APH; carne tratada con la solución S1 (●) o S2 (▲) antes del tratamiento de APH. S1 + APH (◆) y S2 + APH (◐). Barras verticales indican el error estándar o la media	247
Figura 7.8: Variación de la luminosidad (L*) de las muestras cárnicas en función del tiempo para las presiones: (—) 400 MPa y (—) 600 MPa, almacenadas a las temperaturas: a) 4°C y b) 10°C.....	250
Figura 7.9: Variación del parámetro a* en las muestras cárnicas en función del tiempo para las presiones: (—) 400 MPa y (—) 600 MPa, almacenadas a las temperaturas: a) 4°C y b) 10°C.....	250
Figura 7.10: Variación de la fuerza máxima en función del tiempo para las muestras sometidas a presiones de (—) 400 MPa y (—) 600 MPa, almacenadas dos temperaturas: a) 4°C y b) 10°C	251
Figura 7.11: Parámetros del modelo de Gompertz.....	253
Figura 7.12. Aplicación del modelo de Gompertz a los recuentos de <i>Listeria monocytogenes</i> en carnes almacenadas inoculada a carne en niveles de 10 ³ UFC/g y almacenadas a) 4°C y b) 10°C ● carne fresca, ◆ carne con solución,	

ÍNDICE DE CONTENIDOS

■ 400 MPa y ▲ 600 MPa	255
-----------------------------	-----

Figura 7.13 : Aplicación del modelo de Gompertz a los recuentos de *Listeria monocytogenes* en carnes almacenadas inoculada en niveles de 10^5 UFC/g y almacenadas: a) 4°C y b) 10°C. ●carne fresca, ◆carne con solución, ■400 MPa y ▲ 600 MPa.....257

RESUMEN

El presente trabajo de **Tesis** se orientó a estudiar métodos de conservación no térmicos (utilización de ozono gaseoso y altas presiones hidrostáticas) que permitieron desarrollar productos cárnicos destinados a mejorar la vida útil de los mismo manteniendo los atributos de calidad, de manera tal que puedan ser producidos y comercializados por la industria alimentaria y aceptados por el consumidor.

Para el desarrollo del producto cárneo se utilizó músculo bovino *adductor femoris* y *semimembranosus* (nalga) de los cuales se obtuvieron discos de 6 cm de diámetro y 3 mm de espesor.

En la primera etapa de las investigaciones se estudió el efecto del tratamiento de la carne bovina con ozono gaseoso sobre el desarrollo de la microflora natural y sobre un microorganismo patógeno (*Listeria monocytogenes*). Se desarrolló un sistema de ozonización mediante el diseño de cámaras de ozonización utilizando recipientes de vidrio herméticos a los cuales se les realizó una adaptación de las tapas para permitir la entrada de ozono y liberar el gas presente en los recipientes. Se implementó un sistema de cierre del pasaje de gas y se trabajó bajo campana para evitar concentraciones de ozono por arriba del límite 0.214 mg O₃/m³ permitidos en el laboratorio. Se implementó un método analítico para la cuantificación de ozono mediante un sistema donde se recogía el ozono circulante y se procedía a realizar una titulación iodométrica. Se pudo establecer que el caudal de aire que circulaba por la cámara presentaba una concentración de ozono constante de 218 mg O₃/m³.

Se modeló matemáticamente mediante un balance de materia no estacionario la evolución de la concentración de ozono dentro de la cámara de ozonización en función del tiempo. Se realizaron ensayos con ozono utilizando concentraciones entre 218-283 mgO₃/cm³, realizando refuerzos cada 30 min durante diferentes períodos de tiempo (3 y 5 h). Se logró disminuir en hasta 2 ciclos logarítmicos el recuento de heterótrofos

Resumen

(bacterias ácido lácticas, mesófilos y enterobacterias) en las muestras cárnicas tratadas con ozono. Se optimizó el tratamiento determinando el tiempo y concentración de ozono en la cámara que produjo una disminución significativa del recuento de microorganismos heterótrofos, sin afectar negativamente el color superficial y la oxidación lipídica. El tratamiento óptimo consistió en pulsos de corriente de ozono de 5 minutos con refuerzos cada 30 minutos durante un período de 5 horas, que condujeron a una concentración de 276 mgO₃/m³ dentro de la cámara.

El tratamiento optimizado permitió la reducción de más de 1 ciclo logarítmico el recuento de *L. monocytogenes* inoculada en la carne fresca en una concentración de 10³ UFC/ml. El ozono afectó el desarrollo de *L. monocytogenes* ya que durante dos semanas de almacenamiento las muestras inoculadas tratadas con ozono, envasadas al vacío y mantenidas a 4°C no presentaron modificación del número de microorganismos.

El tratamiento con ozono bajo condiciones operativas previamente optimizadas no generó cambios sensoriales en el producto al compararlo con la carne sin tratamiento a partir de ensayos realizados mediante panel sensorial (ensayo triangular).

En la segunda etapa de las investigaciones se utilizó el tratamiento de Alta Presión Hidrostática para desarrollar un producto con una mayor vida útil. El tratamiento de APH se llevó a cabo en un sistema Stansted Fluid Power (modelo FPG9400:922) del INTA, Castelar. Se utilizó una velocidad de presurización de 300 MPa/min y la despresurización se realizó instantáneamente. La temperatura de trabajo fue 20 ± 5°C.

Al aplicar APH sobre la carne fresca se encontró que se veía afectado el color superficial de la misma por lo cual se buscó la combinación de preservadores que permitiera mantener el color adecuado de la carne al aplicarle el tratamiento de APH. Se realizaron ensayos para establecer la composición y las concentraciones apropiadas de sales en la solución de inmersión para cumplir con los límites permitidos para nitrito de sodio por

Resumen

las normas vigentes. Luego se optimizó la composición de la solución considerando como función objetivo el mínimo valor de luminosidad L^* y el máximo de coloración rojo (a^*) con el fin de mantener los atributos de color. Se utilizó un diseño central compuesto, se obtuvieron las superficies de respuesta de los parámetros de color superficial en función de las concentraciones de nitrito y ácido ascórbico. La composición de la solución optimizada para las presiones ensayadas (300 y 600 MPa) fue 0.06 g NaNO_2 /100 ml, 0.85 g ác. ascórbico/ 100 ml y 6 g NaCl /100 ml.

Por otra parte, se estudió el efecto de la reducción de NaCl en la solución de inmersión utilizada como pretratamiento químico, en las características fisicoquímicas y microbiológicas del producto, debido a que la reducción del consumo de sal a través de los alimentos resulta actualmente de gran interés por ser un potencial causante de hipertensión. Las presiones utilizadas en estos ensayos fueron 400 MPa y 600 MPa, ya que según datos bibliográficos a partir de 350 MPa se afecta el desarrollo microbiano. Se encontró que variar la concentración de NaCl en la solución de inmersión afectó los valores de color sin embargo los parámetros de color fueron visualmente aceptables ($a^* > 14$). La estabilidad microbiológica también se vio afectada por la variación de la concentración de NaCl . Se encontró que al reducir la concentración de cloruro de sodio disminuyó el tiempo de vida útil (4 semanas de almacenamiento cuando se trató con 400 MPa) del alimento pero superando los valores que presentan las muestras sin ningún tratamiento. Además, se analizó el efecto de APH sobre la oxidación lipídica, encontrándose que la aplicación de presiones de 600 MPa aumentó el índice TBARS, casi duplicándolo respecto a la carne fresca, pero manteniéndose por debajo del límite de detección de rancidez para productos cárnicos (<1 mg MDA/kg).

Al aumentar la APH se evidenció en los termogramas de DSC la reducción de los picos correspondientes a las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares; por FTIR se observó un aumento en el porcentaje de estructura desordenada. El tratamiento de APH afectó los parámetros de color, presentando las muestras tratadas a mayor presión menores valores

Resumen

de a^* y mayores de L^* .

También se estudiaron los cambios en el color en relación al contenido de los pigmentos de la carne vacuna con y sin tratamiento químico (mioglobina, oximioglobina, metamioglobina y nitrosomioglobina) debido a la aplicación de diferentes presiones (100-600 MPa). Mediante reflectancia difusa se evidenció que los preservadores químicos mejoraron la estabilidad frente a las altas presiones del cromóforo (mioglobina) transformándolo en nitrosomioglobina y disminuyeron el blanqueamiento de las muestras.

En la última etapa se realizó un estudio para ver el efecto de la alta presión hidrostática sobre el desarrollo de un microorganismo patógeno durante el almacenamiento refrigerado a 4°C y 10°C. En este caso se analizó *Listeria monocytogenes* ya que es un microorganismo ubicuo que sobrevive en los alimentos refrigerados y es una de las principales causas de enfermedades de transmisión alimentaria. Luego del tratamiento con preservadores químicos se inocularon las muestras en dos concentraciones: 10^3 y 10^5 UFC/ml. Las muestras se envasaron individualmente al vacío y se les aplicó el tratamiento de APH empleando presiones de 400 MPa y 600 MPa. La utilización de APH como procedimiento de control del desarrollo de *Listeria monocytogenes* en un producto cárnico fue efectivo para disminuir los recuentos iniciales después del tratamiento, siendo más eficiente el tratamiento a 600 MPa que a 400 MPa. Utilizando la ecuación de Gompertz se pudo predecir la velocidad de crecimiento de los *L. monocytogenes* en función de las condiciones ensayadas tales como la solución de inmersión, el nivel de presión utilizado y la temperatura de almacenamiento refrigerado.

Estos resultados encontrados permiten concluir que la aplicación de tratamientos no térmicos (ozono gaseoso y alta presión hidrostática) es eficiente en la conservación de productos cárnicos.

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN GENERAL

Capítulo 1: Introducción

1.1 Tratamientos de conservación

Hoy en día, se está concientizando cada vez más acerca de la estrecha relación entre la alimentación y la salud, se buscan alimentos mínimamente procesados, apetecibles, listos para el consumo, de fácil y rápida preparación, con propiedades funcionales y larga vida útil. Esta demanda ha conducido a la búsqueda y desarrollo de métodos alternativos de conservación y procesado que permitan mantener las características nutricionales y organolépticas de los alimentos asegurando al mismo tiempo su calidad higiénico-sanitaria, al inhibir el crecimiento de microorganismos alteradores y de patógenos responsables de enfermedades transmitidas por alimentos.

La conservación de alimentos es un problema de gran importancia debido al desarrollo de microorganismos y elementos que alteran los alimentos o los hacen inseguros. Los microorganismos y las enzimas son los principales agentes responsables del deterioro y deben ser los objetivos de las técnicas de conservación. Por ello, los procesos que lleven a la conservación de alimentos son importantes, incluso económicamente, tanto para los productores, distribuidores como para los consumidores.

Los métodos tradicionales (pasteurización, esterilización, congelación) son los más comunes para la conservación de los productos y se basan en las variaciones de temperatura, tanto la aplicación de calor como la congelación. Mediante gradientes de temperatura se consigue tanto la inactivación de los microorganismos como de las enzimas alterantes, pero pueden ocurrir procesos no deseados como son la desnaturalización de las proteínas, cambios de texturas, sabores y pardeamiento no enzimático entre otros.

Sin embargo, existen también tecnologías no térmicas de conservación entre las que se destaca la irradiación, los pulsos eléctricos, los ultrasonidos, el envasado en atmósferas modificadas, la adición de bioconservantes, la

Capítulo 1: Introducción

aplicación de ozono y las altas presiones hidrostáticas (APH), que constituyen un avance en la industria alimentaria, al obtenerse productos mínimamente procesados y seguros que conservan las características funcionales, nutricionales y sensoriales de los alimentos frescos, con mayor vida útil y mayores garantías de seguridad del alimento.

La vida útil es el periodo de tiempo en que un producto permanece inalterado desde un punto de vista nutricional, organoléptico y sanitario. Para el Código Alimentario Argentino un alimento alterado es “aquel alimento que, por causas naturales de índole física, química y/o biológica o derivadas de tratamientos tecnológicos inadecuados y/o deficientes, aisladas o combinadas, ha sufrido deterioro en sus características organolépticas, en su composición intrínseca y/o en su valor nutritivo.” (Res 205, 7.03.88).

La carne debido a sus especiales características, como alto contenido en nutrientes, valores de pH entre 5.6 y 6.0, y actividad de agua superior a 0.98, constituye un excelente medio de cultivo en el que prácticamente todos los microorganismos son capaces de crecer, siendo por lo tanto un alimento altamente perecedero, que puede vehicular microorganismos alterantes y patógenos.

1.2 Consideraciones generales de consumo de carne

A través de la historia, el consumo de carnes como alimento ha mantenido una posición prestigiosa, tanto social como económica. En la medida en que las naciones se industrializan y mejoran sus economías, el consumo de carnes aumenta. La carne es uno de los alimentos más nutritivos para consumo humano debido a su aporte en proteínas de alto valor biológico, grasas, vitaminas y minerales. Provee calorías procedentes fundamentalmente de su contenido de lípidos, pero su contribución vital a la dieta son las proteínas, vitaminas del complejo B, ciertos minerales como

Capítulo 1: Introducción

hierro, zinc y fósforo y ácidos grasos esenciales (Hedrick *et al.*, 1994; Pearson y Dutson, 1994; Pearson y Tauber, 1984). También aporta colesterol que se ha asociado con problemas cardiovasculares en el humano.

Argentina es uno de los países exportadores de carne por excelencia, teniendo en el período 1990-2018 exportaciones superiores a 100.000 toneladas/año (**Figura 1.1**). Además, tradicionalmente el consumo de carne por habitante es elevado, manteniéndose durante el mismo periodo por encima de los 50 kg/año (**Figura 1.2**); esto hace que también los productos cárnicos sean de importancia en el mercado interno del país.

Figura 1.1: Exportaciones Argentinas de carne vacuna

En vista del papel clave de la carne y de otros productos de esta procedencia en la dieta de la mayoría de la población y de su importancia en el aporte de proteínas de alta calidad, minerales y vitaminas, la demanda de carne es alta.

Capítulo 1: Introducción

Figura 1.2: Consumo de carne vacuna promedio anual.

En nuestro país existen reglamentaciones y regulaciones municipales, provinciales y nacionales sobre la faena de animales para carne y la elaboración de productos y subproductos; generalmente las reglamentaciones municipales y provinciales se basan en las nacionales, pero con exigencias menores. En 1968 el SENASA, en ese entonces “Servicio Nacional de Sanidad Animal” dependiente de la Secretaría de Agricultura y Ganadería de la Nación (hoy en día Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, dependiente de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación), publicó el “Reglamento de Inspección de productos, subproductos y derivados de origen animal (Decreto N° 4238/68) que es el primer compendio de todas las regulaciones sobre los productos de origen animal y define las condiciones de faena, producción y almacenamiento de la

Capítulo 1: Introducción

carne de animales de distintas especies y de los productos derivados. Este Reglamento, con numerosas modificaciones y ampliaciones, rige hasta nuestros días, y dedica el Capítulo XV a los productos cárnicos en el que se incluyen los requisitos de construcción del establecimiento, los requisitos higiénicos-sanitarios, y un detalle de los productos comprendidos en las salazones, coincidentes con los detallados en el Código Alimentario Argentino, que las incluye en su Capítulo VI (Alimentos cárneos y afines).

Un producto cárnico debe conjugar la capacidad de retener un alto valor nutritivo, flavor, color, aroma, un determinado contenido de grasa intramuscular, etc. Estos son factores que afectan el valor potencial de la carne para su ulterior procesado y también su aceptabilidad por parte del consumidor.

Uno de los objetivos principales del tratamiento de alimentos destinados al consumo es mejorar su calidad, conseguir una mayor vida útil, además de lograr una atractiva presentación para el consumidor.

1.3 Carne bovina

Son numerosos los tejidos animales que se han utilizado y se utilizan como alimento. La composición de la carne varía, principalmente, en cuanto a su contenido lipídico. Contiene agua en un 75% y las proteínas representan entre un 18-23 % de la porción magra de la carne. La importancia nutritiva del músculo no deriva sólo de su contenido de proteínas muy elevado, sino también de la calidad de éstas que es muy alta, pues contiene todos los aminoácidos en proporciones muy similares a las requeridas para el mantenimiento y desarrollo de los tejidos humanos. Además, el tejido muscular es una fuente excelente de algunas vitaminas del complejo B, especialmente de tiamina, rivo flavina, niacina, B6 y B12 y es una buena fuente de hierro y fósforo (Cheftel, 1993).

Capítulo 1: Introducción

1.3.1 Estructura del músculo esquelético

Los músculos son tejidos u órganos del cuerpo animal caracterizado por su capacidad para contraerse, por lo general en respuesta a un estímulo nervioso. La unidad básica de todo músculo es la miofibrilla, estructura filiforme muy pequeña formada por proteínas complejas. Cada célula muscular o fibra contiene varias miofibrillas, compuestas de miofilamentos de dos tipos, gruesos y delgados, que adoptan una disposición regular. Cada miofilamento grueso contiene varios cientos de moléculas de la proteína miosina. Los filamentos delgados contienen dos cadenas de la proteína actina. Las miofibrillas están formadas de hileras que alternan miofilamentos gruesos y delgados con sus extremos solapados. Durante las contracciones musculares, estas hileras de filamentos interdigitadas se deslizan una sobre otra por medio de puentes cruzados que actúan como ruedas. La energía que requiere este movimiento procede de mitocondrias densas que rodean las miofibrillas. Existen tres tipos de tejido muscular: liso, esquelético y cardíaco.

El tejido muscular esquelético presenta una arquitectura particular que se encuentra representada en la **Figura 1.3**. El músculo está recubierto por tejido conectivo (epimisio) y está formado por fascículos. Los fascículos a su vez están recubiertos por otra membrana de tejido conectivo llamada perimisio y están formados por fibras (unidad estructural y funcional mínima) muy largas, estrechas, multinucleadas, de un diámetro que varía entre 10 y 100 μm (**Figura 1.4**). Los músculos están unidos al esqueleto por medio de los tendones, los cuales están unidos al epimisio.

Capítulo 1: Introducción

Figura 1.3: Esquema del músculo esquelético.

Figura 1.4: Estructura de una fibra muscular.

Capítulo 1: Introducción

Los vasos sanguíneos y los nervios atraviesan las vainas de tejido conectivo y penetran en el interior del músculo, estando cada fibra muscular rodeada de una rica red capilar.

Los principales componentes de la fibra muscular son el sarcolema (superficie de la fibra muscular), las fibrillas contráctiles denominadas miofibrillas, el líquido celular (sarcoplasma) y los orgánulos. Las fibrillas son estructuras contráctiles que atraviesan la fibra muscular y son las responsables de la contracción y de elasticidad, lo que permite realizar los movimientos característicos del músculo. La contracción de una fibra muscular requiere de la contracción simultánea de todas sus miofibrillas. Esto se logra gracias a una red túbulo-membranosa denominada sistema de túbulos T que extienden el sarcolema en el interior de la célula muscular, y esto permite la transmisión rápida del potencial de acción desde la membrana celular a todas las miofibrillas contenidas en la fibra muscular. La contracción de una fibra muscular requiere de la contracción simultánea de todas sus miofibrillas.

El sarcoplasma (citoplasma) representa la parte líquida de las fibras musculares, llenando el espacio entre las miofibrillas. Las mitocondrias sirven como un primer transductor de energía para la célula muscular, y están localizadas a través de la célula.

Las miofibrillas están compuestas de un importante número de proteínas estructurales, miofibrilares, dispuestas en filamentos finos y gruesos (**Figura 1.5**) que son los responsables de la contracción muscular desplazándose unos sobre otros. Además, está compuesto por otras proteínas sarcoplasmáticas o globulares, principalmente mioglobina y enzimas.

Capítulo 1: Introducción

Figura 1.5: Estructura microscópica de la miofibrilla.

La miofibrilla se compone de diferentes regiones o bandas que pueden observarse al microscopio:

Bandas I: corresponde a los denominados filamentos finos, compuestos principalmente por actina, troponina y tropomiosina. Dentro de la banda I se observa una línea más oscura o Z, sector donde se encuentran unidas las actinas adyacentes y se mantiene la continuidad con el sarcómero subsiguiente. En ellas se encuentra la proteína α -actinina unida a actina-F que proporciona estructura. El espacio entre dos líneas Z se denomina sarcómero y constituye la unidad funcional del tejido muscular.

Bandas A: corresponden a la zona de superposición de los denominados filamentos gruesos y finos y contiene una zona más clara, zona H, correspondiente al área sin superposición. En la región media de la zona H se

Capítulo 1: Introducción

encuentra la línea M, que corresponde a la unión de dos miosinas adyacentes. Los filamentos gruesos están compuestos principalmente de miosina.

Los componentes del filamento fino son:

Actina: Puede existir en dos formas G-actina, que consiste en unidades globulares y F-actina constituida por las citadas unidades globulares agregadas una a continuación de la otra, como cadenas de perlas, formando una doble cadena. Las moléculas de G-actina polimerizan para formar F-actina en presencia de sales y pequeñas cantidades de ATP.

Tropomiosina: dos polipéptidos α -helicoidales (α - y β - tropomiosina) superenrollados que se unen entre sí por sus extremos para formar filamentos largos que se localizan a lo largo del surco existente en la doble hélice de actina.

Troponina: Es un complejo de tres subunidades: TnT, que se une a la tropomiosina; TnC, que tiene afinidad por el ión calcio, y TnI, que cubre el punto activo de la actina, inhibidor de la actividad ATPásica (este punto es el que interactúa con la miosina).

Figura 1.6: Estructura filamento fino

El filamento grueso está compuesto por:

Miosina: está formada por 6 cadenas 3 polipeptídicas, 2 pesadas, con regiones “cabeza” y “cola”, y 4 livianas: 2 DTNB (regulatoria) y 2 Alcalinas.

Capítulo 1: Introducción

Su estructura cuaternaria es el producto del ensamble de las 6 cadenas, teniendo forma de bastón. Presenta una región cola correspondiente a las 2 cadenas pesadas α -hélice enrolladas juntas en un enrollamiento supersecundario α -hélice, y una región cabeza, principalmente α -hélice, que posee puntos específicos para su combinación con actina, el sitio de la actividad ATPásica y el sitio para las cadenas livianas, alcalina y DTNB. La molécula de miosina es flexible, por lo que ambas subunidades pueden moverse una en relación con la otra (Xiong, 1997).

Durante la instauración del rigor mortis la F-actina se combina con la miosina para formar cadenas rígidas de actomiosina (inextensible).

1.3.2 Cambios en el músculo *post-mortem*

La calidad final del producto depende de las principales modificaciones metabólicas que experimentan los músculos del animal en los momentos inmediatos al sacrificio y de los consecuentes cambios físicos y químicos que acompañan al rigor mortis. El lapso entre la muerte y la rigidez depende de las actividades relativas de las enzimas involucradas en la síntesis y consumo de energía.

Normalmente, la contracción de los músculos ocurre a través de una compleja serie de reacciones bioquímicas. Existe una demora en la instauración del rigor mortis que es única en cada especie (8-12 horas en carne vacuna, 2-6 horas en carne porcina, 6-10 horas en cordero y 1-2 horas en pollo) (Olson, 1987). En general, mientras más grande es el animal, más larga es la instauración del rigor mortis. La edad del animal, su estado de nutrición, sus constituciones genéticas determinan la repuesta a estos cambios.

Las condiciones de sacrificio deben ser óptimas, entendiéndose por estas que el animal no debe sacrificarse en un estado de inanición o de excitación porque esto provoca la disminución del pH y modifica las propiedades fisicoquímicas de los tejidos.

Capítulo 1: Introducción

Este descenso del pH (7.0 músculo vivo a 5.3-5.6 post mortem) se debe sobre todo a la hidrólisis del ATP, así como también a la acumulación de ácido láctico en el músculo, el cual, en el animal vivo, normalmente sería enviado al hígado por medio del flujo sanguíneo. La velocidad del cambio de pH es importante, pues si el pH desciende suficientemente rápido mientras la temperatura de la res es todavía alta, por ejemplo, pH 6.0 y 35 °C, se produce una considerable desnaturalización de las proteínas contráctiles y sarcoplasmáticas. Este fenómeno, disminuye la capacidad de éstas de fijar agua (Foegeding, 2000).

En los casos en que el pH del músculo disminuye más rápidamente que lo normal, el músculo seguramente resultará ser pálido, suave y exudativo (PSE). Es importante también el pH que alcanza el tejido muscular. El pH final bajo proporciona resistencia al desarrollo microbiano y color normal. Ocurre a veces un pH último elevado, que puede ser producido por algún estrés ante mortem, casi siempre de naturaleza prolongada, que agota las reservas de glucógeno y limita la glucólisis post mortem. Esta es una situación común en el vacuno, que genera que la carne sea oscura, firme y seca (DFD). Los músculos de corte oscuro exhiben excelentes propiedades de retención de agua, pero tienen una pobre resistencia al desarrollo de los microorganismos. Como el pH alcanzado durante el rigor coincide con el punto isoeléctrico de muchas proteínas musculares, incluidas las miofibrilares, la capacidad de retención del agua del músculo es menor en estado post mortem que in vivo, incluso aunque las proteínas no se desnaturalicen.

Los cambios físicos-químicos y microbiológicos citados anteriormente se traducen en cambios de coloración, terneza y textura, que influyen directamente en las propiedades organolépticas del alimento que se perciben a través de los sentidos: olor, color, sabor. Un producto cárnico debe conjugar la capacidad de retener un alto valor nutritivo, flavor, color, aroma, un determinado contenido de grasa intramuscular, etc. Estos son factores que afectan el valor potencial de la carne para su ulterior procesado y también su aceptabilidad por parte del consumidor.

Capítulo 1: Introducción

1.4 Pigmentación

La propiedad óptica más importante de los alimentos es el color. La transparencia y la opacidad, relacionadas con la cantidad de luz que el material deja pasar a su través o que se refleja en él, y la turbiedad, relacionada con el fenómeno de difusión en el material, se aprecian junto con el color. Estas propiedades otorgan el aspecto visual de los alimentos. Dicho aspecto y, en especial el color, es el atributo que se tiene en cuenta a la hora de adquirir o ingerir un alimento. La reacción que una persona tiene frente a un determinado alimento está condicionada por la sensación que experimenta al percibir el color del mismo. De esta forma, puede rechazarlo sin considerar otras posibles características, o aceptarlo, pasando a considerar la bondad de otras. De ahí la importancia del color, pues influye en la aceptación del consumidor, permitiéndole además diferenciar entre distintos productos que se le presenten. Así, frente a la textura y al sabor, tiene la particularidad de ser apreciado siempre en primer lugar. De esta forma, pesa más que el flavor en la impresión que causan sobre el consumidor y tiene, además, una poderosa influencia en la estimación de la consistencia y la calidad del alimento.

El color de la carne fresca o salada es el factor individual que más afecta el aspecto del producto y que más influye en la referencia del consumidor.

El color de la carne depende de la cantidad y estado químico de los pigmentos hemoglobina, mioglobina y citocromos. La hemoglobina representa entre un 5 a un 12 % de los pigmentos hemínicos totales en condiciones correctas de sangrado animal (Renerre, 1981) y posee propiedades espectrales muy similares a las de la mioglobina, (MacDougall, 1982). Los citocromos son hemoproteínas con función en la cadena transportadora de electrones en la respiración celular, su concentración es tan pequeña que no contribuyen al color del músculo (Ledward, 1985). Por lo que podemos decir que el color de la carne está determinado únicamente por el contenido de mioglobina (Mb) y sus derivados.

Capítulo 1: Introducción

1.4.1 La mioglobina y sus estados químicos

La forma que adquiera la mioglobina es de fundamental importancia en la determinación del color del producto. Por lo general se ha observado que altos niveles de actividad muscular llevan a mayores concentraciones de mioglobina reflejando diferencias debidas a la especie, sexo, crianza, edad, tipo de músculo y actividad; la dieta también es un factor de importancia (Lawrie, 1974).

Hunt y Hedrick (1977) informaron que el contenido de mioglobina en el músculo bovino se encuentra en un rango entre 2.0 – 5.0 mg/g en base húmeda. Las diferencias observadas en el color de la superficie de la carne se deben al estado químico de la molécula de mioglobina:

Esquema 1.7: Estados químicos de la mioglobina

La mioglobina (**Figura 1.8**) es una proteína globular que contiene una sola cadena polipeptídica llamada globina, constituida por ocho segmentos de

Capítulo 1: Introducción

α -hélice, y un grupo prostético (complejo hierro–porfirina), denominado grupo hemo o hematina (Livingston y Brown, 1981), que permite la oxigenación y desoxigenación de forma reversible. El grupo hemo es un sistema de anillos tetrapirrólico que se denomina protoporfirina IX que contiene hierro (II), este grupo está unido de forma no covalente en una hendidura hidrofóbica de la molécula de mioglobina. El Fe^{+2} presenta una coordinación octaédrica, cuatro ligandos corresponden al sistema tetrapirrólico, otro lo realiza con un residuo de histidina (His F8) y el octavo ligando lo realiza con el oxígeno cuando la mioglobina está oxigenada, a su vez el oxígeno se coordina con otra histidina (His E7). La función fisiológica de la mioglobina en el músculo es de almacenamiento y entrega del oxígeno necesario para el funcionamiento del mismo.

En la **Figura 1.8** se puede observar la estructura de la mioglobina donde se aprecia el grupo hemo (en rojo) y los ocho segmentos en α -hélice. (Vígara *et al.*, 2007.)

Figura 1.8. Estructura de la Mioglobina donde se aprecia el grupo hemo (en rojo) y los ocho segmentos en α -hélice.

- Oximioglobina

Capítulo 1: Introducción

El complejo formado por la mioglobina con el oxígeno, oximioglobina (MbO_2) de color rojo brillante, es de gran importancia para el color de la carne ya que es el responsable de la coloración preferida por el consumidor.

El hierro esta como Fe^{+2} en la molécula de mioglobina (Mb) y su configuración es paramagnética, al igual que la del oxígeno, que posee dos electrones desapareados que se unen al hierro para formar un complejo diamagnético.

Uno de los factores responsables de la unión del oxígeno con el átomo de hierro de la mioglobina para formar oximioglobina, es el tamaño del mismo, porque pueden presentarse impedimentos de tipo estérico considerables por parte de la estructura proteica. Sólo ligandos de pequeño tamaño como O_2 , NO , CO pueden coordinarse con el oxígeno de la mioglobina. Cuando la proteína (Mb) se desnaturaliza, el grupo hemo que la compone está más expuesto y se facilita la coordinación de ligandos de mayor tamaño (Livingston y Brown, 1981)

En la carne recientemente seccionada la mioglobina se encuentra en estado reducido presentando un color púrpura, el hierro se encuentra como Fe^{+2} y falta el ligando en la sexta posición de coordinación. Este compuesto (Mb) es estable a bajas presiones parciales de oxígeno presentes en el interior del músculo donde las presiones de oxígeno intracelular pueden alcanzar valores inferiores a 0.1 mm de Hg (Livingston y Brown, 1981)

En la oximioglobina el hierro esta en forma ferrosa y constituye el Fe^{+2} de Mb y O_2 un compuesto diamagnético, el que es estable a altas concentraciones de oxígeno que la protegen contra la oxidación. Si la presión parcial de O_2 llega a niveles bastante bajos puede producirse la desoxidación parcial de la MbO_2 comprometiendo la estabilidad de la mezcla Mb- MbO_2 .

- Metamioglobina

La formación de metamioglobina (MetMb) a partir de MbO_2 se conoce

Capítulo 1: Introducción

como autooxidación. La MetMb actúa como catalizador en reacciones donde intervengan radicales libres como la rancidez oxidativa (Livingston y Brown, 1981).

La MetMb, de color marrón, es el pigmento responsable de la aparición de colores indeseables en la superficie cárnica que motiva rechazo por parte del consumidor.

La velocidad de autooxidación se ve muy afectada por el pH y por la temperatura, a presiones de saturación. Bajos valores de pH aumentan la velocidad de autooxidación, ya que la oxidación de Mb es 2.5 veces más rápida a pH= 6 que a pH =6.5 (Brown y Mebine, 1969). Snyder y Skrdlant (1966) comunicaron que la presencia de iones metálicos como Cu^{+2} o Fe^{+3} aceleraban esta reacción.

1.5 Microbiología de la carne

La carne roja de vacunos, búfalos, cerdos, ovejas, cabras, llamas y otras especies, es un medio para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos. Como se mencionó anteriormente es debido a su alto contenido en nutrientes, valores de pH y actividad de agua superior a 0.98, lo cual constituye un excelente medio de cultivo para el crecimiento microbiano.

Numerosas bacterias, además de mohos y levaduras, están presentes en el cuero, los pelos y las pezuñas de los vacunos, y son transmitidos a la carcasa luego del sacrificio. Los restos de estiércol en el pelambre suelen acceder al músculo, así como el contenido intestinal si la evisceración no se hace cuidadosamente. Por otra parte, las bacterias también pueden proceder de los pisos, paredes, mesadas, cuchillos y manos de los operadores en la planta de faena (ICMSF, 1998). Las bacterias psicrótroficas de la superficie de las carnes no provienen del intestino e incluyen especies de *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Brochothrix thermosphacta*, y algunas *Enterobacteriaceae* y *Lactobacillaceae* (Mossel et al. 2003). En la superficie de

Capítulo 1: Introducción

la carne bovina suelen encontrarse varios tipos de *Escherichia coli*, algunas especies de *Enterobacter* y *Serratia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, bacterias lácticas, mohos y levaduras.

El cuidado esmerado de la higiene durante la faena puede reducir de modo importante la carga microbiana de las carnes, pero no puede prevenir la contaminación.

Las carnes son fácilmente alterables, sobre todo si están procesadas, ya que tienen un pH entre 5.1 y 5.6, 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.

1.5.1 *Listeria monocytogenes*

Entre los microorganismos patógenos en carnes *Listeria monocytogenes* constituye un serio problema de salud pública. Es un microorganismo ubicuo, bacilos cortos o cocobacilos, a veces algo curvados, gram positivos (aunque los cultivos viejos se tiñen mal), no esporulados, no encapsulados, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos, móviles a 22-28 °C pero inmóviles a 37 °C. Son parcialmente hemolíticos, fermentan la glucosa. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 37°C, se lo considera un patógeno psicrótrofo, capaz de desarrollar a temperaturas de refrigeración (0-8°C). Pueden crecer a 4°C en pocos días a diferencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*, que son inhibidas en su crecimiento a bajas temperaturas y además es capaz de desarrollarse a pH de 4.4 a 9.6 (Gilmour *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 1998). Asimismo, crece en concentraciones altas de NaCl 10% y sobrevive a concentraciones entre 16 y 20%. (Schöbitz *et al.*, 2009, Marzocca *et al.*, 2004).

El patógeno a pesar de no formar endosporas es capaz de sobrevivir por largos períodos de tiempo en el medio ambiente, en las plantas procesadoras

Capítulo 1: Introducción

de alimentos y en el interior de los refrigeradores. A pesar de encontrarse con frecuencia en alimentos crudos, los casos de listeriosis generalmente se relacionan con aquellos productos listos para el consumo, los cuales se conservan refrigerados por un periodo prolongado de tiempo o con los alimentos contaminados después del procesamiento térmico (FAO, 2000).

La listeriosis, cuyo agente etiológico es *Listeria monocytogenes*, en una de las principales enfermedades de transmisión alimentaria y de mayor relevancia en la salud pública, debido al impacto social y económico que tiene por la gravedad de su cuadro clínico. La dosis infectiva en alimentos es de 10^3 - 10^5 UFC/g, y son especialmente susceptibles los bebés, individuos inmunocomprometidos, ancianos y mujeres embarazadas.

1.5.2 Modelado Matemático del desarrollo microbiano

La microbiología predictiva se basa en el desarrollo de modelos matemáticos que permiten predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos bajo determinadas condiciones ambientales (Chang Fomaris, 1998). Algunos de los factores principales que afectan el crecimiento microbiano en los alimentos son la temperatura y el pH, por lo cual deben tenerse en cuenta para lograr una determinada predicción.

La aplicación de modelos matemáticos se realiza en dos etapas principales:

- 1) Modelado de la curva de crecimiento del microorganismo
- 2) Descripción de la variación de los distintos parámetros que afectan a dicha curva.

Estas curvas se ajustan y sus parámetros se derivan usando programas computacionales (Buchanan, 1992)

Capítulo 1: Introducción

El empleo de modelos matemáticos permite así, cuantificar y predecir el desarrollo microbiano con el objeto de asegurar la calidad de un alimento.

Clasificación:

Se pueden clasificar en tres niveles:

1) **Modelos de nivel primario:** en estos se describen cambios en el número de microorganismos en función del tiempo. Los modelos se pueden cuantificar por ejemplo en UFC/ml, formación de toxinas, productos metabólicos, absorbancia o impedancia. Ejemplos de estos modelos son la ecuación de Gompertz, la ecuación exponencial y el modelo logístico. El de Gompertz es uno de los modelos más utilizados para describir el desarrollo microbiano (Gibson *et al.*, 1988; Zwietering, 1990) determinando la respuesta de los microorganismos bajo diversas combinaciones de factores (Buchanan, 1992).

2) **Modelos de nivel secundario:** describen las respuestas de los parámetros del modelo primario al cambiar determinadas condiciones de desarrollo tales como temperatura, pH ó aw. Ejemplo: ecuación de Arrhenius, modelo de la raíz cuadrada.

3) **Modelos de nivel terciario:** corresponden a software que transforman a los modelos de nivel primario y secundario en programas más confiables. Estos permiten calcular la respuesta de los microorganismos en las distintas condiciones, comparar los efectos de dichas condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos.

Estos modelos pueden ser caracterizados como puramente descriptivos (empíricos) o basarse en criterios microbiológicos (cinéticos). También pueden ser lineales, no lineales, segregados (población de células heterogéneas) o no segregados, estructurados (multicomponentes) o no estructurados (Whiting, 1995).

Capítulo 1: Introducción

1.6 Métodos no térmicos de preservación de alimentos

En los procesos no-térmicos, la temperatura del alimento se mantiene por debajo de la temperatura normalmente utilizada en tratamientos térmicos, por lo que es esperable una mínima degradación de su calidad. El desafío de estas tecnologías es que además de mejorar la calidad de los alimentos deben igualar o mejorar los niveles de seguridad de otros tratamientos convencionales a los que quieran sustituir.

En algunas de estas tecnologías emergentes de conservación para que el tratamiento sea exitoso es probable que se deban realizar aplicaciones sucesivas o simultáneas de varios tratamientos individuales. La utilización de tratamientos combinados tiene múltiples ventajas, ya que muchos tratamientos utilizados individualmente no son adecuados para garantizar la estabilidad y seguridad del alimento (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003). La resistencia de ciertas enzimas y microorganismos a procesos de conservación no térmicos, como las esporas bacterianas, limita la aplicación de las nuevas tecnologías de conservación. Para incrementar el uso de este tipo de procesos en la industria alimentaria, se utilizan combinaciones de técnicas tradicionales con tecnologías emergentes (no térmicas) de preservación de alimentos. De esta manera se obtiene la protección deseada del alimento y del consumidor contra microorganismos patógenos o alterantes.

1.6.1 Proceso de Ozonización

Dentro de las tecnologías no térmicas que se aplican para mantener la seguridad y calidad de un producto, se encuentra el tratamiento con ozono gaseoso. Actualmente se lo prefiere como alternativa de preservación debido principalmente a su baja toxicidad, a sus propiedades como desinfectante y desodorizante y a la escasez de residuos al finalizar el proceso, además tiene actividad antimicrobiana más fuerte que el cloro y es considerado como un agente antimicrobiano de amplio espectro que actúa contra una variedad de patógenos transmitidos por los alimentos.

Capítulo 1: Introducción

El ozono es un potente oxidante y agente de desinfección. El tratamiento de ozonización se ha utilizado desde hace tiempo en algunos países europeos, sin embargo, es una tecnología de reciente utilización en otros países desarrollados como Estados Unidos. Se ha probado el efecto bactericida del ozono sobre una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias Gram positivas y Gram Negativas, así como sus esporas y células vegetativas. En 1997 la U.S. Food and Drug Administration (FDA) reconoció al ozono como GRAS (Generally Recognized As Safe) para su utilización en contacto con alimentos, y en 2001 dio su fallo definitivo, aprobando la normativa del uso de ozono como aditivo de alimentos, durante su procesamiento o almacenamiento (Kim *et al.*, 1999). El ozono, como un potencial oxidante, tiene múltiples aplicaciones en la industria alimentaria incluyendo tratamiento de aguas y desinfección de equipos (Guzel-Seydim *et al.*, 2004), así como para la preservación de alimentos perecederos como frutas, verduras y carne (Guzel-Seydim *et al.*, 2004; Karaca y Velioglu, 2007). Este compuesto puede ser aplicado a productos cárnicos (Lyu, *et al.*, 2016; Kim y Yusef, 2000).

Figura 1.9: Áreas de aplicación del ozono en la elaboración de alimentos.

1.6.1.1 Características del ozono

El ozono, O_3 , es una variedad alotrópica del oxígeno. Su configuración espacial (**Figura 1.10**) se caracteriza por una longitud de enlace (ρ) y un ángulo de enlace (α) determinados (Durrant y Durra, 1970).

Figura 1.10: Configuración espacial de la molécula de ozono ($\rho = 0.126 \pm 0.002$ nm, $\alpha = 127 \pm 3^\circ$).

Capítulo 1: Introducción

El ozono es un gas de elevado poder oxidante que se obtiene a partir de oxígeno mediante la siguiente reacción química:

Se trata de una reacción altamente endotérmica ($\Delta H = +284.5 \text{ kJ/mol}$) no espontánea ($\Delta G^\circ = +161.3 \text{ kJ/mol} > 0$) (Rodríguez, 2003).

La toxicidad del ozono se debe principalmente al elevado carácter oxidante de esta molécula. Existen un gran número de sistemas biológicos que pueden verse afectados por las interacciones del ozono con componentes celulares, siendo el efecto de su inhalación y absorción en los pulmones el que supone mayores efectos tóxicos (Mehlman y Borek, 1987).

En una molécula de ozono, tres átomos de oxígeno están unidos covalentemente entre sí en una disposición plana doblada. El oxígeno central es sp^2 hibridado a partir de los orbitales atómicos $2s$ y dos orbitales $2p$. La alta reactividad del ozono puede ser atribuida a su carácter electrofílico (Beltrán, 2004; Seydim *et al.*, 2004; Von Gunten, 2003). Fue en 1840 que Schonbein llamó a la sustancia ozono, basada en la palabra griega ozein para "oler" (Rice y Bollyky, 1981; Kogelschatz, 1988). El ozono es un gas de color azul a temperatura ambiente cuando se genera a partir de aire seco pero es incoloro cuando se genera a partir de oxígeno muy puro.

El ozono es más denso (2.14 g/l) que el aire (1.28 g/l) a 0°C . Es inestable, reacciona con la mayoría de las superficies, por lo tanto, no puede almacenarse (Kogelschatz, 1988; Wickramanayake, 1991; Cullen *et al.*, 2010). En general, el ozono es un gas no tóxico, pero la exposición a una alta concentración (0.1 e 1.0 ppm) puede provocar síntomas como dolores de cabeza, hemorragias nasales, irritación ocular, sequedad de garganta e irritación respiratoria (Pascual *et al.*, 2007). Sin embargo, los ingenieros de procesos alimentarios con experiencia en ozono están bastante familiarizados con sus propiedades y rutinariamente proporcionan diseños de sistemas que

Capítulo 1: Introducción

evitan la exposición de los trabajadores (Rice, 2012).

Es parcialmente soluble en agua y la solubilidad varía con la temperatura. La solubilidad del ozono en el agua disminuye con el aumento de temperatura. A 0°C, la solubilidad es 0.640 L de ozono/L de agua, mientras que a 60°C es insoluble en agua. La solubilidad es 13 veces mayor que la del oxígeno entre 0-30°C y es progresivamente más soluble en agua más fría. El ozono tiene un olor picante característico y propiedades oxidantes y es el desinfectante más adecuado para contacto con alimentos (Muthukumarappan *et al.*, 2000).

1.6.1.2 Generación de ozono

Existen varios métodos de generación de ozono: la electrólisis del agua, el método térmico, la generación fotoquímica, la generación radioquímica y el método de descarga eléctrica de alto voltaje denominado “Efecto corona” (Horváth *et al.*, 1985; Gottschalk *et al.*, 2000; Rodríguez, 2003). Este último es el que se utiliza más habitualmente en la producción de ozono. Consiste en aplicar un alto voltaje (del orden de kV) entre dos electrodos por los que se hace pasar oxígeno (o aire). Se produce una descarga eléctrica que rompe moléculas de oxígeno formando oxígeno monoatómico. Posteriormente, éste se recombina con el oxígeno molecular para formar la molécula de ozono.

Figura 1.11: Esquema de Efecto corona

Las variables más importantes del proceso son las siguientes: tipo de gas aplicado, caudal de gas, temperatura, humedad e intensidad de la descarga eléctrica.

La mezcla de ozono/gas generada a partir del ozonizador normalmente contiene 1-3% de ozono cuando se usa aire seco, y 3-6% de ozono cuando se utiliza oxígeno muy puro como gas de alimentación (Muthukumarappan *et al.*, 2000; Cullen *et al.*, 2010).

Los principales parámetros a controlar en el proceso de generación de ozono serán:

- ♦ Característica de la corriente eléctrica: El rendimiento de la producción de ozono crece con la intensidad de corriente, así como con la frecuencia.

- ♦ Temperatura: La refrigeración de los electrodos reduce los fenómenos de descomposición térmica del ozono. Para esto se implementan intercambiadores de calor que pueden operar a base de agua o de aire. El intercambiador de calor que trabaja con agua, por lo general, se utiliza para aplicaciones industriales de gran escala.

Capítulo 1: Introducción

♦ Gas de partida: Para la generación de ozono, como ya se mencionó, puede utilizarse aire u oxígeno de alta pureza como gases de alimentación, dependiendo esta elección de las exigencias de la aplicación. Si se utiliza aire es de especial importancia controlar el porcentaje de humedad que presenta, ya que el vapor de agua puede reaccionar con los óxidos de nitrógeno que se forman en el espacio de descarga de la celda y formar a su vez ácido nítrico, compuesto químico capaz de causar daños en los electrodos de la celda. El contenido de humedad del aire puede expresarse mediante el valor de su temperatura de rocío, los generadores de ozono trabajan con aire cuya temperatura de rocío esté entre los -60°C y 80°C . Otro aspecto importante en la preparación del aire es la instalación de filtros que impidan el paso de partículas de polvo al interior de la celda. Cuando el gas de alimentación es oxígeno de alta pureza se evita el problema de la humedad y dada la mayor presencia de oxígeno, en comparación con el aire, se pueden obtener concentraciones de ozono de dos hasta cuatro veces mayores. No obstante, los costos del proceso son mayores.

Existen diversas formas de expresar la concentración de ozono teniendo en cuenta que la densidad del ozono es de 2.14 kg/m^3 :

- Concentración de ozono en aire (en peso): $1 \text{ ppm de O}_3 = 2.14 \text{ mg O}_3/\text{m}^3 \text{ aire}$.
- Concentración de ozono en aire (porcentaje en peso): $1\% \text{ de ozono} = 12.8 \text{ g O}_3/\text{m}^3 \text{ aire}$.
- Concentración de ozono en aire (en volumen): $1 \text{ ppm volumétrico} = 1 \text{ cm}^3 \text{ O}_3/\text{m}^3 \text{ aire} = 1 \text{ ml O}_3/\text{m}^3 \text{ aire}$.

1.6.1.3 Factores críticos que afectan la eficacia del ozono

La eficacia del ozono está influenciada por factores extrínsecos e intrínsecos. Aunque el ozono es un desinfectante eficaz, es difícil predecir su comportamiento en presencia de los diferentes compuestos presentes en una matriz compleja como lo es un alimento, el pH del medio y factores ambientales

Capítulo 1: Introducción

como la temperatura y la humedad. Tanto la inestabilidad del ozono bajo ciertas condiciones y la presencia de materiales que consumen ozono afectan el nivel de ozono residual disponible en el medio. Por lo tanto, es importante distinguir entre la concentración de ozono aplicado y la de ozono residual necesario para una desinfección efectiva. Algunos de los factores clave que afectan la eficacia del ozono se describen en las siguientes secciones.

1.6.1.3.1 Factores Extrínsecos

- **Concentración**

Las concentraciones más altas de ozono dan como resultado una inactivación más rápida, un tiempo más corto y valores del tiempo de reducción decimal más pequeños (Steenstrup y Floros, 2004). Una concentración de ozono de 0.90 mg/l, redujo las poblaciones de *E. coli* de aproximadamente 10^8 UFC/ml en 4 log en 6 min. Las concentraciones más altas de ozono de 4.72 mg/l resultaron en reducciones más altas de aproximadamente 5 log en 4 minutos (Patil *et al.*, 2009b), lo que indica que la eficacia del ozono en la inactivación microbiana está regida por la concentración. Sin embargo, las concentraciones más altas de ozono pueden causar la oxidación de los compuestos que promueven la salud.

- **Temperatura**

Uno de los factores más importantes en la efectividad del tratamiento con ozono, es la temperatura de tratamiento dado que afecta la solubilidad, estabilidad y reactividad del ozono. La solubilidad del ozono en agua es 13 veces mayor que la del oxígeno a 0-30°C, y es más soluble en agua más fría (Rice, 1986; Bablon *et al.*, 1991). A medida que la temperatura aumenta, el ozono se vuelve menos soluble y menos estable pero la velocidad de reacción con el sustrato se incrementa (Khadre, Yousef y Kim, 2001). La capacidad del ozono para inactivar las bacterias disminuye al disminuir la temperatura (Vaughn *et al.*, 1987; Hunt y Marinas, 1997). Dow *et al.* (2006) indicaron que el

Capítulo 1: Introducción

aumento de temperatura (7-22°C,) tuvo la mayor influencia en la tasa de inactivación de las esporas de *Bacillus subtilis*. El efecto simultáneo de estos dos factores (solubilidad / estabilidad y reactividad) sobre la eficacia del ozono puede variar con las condiciones experimentales, lo que dificulta predecir la influencia de la temperatura en una aplicación particular (Pascual *et al.*, 2007).

1.6.1.3.2 Factores intrínsecos

- pH

Kuscu y Pazir (2004) indicaron que una disminución en el pH aumenta la eficacia del ozono, El aumento del pH se acompaña por un crecimiento de la velocidad de descomposición del ozono bajo formas de especies oxidantes que tienen reactividades diferentes con los constituyentes de los microorganismos. Se informó que la cinética de inactivación de *E. coli* fue mucho más rápida en un medio ácido que en uno básico. La inactivación de *E. coli* (10^8 UFC/ml) a una velocidad de flujo de 2 L/min y una concentración de ozono de 0.90 mg/L a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ dio como resultado una constante de tasa más alta a un valor de pH de 4.93 que a pH 9.16 (Zuma *et al.*, 2009).

- Componentes de los alimentos

Los componentes de los alimentos interfieren con las propiedades antimicrobianas del ozono. La eficacia del ozono se demuestra más fácilmente cuando los microorganismos específicos se suspenden y se tratan en agua pura o en sistemas buffer (con baja demanda de ozono) que en sistemas alimentarios complejos, en los que es difícil predecir cómo reaccionará el ozono en presencia de materia orgánica. La presencia de sustancias orgánicas con alta demanda de ozono en un medio puede competir con los microorganismos por el ozono. La presencia de un alto nivel de sólidos orgánicos proporciona protección para los microorganismos (Seydim *et al.*,

Capítulo 1: Introducción

2004). Patil *et al.* (2009a, b) demostraron que se obtuvo una mayor velocidad de inactivación de *E. coli* en el jugo de naranja modelo que, en el jugo turbio sin filtrar debido a la presencia de otros constituyentes como la fibra, el ácido ascórbico y los azúcares, que actuaron como barreras para la inactivación de los microorganismos (O'Donnell *et al.*, 2012).

1.6.1.4 Aplicación de Ozono en la industria cárnica

Las industrias o establecimientos en los que se procesan almacenan o comercializan carnes o pescados, cuentan indispensablemente con equipos de frío para la congelación y/o conservación de los productos. Sin embargo, muchos de los microorganismos que permanecen inactivos dentro de las cámaras frigoríficas, se restablecen una vez que alcanzan la temperatura ambiente. El ozono, por su parte, destruye bacterias, mohos, esporas y todos aquellos microorganismos que se incorporan a la carne durante las distintas etapas de producción, obteniéndose de esta manera alimentos inocuos sin importar la temperatura a la que se encuentren. Para esto es imprescindible que el tratamiento se inicie con la primera etapa de producción, es decir en el matadero, ya que los microorganismos que pueden alterar la calidad del producto se adhieren a él durante su manipulación (la masa muscular de cualquier animal sano no contiene microorganismos).

Aunque depende de las condiciones de temperatura, humedad y del tipo de producto a conservar, la dosis de aplicación de ozono en cámaras frigoríficas varía de 6×10^{-7} a 3×10^{-6} kg O₃/m³. Es posible afirmar que la ozonización cumple cuatro objetivos esenciales que aseguran una correcta conservación de los alimentos, tanto en cámaras frigoríficas como en locales de manipulación, conservación y distribución:

- ◆ Mantiene la limpieza y desinfección del ambiente.
- ◆ Evita o disminuye la pérdida de peso de los alimentos durante su

Capítulo 1: Introducción

almacenamiento.

- ◆ Desodoriza completamente el ambiente, impidiendo la transmisión de olores de un alimento a otro.
- ◆ Favorece la conservación de los alimentos por un período de tiempo mayor.

Lo que se debe tener en cuenta al momento de utilizar el tratamiento con ozono es que debe aplicarse en todas las etapas de producción si se desea obtener un mejor resultado. Se recomienda contar, tanto en el matadero, como en los lugares de fraccionamiento, transporte, almacenamiento y comercialización, con una atmósfera que contenga las concentraciones de ozono correctas, dependiendo de la temperatura, humedad y producto a tratar.

La inactivación de microorganismos por medio del ozono es un proceso complejo debido a que actúa sobre diferentes constituyentes celulares, desorganizando las membranas y paredes, llevando a la lisis celular. La acción microbicida del ozono se debe a su capacidad de oxidar componentes celulares vitales de muchos microorganismos. El principal punto de acción son los constituyentes de la superficie celular. El ozono actúa sobre la pared celular oxidando sus componentes por lo cual se incrementa la permeabilidad y puede ocasionar la lisis celular. Además, una vez que penetró la célula, el ozono daña los constituyentes de los ácidos nucleicos (ARN y ADN), como consecuencia, los microorganismos no son capaces de desarrollar inmunidad al ozono como lo hacen frente a otros agentes desinfectantes.

La acción oxidante que presenta el ozono puede llegar a perjudicar la calidad de las carnes aumentando la rancidez y variando el color de las mismas. El ozono puede oxidar fácilmente los tejidos musculares, producir decoloraciones indeseables y dar lugar a sabores rancios en los tejidos grasos (Kaess y Weidemann, 1968 a,b; Clark y Takacs, 1980). Stivarius *et al.* (2001), encontraron que los valores de a^* (coordenadas rojo/verde) disminuían al

Capítulo 1: Introducción

utilizar ozono debido a la oxidación de la mioglobina y oximioglobina a metmioglobina. La oxidación lipídica es un parámetro importante que influye en la calidad y la aceptabilidad de la carne. Algunos autores han reportado aumento de los niveles de oxidación de lípidos en la carne sometida al tratamiento con ozono. Coll Cárdenas *et al.*, (2011) encontraron que muestras expuestas por 24 h a al ozono presentaban una disminución del parámetro a^* que está relacionado con la coloración rojiza de la carne y un aumento en los valores de TBARS llegando a concentraciones inaceptables por el consumidor.

1.6.2 Proceso de alta presión hidrostática

La aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH) a los alimentos ha despertado en los últimos años un enorme interés industrial. Como se mencionó anteriormente es una de las tecnologías emergentes para la conservación de alimentos que se ha introducido en la industria para evitar la disminución del valor nutritivo del alimento y asegurar su vida útil.

Los primeros trabajos de investigación sobre los efectos de aplicar alta presión sobre alimentos fueron realizados por Bert Hite hacia finales del siglo XIX quien logró preservar la leche mediante la aplicación de altas presiones. La difusión masiva de la técnica de altas presiones para la conservación de alimentos se presentó a partir de 1980, diez años más tarde salió a la venta el primer producto tratado por tecnología APH en Japón. En los años sucesivos la cantidad de productos conservados mediante tratamientos por altas presiones aumentó progresivamente en los países desarrollados (mermeladas, yogur, jugos de fruta, jaleas, etc.), a la vez que continuaron los proyectos de investigación y desarrollo sobre esta tecnología debido al gran potencial que presenta.

Actualmente, existen dos procedimientos: la presión dinámica, todavía no utilizada a gran escala y la presión estática, que es la que hoy

Capítulo 1: Introducción

tiene aplicación práctica. Cuando el medio transmisor de presión es el agua se denominan altas presiones hidrostáticas (APH), las cuales son las más utilizadas en las industrias.

La aplicación de APH se basa en someter a un producto a elevados niveles de presión hidrostática (100-1000 MPa) de forma continua durante un cierto tiempo (varios minutos) (Knorr, 2000). La utilización de altas presiones hidrostáticas se rige, fundamentalmente por dos principios:

- **Principio de Le Chatelier:** Este principio establece que cuando un sistema químico se encuentra en condiciones de equilibrio y experimenta un cambio o variación en su concentración, temperatura, volumen o presión parcial; el sistema modificará sus condiciones para contrarrestar dicho cambio. Específicamente la aplicación de alta presión sobre un sistema provoca un desplazamiento del equilibrio hacia el estado en que ocupa menos volumen.

- **Proceso Isostático:** Este principio se refiere a la transmisión uniforme e instantánea a través de todo el material tratado por alta presión, esto evita la generación de zonas que presenten mayores niveles de tratamiento, lo que ocasionaría una deformación y pérdida de integridad del producto.

De acuerdo con este último principio, esta tecnología puede aplicarse directamente a alimentos líquidos o a cualquier producto envasado sumergidos en un fluido de presurización (de baja compresibilidad). La presión aplicada al sistema permitiría un tratamiento isostático y uniforme independientemente del tamaño, forma y volumen del material procesado. Cuando los alimentos se tratan en su envase, éste debe ser flexible y deformable (debe tolerar reducciones de volumen de hasta un 15%). Es especialmente importante la evacuación de los gases del interior para evitar que su compresión reduzca la eficacia de la presurización. Los equipos de alta presión hidrostática empleados

Capítulo 1: Introducción

en el procesamiento de alimentos están formados, fundamentalmente, por una cámara de presurización (cilíndrica de acero de elevada resistencia), un generador de la presión (generalmente un sistema de bombeo constituido por una bomba hidráulica y un sistema multiplicador de presión) y un sistema de control de temperatura. En la actualidad existen equipos de funcionamiento discontinuo (los más utilizados) y semi-continuos.

1.6.2.1 Equipos de alta presión para procesamiento de alimento

El equipamiento básico de un equipo para tratamiento de alimentos por alta presión está compuesto por:

- **Módulo con cilindro de alta presión hidrostática:** esta es la unidad principal del equipo.

Se trata de un cilindro de acero (aleaciones), y dependiendo de la presión necesaria para el tratamiento puede ser de acero monocapa (presiones entre 400 MPa y 600 MPa) o de aceros especiales multicapa (para presiones próximas a los 1000 MPa), estos últimos son significativamente más costosos. Debido a que actualmente los equipos de tratamiento continúan siendo discontinuos (proceso batch), los productos son tratados por lotes y por lo tanto la capacidad de producción del equipo debe evaluarse teniendo en cuenta:

- Número de ciclos que realiza el cilindro por unidad de tiempo: El tiempo que tarda el equipamiento en completar un ciclo se determina teniendo en cuenta los tiempos de: carga y descarga de los contenedores y del cilindro de alta presión, de cierre y apertura de este y de presurización y despresurización. Este último depende directamente de la potencia del sistema de bombas e intensificadores de presión.
- Capacidad de carga de la cámara (coeficiente de llenado): depende

Capítulo 1: Introducción

del volumen interno del cilindro y de las características del producto y de su envase (tamaño, forma, etc.).

- Número de cámaras del equipamiento: es posible aumentar la capacidad de producción del equipamiento si se multiplica el número de cilindros de alta presión. Sin embargo, se debe tener en cuenta que esto aumenta significativamente los costos de inversión inicial, por lo tanto, se debe hacer un análisis previo sobre la configuración óptima del equipo dependiendo de la capacidad de producción deseada.

- **Módulo de bombas e intensificadores de presión:** la potencia de estos debe determinarse según la presión que se deba alcanzar para un tratamiento eficaz del producto. Cuanto mayor sea la magnitud de dicha presión mayor deberá ser la potencia entregada por estos equipos.

- **Contenedor para carga de alimentos envasados:** esta unidad es la que contiene en su interior a los productos envasados, su tamaño lo determina el del cilindro de alta presión, ya que el contenedor ingresa directamente a este donde se lleva a cabo la presurización del producto.

- **Sistema de cierre electrónico:** este sistema puede ser de rosca discontinua de apertura y cierre rápido, el cual es recomendable para tiempos de presurización cortos; o puede ser de rosca continua de menor costo y más lento, utilizado en procesos que presentan tiempos de presurización más largos.

- **Sistema de carga y descarga automatizado:** es necesario que esté diseñado para que las dos operaciones se realicen de forma rápida y efectiva. Este sistema incluye las siguientes etapas de manipulación del producto:

- Recepción de los productos envasados sin tratar y disposición

Capítulo 1: Introducción

de estos en los contenedores.

- Transporte e ingreso de los contenedores hacia el cilindro de alta presión.

- Retiro de los contenedores del cilindro una vez finalizado el proceso de presurización y transporte de estos hacia el descargador.

- Descarga del producto de los contenedores y traslado hacia el área de envasado secundario del producto tratado.

- **Panel de control:** esta unidad es fundamental para tener un correcto control de las variables del proceso (temperatura, presión, tiempo, etc.) y verificar que se realice sin inconvenientes.

1.6.2.2 Etapas del proceso

1. Los alimentos envasados se introducen en contenedores cerrados y luego en las cámaras o cilindros de alta presión.

2. A continuación se cierra el cilindro de alta presión, a la vez que se abren las válvulas que la conectan con el depósito de agua, y comienza a llenarse.

3. Una vez que el cilindro de alta presión está lleno de agua a presión normal, el sistema de bombas e intensificadores de presión continúan inyectando agua hacia su interior.

4. Una vez alcanzada la presión deseada, una válvula que cierre el circuito permitirá su mantenimiento, sin necesidad de aporte adicional de energía, el tiempo estipulado (generalmente de unos pocos minutos) para que se inactiven microorganismos sin modificar las características sensoriales del alimento.

Capítulo 1: Introducción

5. Una vez finalizado el tiempo indicado para el proceso, se produce una despresurización instantánea y como resultado el volumen del producto retorna exactamente a su estado inicial.

El tratamiento con alta presión es una técnica que se viene utilizando en los últimos años a nivel internacional en la industria alimentaria. El efecto de las altas presiones hidrostáticas puede resumirse en los siguientes puntos: disminución de la síntesis de ADN, aumento de la permeabilidad de las membranas celulares, desnaturalización de biopolímeros y proteínas, incluida inactivación de enzimas, por cambios en la estructura intramolecular (>300 MPa). Estos hechos, pueden afectar, en mayor o menor grado, la viabilidad de los microorganismos y otros agentes alterantes, así como modificar los componentes de los alimentos y cambiar las características organolépticas de los mismos (Knorr, 2000; Smelt, 1998). La sensibilidad de los microorganismos a la aplicación de alta presión hidrostática (barosensibilidad) depende de múltiples factores, siendo objeto de múltiples investigaciones. En cuanto a los efectos en los componentes y características de los alimentos, en las condiciones habituales de procesado,

Capítulo 1: Introducción

no se afectan enlaces covalentes y puede decirse que no se alteran los aromas ni el valor nutritivo de los alimentos. Sin embargo, se pueden producir cambios de color y de apariencia, y modificaciones en los atributos de textura, aunque los efectos varían de unos alimentos a otros. A pesar de que inicialmente la aplicación de altas presiones hidrostáticas se realizó fundamentalmente, con fines de conservación (Knorr *et al.*, 2000), diversas investigaciones han puesto en evidencia su enorme potencial de transformación en la elaboración de diversos productos. Como sistema de conservación, se han conseguido resultados equivalentes a una pasteurización térmica en diversos productos con tratamientos de 400 – 500 MPa, durante varios minutos. Sin embargo, el umbral de esterilización no está bien definido en muchos casos. Se han probado distintas estrategias para incrementar la eficacia, así se han ensayado procesos combinados de presurización (> 400 MPa) con tratamientos térmicos suaves (esterilización a baja temperatura) y/o agentes como bacteriocinas (lisozima, nisina) y lactoferrina. En el mercado pueden encontrarse productos presurizados como mermeladas (primeros comercializados a partir de 1990 en Japón), zumos, jaleas, concentrados y purés de frutas, postres (en países como Japón, USA, Alemania), patés (por ejemplo, en Francia), productos lácteos (en Reino Unido), derivados cárnicos curados, cocidos, preparados listos para su consumo (en España).

Capítulo 1: Introducción

Figura 1.12: Ejemplos de productos RTE presurizados, actualmente comercializados. Incluyendo: 1) productos cárnicos, 2) productos de la pesca, 3) lácteos, zumos, y platos preparados de vegetales y/o pasta.

1.6.2.3 Alta presión Hidrostática y microorganismos patógenos

El desarrollo de bacterias patógenas y microorganismos de deterioro en los alimentos resulta indeseable desde el punto de vista de la salud de los consumidores, debido a que pueden ser causantes de enfermedades

Capítulo 1: Introducción

transmitidas por los alimentos (ETA) (WRO, 1998). El crecimiento microbiano está gobernado por la acción simultánea de diversos factores físicos y químicos limitantes. La capacidad de sobrevivir e iniciar el crecimiento de cada tipo de microorganismo, tanto los alteradores como los causantes de enfermedades alimenticias está influenciada por la acción conjunta de factores extrínsecos, como pH, temperatura, a_w ; intrínsecos (propios del alimento) y los propios del microorganismo.

La respuesta de los microorganismos patógenos y alterantes frente a las altas presiones depende de factores externos como la presión, la temperatura, el tiempo de aplicación del tratamiento y de otros parámetros como el pH, la a_w , el contenido en sal y la presencia de otros antimicrobianos en el alimento (Rendueles *et al.*, 2011). La composición química del alimento determina la resistencia o sensibilidad de los microorganismos al tratamiento de presurización, y la presencia de grasas, proteínas, minerales y azúcares actúan como agentes protectores frente a las altas presiones. También son determinantes factores intrínsecos como el tipo de microorganismo, el estado fisiológico y otras particularidades de las cepas (Jofré *et al.*, 2010), observándose una elevada variabilidad en la resistencia a las altas presiones, incluso entre cepas de la misma especie (Liu *et al.*, 2012). Los microorganismos Gram-negativos son más sensibles a las altas presiones que los Gram-positivos. La morfología celular también influye, siendo los bacilos más sensibles a la presurización que los cocos. En cuanto al estado fisiológico, los microorganismos en fase exponencial son más sensibles a las altas presiones que los que se encuentran en fase estacionaria (Mañas *et al.*, 2004).

Los mecanismos de inactivación bacteriana por la alta presión no se conocen completamente, pero el daño de membranas, la desnaturalización proteica y el estrés oxidativo parecen jugar un papel importante (Mackey *et al.*, 2008).

Se ha propuesto la pérdida de integridad de la membrana

Capítulo 1: Introducción

citoplasmática como uno de los eventos críticos que conducen a la muerte de los microorganismos tratados por presión, produciéndose un cambio de permeabilidad de la misma (Pagán y Mackey, 2000). Sin embargo, esta pérdida parcial de funcionalidad o el daño producido en la membrana no necesariamente conducen a la muerte celular, ya que las células bacterianas que sobreviven pueden experimentar una mayor sensibilidad a sustancias inhibitoras, tales como cloruro sódico, sales biliares e ingredientes de medios selectivos (Pagán y Mackey, 2000).

1.6.2.4 Alta presión hidrostática y carne vacuna

Debido a que la aplicación de la presión tiene una considerable influencia sobre la estructura y la funcionalidad de las proteínas, se pueden ver afectadas las propiedades texturales, sensoriales y nutritivas de la carne y de productos cárneos derivados (Jung *et al.*, 2003).

Las altas presiones hidrostáticas es una técnica de conservación de carnes rojas frescas y saladas (Realini *et al.*, 2011) y de productos cárnicos curados y cocinados (Bover-Cid *et al.*, 2011; Szerman *et al.*, 2011; Hugas *et al.*, 2002; Aymeritch *et al.*, 2008) que utiliza presiones isostáticas de entre 100 y 1000 MPa (Hugas *et al.*, 2002; Simon-Sarkadi *et al.*, 2011; Crehan *et al.*, 2000; Aymerich *et al.*, 2008). La eficacia de las APH depende de parámetros tecnológicos como la presión, mantenimiento de temperatura y tiempo, así como del tipo y estado fisiológico de los microorganismos y de las propiedades intrínsecas del alimento (pH, aw) (Bover-Cid *et al.*, 2011; Hugas *et al.*, 2002; Hereu *et al.*, 2012; Jofré *et al.*, 2009; Díez, 2009). La baja actividad acuosa disminuye la eficacia del tratamiento de APH y se inhibe la recuperación de microorganismos durante el almacenamiento (Jofre *et al.*, 2009).

Para los sistemas cárnicos, la eficacia de APH depende de las características asociadas con el producto cárnico específico y de la intensidad, el tiempo y la temperatura de la operación APH. Otros factores que también

Capítulo 1: Introducción

influyen son: si una carne está en un estado pre-o post-rigor, el pH de las carnes y la fuerza iónica, etc (Cheftel *et al.*, 1997). Aunque las investigaciones de los efectos de la APH en la calidad de la carne son limitadas, los estudios encontrados hasta ahora indican que los tratamientos de APH pueden influir en la textura y el color de los productos cárneos curados (Jung *et al.*, 2003; Carballo *et al.*, 1997; Bak *et al.*, 2012). La aplicación de altas presiones modifica la permeabilidad de las células haciéndolas más permeables a los solutos y facilitando la difusión (Herrero y Romero de Avila, 2006).

La aplicación comercial de APH a la carne roja fresca no se ha utilizado todavía debido a la severa decoloración de la carne a niveles de presión necesarios para la inactivación de microorganismos alterantes y patógenos (Fernández *et al.*, 2007). La decoloración en carnes frescas pigmentadas es producida a niveles superiores a 300 MPa, que son los requeridos para la inactivación de células vegetativas. En el rango de 200- 350 MPa se produce un aclaramiento de la carne como consecuencia de la desnaturalización de la globina y del desplazamiento o pérdida del grupo hemo-hierro. Entre los 300-600 MPa disminuye el enrojecimiento (Szerman *et al.*, 2011).

Prolongar la vida útil de los productos de carne se ha convertido en una necesidad comercial. En la industria alimentaria y en el sector cárnico, en particular, se tienen limitados conocimientos acerca de efecto de APH en la calidad de productos cárneos. Dados los problemas de coloración que genera el tratamiento con altas presiones surge la necesidad de profundizar la posibilidad de aplicar un tratamiento químico previo al tratamiento de alta presión hidrostática para evitar la obtención de un producto cárneo con una coloración pálida no deseada.

Un pre-tratamiento con sales del tipo de las que se utilizan durante el curado permitiría la formación de nitrosomioglobina manteniendo un color adecuado en la superficie del producto.

Capítulo 1: Introducción

1.6.2.5 Curado

La salazón y el curado son procedimientos muy extendidos para obtener productos cárnicos y también para conservar durante más tiempo la carne fresca. Al tratar la carne con sal común (NaCl) hay una importante pérdida de agua; en las mismas condiciones la carne salada es más seca que la fresca.

El alto contenido salino determina a la vez la detención del desarrollo microbiano; igualmente se frena la actividad enzimática propia de la carne y debido a esto se consigue que la carne salada se altere más difícilmente que la carne sin salar.

La carne tratada con cantidades crecientes de NaCl experimenta un cambio característico. Al principio se hace más voluminosa, se hincha, aumenta la cantidad de agua retenida y el pH se torna ácido.

La adición de sal a una carne cruda disminuye el pH de las proteínas aproximadamente en 0.2 unidades (Hamm, 1960) y lo lleva por tanto a las proximidades de 5.0. Por esto, en las condiciones prácticas de fabricación de los productos cárnicos (pH: 5.4 a 5.9), la diferencia entre el punto isoelectrico de las proteínas y el pH del medio está aumentada, lo que se traduce en un aumento de retención de agua. Por último, cuando la carne contiene aproximadamente un 5% de sal, alcanza el estado de máxima imbibición y con ello la cantidad de agua retenida es también máxima.

Si se continúa agregando NaCl, disminuye el volumen de la carne y el agua retenida. Cuando la concentración de sal está entre el 10 y el 12 %, se invierte el proceso: disminuyen de volumen los haces musculares y la carne en conjunto no sólo deja de fijar agua, sino que pierde la suya propia. Si se considera el proceso desde el punto de vista de las proteínas en solución, lo que realmente ocurre es su precipitación. Si se continúa añadiendo sal se llega a un punto final en que los haces musculares no pierden más agua y a causa de la alta concentración salina se desnaturalizan las proteínas.

Capítulo 1: Introducción

En general se estima que para conseguir la salazón completa de la carne se requieren dos días por cada kilogramo de esta.

Por lo general se utiliza para la salazón o curado cloruro de sodio, pero pueden utilizarse también nitrato y nitrito de sodio. En este caso existen cantidades límites permitidas.

1.6.2.5.1 Cloruro de sodio

Es ciertamente el aditivo más antiguamente conocido y utilizado y cumple múltiples funciones.

1.6.2.5.1.1 Funciones de la sal

- **Acción bacteriostática:**

El NaCl no es un agente antiséptico ya que no destruye a las bacterias o lo hace mínimamente; aunque sí frena y detiene el crecimiento de la mayoría de ellas, cuando se utiliza a concentraciones suficientes. Se considera generalmente que a la concentración de 100 g/L, inhibe el crecimiento de numerosos microorganismos; en cambio a la concentración de 50 g/L, su acción se hace sentir solamente sobre los anaerobios.

La concentración que debe alcanzar el producto terminado es del 2.5-3 g/100 ml.

- **Agente de sapidez**

La sal aporta un gusto salado debido al anión Cl⁻, mientras que el catión Na⁺ tiene su efecto principal sobre la capacidad de estimular los receptores gustativos (Girard, 1991).

Capítulo 1: Introducción

- **Acción sobre las proteínas**

Mediante el aumento de la fuerza iónica, la sal aumenta la solubilidad de las proteínas musculares (Girard, 1991), favoreciendo así la manifestación de sus propiedades tecnológicas (poder emulsificante, ligante, etc).

- **Influencia sobre el poder de retención de agua de la carne**

La adición de sal a una carne cruda disminuye el pH de las proteínas aproximadamente en 0.2 unidades y lo lleva por tanto a las proximidades de 5.0 (Girard, 1991). Por esto, en las condiciones prácticas de fabricación de los productos cárnicos (pH: 5.4 a 5.9), la diferencia entre el punto isoelectrico de las proteínas y el pH del medio está aumentada, lo que se traduce en un aumento de retención de agua.

La carne tratada con cantidades crecientes de NaCl experimenta cambios característicos como se citó anteriormente.

1.6.2.5.1.2 Penetración de la sal en la carne

La penetración de la sal en la carne está en relación con el establecimiento de un equilibrio entre las concentraciones de sal en el interior y el exterior de la pieza. Por otra parte, un cierto número de factores, tanto externos como internos, tienen influencia en la rapidez con la que se establece el equilibrio. Entre los factores externos se puede citar a la temperatura y a la concentración de la salmuera.

Con respecto a los factores internos, el más importante es el pH. Cuanto más elevado es el pH menos fácilmente penetra la sal. Desde las observaciones de Callow (1936) se clasifican las carnes como de estructura firme (mala penetración de sal) o abierta (buena penetración). Accesoriamente la presencia de grasa en los tejidos frenaría la penetración de la sal. La “historia” de la carne antes del procesamiento en salmuera tiene también una influencia

Capítulo 1: Introducción

marcada. En particular un ciclo de congelación/descongelación tiene un gran efecto sobre la penetración de la sal (Gonzales-Mendez *et al.*, 1983; Girard, 1991) ya que por la acción de los cristales se rompe la microestructura del tejido.

En general se estima que para conseguir la salazón completa de la carne se requieren dos días a dos días y medio por cada 500g de carne (Pearson y Gilett, 1996). La penetración de la sal siguiendo la dirección de las fibras es más fácil que en sentido transversal a los haces, pues en este caso hay que vencer el obstáculo representado por la fina membrana de tejido conjuntivo (Graiver *et al.*, 2006).

1.6.2.5.1.3 Cuantificación de la sal

Como su empleo no está reglamentado y puesto que el gusto salado es suficiente para limitar el consumo de productos que contiene demasiada sal, su dosificación no tiene el carácter de control (eventualmente represivo) que tienen otros numerosos aditivos. De modo clásico se realiza mediante la valoración de los iones Cl^- , según diferentes métodos fundamentados en la insolubilidad del cloruro de plata o mediante un electrodo selectivo. En el caso de los alimentos dietéticos se dosifica el catión Na^+ ya que es el contenido de este elemento el que está reglamentado (y la sal no es la única fuente de estos cationes).

1.6.2.5.2 Nitritos y nitratos

Polenski, en 1891, demostró que el nitrato era reducido a nitrito por acción bacteriana; Lehman, en 1899 estableció que el color característico de los productos de salazón era debido al nitrito, finalmente Haldane, en 1910, explicó el mecanismo de formación de ese color por la combinación del óxido de nitrógeno (NO) con el pigmento de la carne. La utilización de nitrito solo en salazón fue estudiada por Lewis (1926) y Kerr *et al.* (1926), ellos mostraron que la adición de 0.0156 g/100ml de nitrito permitían la obtención del color

Capítulo 1: Introducción

deseado, el empleo de nitrito de sodio en esta dosis fue autorizada en USA y luego se extendió a otros países ya que era más fácil su control por adición directa que por intermedio de la reducción bacteriana de nitrato, difícil de controlar.

El poder inhibidor del nitrito frente a las bacterias fue descubierto por Grindley en 1929. Brooks (1940) realizó el primer trabajo que mostraba la existencia de un sabor característico asociado al nitrito en los productos de salazón (Lawrie, 1974).

Al comienzo de los años 40, los tres papeles esenciales de estos preservadores (color, sabor, acción antibacteriana) eran conocidos, sin embargo, los mecanismos de acción no habían sido elucidados. A pesar de ello, como el nitrito tiene efectos tóxicos, simultáneamente a su empleo se pusieron en marcha los correspondientes controles en su uso, con el fin de proteger la salud de los consumidores, y estos controles precisamente han demostrado que una parte importante del nitrito desaparecía en el curso de la fabricación y del almacenamiento. Esta observación dio nacimiento a los estudios sobre el uso del nitrito en la carne y en los productos cárnicos desde 1940, y el interés de las investigaciones en este sector fue acentuado por el descubrimiento de Magee y Barnes (1956) sobre el efecto cancerígeno de las nitrosaminas.

Las propiedades químicas del nitrito de sodio se derivan directamente de su carácter oxidoreductor y de su poder nitrosante (Price y Schweigert 1976). En solución está en equilibrio con el ácido nitroso no disociado. A los pH usuales de la carne, está esencialmente bajo la forma de sal.

En los sistemas biológicos, el ácido nitroso o el ión NO_2^- son susceptibles de participar de numerosas reacciones en función del pH, de la temperatura y de la presencia de otras sustancias, por ejemplo:

- Reacción de Van Slyke con los aminoácidos

Capítulo 1: Introducción

A consecuencia de esta reacción parte del nitrito añadido puede desaparecer durante el curado de la carne. El nitrito desaparece más rápidamente cuando las carnes curadas contienen ácido acético u otros ácidos.

- Reacción con una amina secundaria con formación de una nitrosamina.

1.6.2.5.2.1 Funciones

El agregado de $NaNO_2$ en las sales de curado cumple tres funciones: como bacteriostático y para lograr el color y sabor deseados.

En cuanto al ión nitrato, este debe reducirse a nitrito, lo que tiene lugar gracias al poder reductor de una serie de bacterias que siempre se encuentran en la carne como *Achromobacter dentriticum*, *Micrococcus epidermis* y *M. nitrificans*. Para que esto se verifique hace falta un pH ácido determinado y un potencial redox óptimo para la reducción bacteriana. Los glúcidos existentes en la carne o el añadido en el proceso de curado se transforman por acción de las enzimas cárnicas y bacterianas en ácido láctico, por lo que el valor del pH desciende *postmortem* y se alcanza el valor de pH que favorece la formación de nitrito a partir de nitrato.

Capítulo 1: Introducción

- Color

En solución ligeramente ácida el ácido nitroso se descompone de la siguiente manera:

En solución el NO (gas incoloro) formado puede oxidarse, en presencia de oxígeno, a dióxido de nitrógeno:

El dióxido de nitrógeno disuelto a su vez forma ácido nitroso y ácido nítrico:

Sin embargo, se duda de que la cantidad de oxígeno que pueda existir en la carne sea suficiente para oxidar una cantidad significativa de monóxido de nitrógeno. En la salmuera de curado, sin embargo, es posible que se oxide una proporción sustancial de NO, sobre todo si la solución de curado se usa durante mucho tiempo.

Se sabe que el NO forma complejos con los compuestos porfirínicos como la catalasa, las peroxidasas, los citocromos, la citocromooxidasa, la hemoglobina y la mioglobina. La catalasa es rápidamente inactivada por el nitrito. El principal pigmento que contiene la carne en el momento de someterla a curado es la mioglobina y por eso se presta mayor atención a los cambios químicos experimentados por este pigmento durante el proceso del curado.

La reacción química básica que produce el pigmento muscular de la carne curada es el siguiente:

Capítulo 1: Introducción

En esta reacción una molécula de monóxido de nitrógeno sustituye a la molécula de agua que se halla unida al átomo de hierro del grupo hemo del pigmento, sin que se modifique el estado de oxidación del hierro.

En la representación anterior N indica los átomos de nitrógeno de la estructura pirrólica heterocíclica del gran anillo planar de la porfirina.

En el curado intervienen también otras reacciones. Instantes después de desangrar el animal, cesa prácticamente la actividad respiratoria a consecuencia de la falta de oxígeno. La mayor parte del pigmento de la carne se encuentra en forma de mioglobina salvo una pequeña cantidad presente en la superficie que se oxigena a oximioglobina (**Figura 1.12**).

En ambos casos puede formarse directamente óxido nítrico mioglobina (rojo) al reaccionar el monóxido de nitrógeno con la mioglobina (rojo púrpura), aunque la mayor parte de la mioglobina se oxida a metaglobina por la acción del nitrito añadido. La metamioglobina formada tiene que reducirse después para producir el pigmento de la carne curada.

Figura 1.13: Modificaciones de la mioglobina en la carne curada.

- **Sabor**

El primer estudio realizado por Brooks *et al.*, (1940) establecía una diferencia de sabor relacionada con la utilización de nitrito. Los productos responsables del sabor característico provienen de la reacción del nitrito con los componentes de la carne. Son suficientes cantidades relativamente pequeñas de nitrito añadido (0.0025 g/100ml) para obtener el sabor característico, mientras que con dosis demasiado elevadas (0.0300 g/100ml) se observa una degradación de este sabor, posiblemente debido a fenómenos de oxidación (Girard, 1991).

La mayoría de los autores que han estudiado la influencia del nitrito

Capítulo 1: Introducción

sobre el sabor han tratado de identificar el o los productos responsables. Por cromatografía gaseosa han sido aislados un gran número de compuestos volátiles.

- **Papel bacteriostático**

El nitrito tiene poder bacteriostático frente a un gran número de cepas principalmente de Clostridia y algunos Staphylococos. El poder inhibidor del mismo depende de la cantidad en sal, del pH, de la presencia de nitrato, del número de bacterias, de la temperatura de almacenaje y del hecho que el producto haya sufrido un tratamiento térmico o no.

Roberts *et al.*, (1976) y Girard (1991) concluyeron que 0.0100 g/100ml de nitrito incorporados a los productos sometidos a un tratamiento térmico son suficientes para asegurar la protección antibotulínica (Girard 1991), ya que el ión nitrito inhibe el crecimiento de *Clostridium botulinum* que produce esta toxina botulínica. Los mecanismos y factores de esta acción antimicrobiana se desconocen. Sin embargo, puesto que las carnes curadas se almacenan en condiciones anaerobias, es muy importante confirmar la seguridad de estos alimentos (Shibamoto *et al.*, 1996).

1.6.2.5.2.2 Toxicidad del nitrito

La toxicidad propia del nitrito está relacionada con su poder oxidante. Tiene la propiedad de oxidar la hemoglobina sanguínea (Fe^{+2}) a metahemoglobina (Fe^{+3}) que bajo esta forma no es ya apta para jugar su papel de transportador de oxígeno y entraña una hipoxia a nivel de los tejidos. En los adultos el organismo es capaz de luchar contra esta agresión ya que está equipado de un sistema enzimático apto para efectuar la reacción inversa y transformar la metahemoglobina en hemoglobina reducida (sistema metahemoglobina reductasa). Por el contrario, el niño lactante no posee este equipamiento enzimático y los riesgos de intoxicaciones graves son entonces mucho mayores.

Capítulo 1: Introducción

La toxicidad indirecta del nitrito pasa por la formación de nitrosaminas.

Las nitrosaminas, como otros grupos de cancerígenos químicos, necesitan una activación metabólica para convertirse en tóxicos. El proceso de activación está mediado por enzimas e implica, al menos en ciertos casos, la hidroxilación del carbono α (**Figura 1.13**). Las nitrosaminas son muy organoespecíficas en sus acciones cancerígenas; por ejemplo, la dimetilnitrosamina es un cancerígeno hepático con cierta actividad renal y la bencilnitrosamina es específica del esófago (Shibamoto *et al.*, 1996).

En algunos casos se puede minimizar la formación de nitrosaminas adicionando a un nivel determinado de nitrito, agentes reductores como ascorbato o eritorbato, o antioxidantes como tocoferoles (Varnam, 1995).

Figura 1.14: Formación de nitrosaminas y de un agente alquilante.

1.6.2.5.2.3 Cuantificación de nitrito

En la bibliografía existen distintos métodos para dosar nitrito pero la mayoría de ellos están basados en la propiedad fundamental de la sal de diazonio formada por la reacción entre el ácido nitroso y el ácido sulfanílico de dar un colorante azoico por la unión con una amina aromática en medio ácido (reacción de Griess), o con un fenol en medio básico (reacción de Zambelli).

Capítulo 1: Introducción

Existen igualmente métodos fluorométricos basados bien sea en la diazotación de la p-cloroanilina seguida de un acoplado con la 2,6-diaminopiridina, o bien sobre la reacción con la 5-amino-fluoresceína. Estos métodos, muy sensibles (detección 10^{-9}) son de una realización complicada. Hay otros métodos no muy utilizados como el polarográfico, el entalpimétrico, o la quimio-luminiscencia.

1.6.2.5.2.4 Valores límites

La máxima cantidad residual de nitrito de sodio permitida por el Código Alimentario Argentino es 0.015 g/100ml (150 ppm) (Código Alimentario Argentino 2001/2003, artículo 286).

En Estados Unidos, la legislación establece que el uso de nitrito, nitrato o su combinación no debe superar las 0.02 g/100ml (200 ppm) calculado como nitrito de sodio en el producto final (USDA-FSIS 1999).

1.6.2.5.3 Ácido Ascórbico

Aparte de los ingredientes normales del curado, en la industria de la carne se ha introducido el uso de diversas sustancias coadyuvantes. El interés por estos ingredientes adicionales surgió porque con las prácticas tradicionales de curado se planteaban problemas con el color de los productos. Como ejemplos de estas sustancias coadyuvantes del curado pueden citarse al ácido ascórbico, ácido isoascórbico y sus sales respectivas, estos aditivos no presentan un límite de cantidad residual en el Código Alimentario Argentino.

El ácido ascórbico y sus derivados son particularmente útiles para mejorar y retener el color de los productos curados de carne. Estos aditivos son usados como aceleradores del curado.

El ácido ascórbico o sus sales tienen tres principales beneficios: a) reduce el tiempo de curado, b) produce una coloración más uniforme sobre el

Capítulo 1: Introducción

producto terminado, c) mejora el color y sabor los cuales pueden ser mantenidos durante su almacenamiento (Hui, 2001).

1.6.2.5.3.1 Funciones

Las funciones básicas en su aplicación durante la fabricación de embutidos derivan de su comportamiento químico como potente reductor. En primer lugar, se destaca su actuación como reductor frente al nitrito. El ascorbato ayuda a acelerar la conversión del nitrito y/o nitrato a óxido nitroso facilitando la formación de nitrosomioglobina y, por lo tanto, acelerando la formación del color rosado (Mundo lácteo y cárnico, 2004).

La reacción de ácido ascórbico o ascorbato con el ácido nítrico (Nacameh, 2008) se muestra a continuación:

Sin la presencia de ascorbato, esta reacción se produciría de la misma forma, por la acción de los reductores naturales presentes en la carne, pero exigiría tiempo de maduración muchos más largos y cantidades de nitrito muy superiores, para obtener un color satisfactorio. Puede comprobarse fácilmente por análisis, que los niveles de nitritos residuales en el producto terminado son mucho más bajos si se emplea ascorbato en la formulación.

En segundo lugar, el ascorbato contribuye decisivamente a la estabilidad del color. Esto puede atribuirse a sus propiedades reductoras (efecto antioxidante), que inhiben la formación de radicales peróxidos en la superficie, por acción de la luz ultravioleta y el oxígeno del aire. Adicionalmente su efecto acelerador de la formación de óxido nitroso

Capítulo 1: Introducción

contribuya a retardar la descomposición del pigmento, por simple desplazamiento del equilibrio de esta reacción, que se produce con liberación de óxido nítrico. Por último, contribuye también a evitar la formación de las nitrosaminas cancerígenas, bloqueando la formación de agentes nitrosantes (N_2O_3) a partir del óxido nítrico (Mundo lácteo y cárnico, 2004).

También el ácido ascórbico acelera la reacción del curado al reducir la metamioglobina a mioglobina. Sin embargo, puesto que en determinadas condiciones el nitrito y el ácido ascórbico reaccionan químicamente entre sí, es posible que su acción principal se deba a que aumenta la producción de óxido nítrico, dando una cantidad superior a la que normalmente se obtendría del ácido nítrico.

El ácido ascórbico es particularmente eficaz en la estabilización del color del curado cuando se usa en combinación con el envasado al vacío de los productos cárnicos curados y térmicamente procesados.

Capítulo 1: Introducción

1.7. . Objetivos de la Tesis

1.7.1 Generales

El objetivo general de la Tesis es analizar el efecto de tratamientos no térmicos (Ozono gaseoso y Alta Presión Hidrostática) sobre las características fisicoquímicas y parámetros de calidad de carnes y desarrollar nuevos productos de interés industrial.

1.7.2 Objetivos específicos:

- Analizar el efecto del tiempo de exposición al ozono gaseoso, en concentraciones comprendidas entre 218-286 mg O₃/m³, sobre las características fisicoquímicas y recuentos microbianos de heterótrofos totales y de *Listeria monocytogenes* inoculada en muestras de carnes bovina comparándolos en todos los casos con los controles sin ozonizar. Entre las características fisicoquímicas se analizarán los cambios producidos en la coloración superficial, medidos a través de un Colorímetro triestímulo (Minolta CR 300) y la rancidez de las carnes (determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS))

- Desarrollar un producto cárneo a partir de la combinación de un rápido proceso de inmersión en soluciones salinas utilizando la menor concentración posible de nitrito y cloruro de sodio con un proceso posterior de alta presión hidrostática (APH) del producto envasado.

- Optimizar el proceso de inmersión, analizando el efecto de la formulación del tratamiento químico previo (cloruro de sodio, nitrito de sodio, ácido ascórbico) y los tiempos de inmersión en los atributos de calidad (color, textura, recuentos microbianos)

- Analizar el efecto del tratamiento de alta presión (100-600 MPa, a temperatura ambiente) sobre: i) la estabilidad del color de la carne tratada

Capítulo 1: Introducción

(colorimetría y reflectancia difusa); ii) la textura; iii) la estabilidad oxidativa.

-Analizar mediante reflectancia difusa las especies químicas derivadas de la mioglobina responsables de los cambios de coloración en el tratamiento por altas presiones.

-Evaluar el grado de desnaturalización proteica producida tanto por el tratamiento químico y las altas presiones mediante Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) y por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

-Determinar la vida útil del producto a través de determinaciones microbiológicas mediante el recuento de bacterias presentes en la muestra (bacterias ácido lácticas, mesófilas, psicotrofas, enterobacterias, hongos y levaduras)

-Estudiar el efecto del tratamiento de alta presión sobre microorganismos patógenos (*Listeria monocytogenes*) y utilizar un modelo matemático que permita predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos bajo determinadas condiciones ambientales.

CAPÍTULO 2:

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.1 Materia prima

Para la elaboración de los productos se utilizó un corte magro de origen vacuno, cortes de cuartos trasero “nalga”, adquirida en un comercio local. Este corte está descripto bajo el código 2464 del nomenclador oficial argentino de los cortes de carnes vacunas (IPCVA, 2011) como nalga de adentro sin tapa. A partir de la nalga de adentro completa (Código 2463), se separan, cortando a través del tejido conectivo intermuscular, los músculos recto interno (gracilis), sartorio y pectíneo. En consecuencia, el corte queda integrado por los músculos *aductor femoris* y *semimembranoso*. Se extrajeron completamente los depósitos de grasa. Los músculos se separaron luego de 48 h post mortem.

Figura 2.1: Nalga de adentro sin tapa

El tejido cárneo fue cortado en rebanadas delgadas de 3 mm de espesor de las cuales se extrajeron discos de 6 cm de diámetro, con un sacabocado previamente desinfectado con alcohol 70% al igual que la tabla de apoyo y los utensilios utilizados para manipular la carne. Los discos se mantuvieron cubiertos con papel aluminio mientras que fueron cortados para evitar que se oscureciera la carne debido al oxígeno. Se obtuvieron, en promedio, dos discos por rodaja de carne, evitando utilizar la superficie, para disminuir la carga microbiana inicial.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.2 Caracterización de la materia prima

2.2.1 Análisis de composición centesimal del tejido cárneo

Se determinó el contenido inicial de humedad, proteínas y lípidos según los métodos AOAC (1984) en la carne fresca. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

2.2.1.1 Humedad (método 24.002, AOAC, 1984)

Se pesaron 5 g de muestra y secaron en estufa con vacío a 100-105 °C hasta llegar a peso constante. El porcentaje de humedad se expresó como g agua/100 g producto.

2.2.1.2 Ceniza (método 24.009, AOAC, 1984)

Se pesaron aproximadamente 0.8-1 gramos de muestra en cápsulas de porcelana y se carbonizaron sobre mechero. Luego se calcinó en mufla a 550 °C hasta cenizas blanca grisáceas. Al concluir el programa de calcinación las muestras se dejaron enfriar en desecador hasta llegar a temperatura ambiente antes de realizar la pesada. El contenido de cenizas se expresó como g ceniza/100 g producto.

2.2.1.3 Proteínas (método 24.027, AOAC, 1984)

Se determinó el contenido de proteína total mediante el método de Kjeldahl en equipo digestor Büchi k-435 y destilador semiautomático Büchi k-350 (Büchi, Suiza).

Se pesaron aproximadamente 0.5 g de muestra y se colocaron en un tubo de digestión con 4 g de mezcla catalizadora (10:1 K₂SO₄, CuSO₄.5H₂O) y 15 ml de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se calentó primero suavemente hasta que cesó el desprendimiento de espuma y luego enérgicamente hasta completar la digestión de la materia orgánica (color azul verdoso translucido), se dejó enfriar. El tubo se conectó al refrigerante del equipo destilador y se colocó en el tubo colector un erlenmeyer con 50 ml de H₃BO₃

Capítulo 2: Materiales y Métodos

4% e indicador Mortimer (rojo de metilo, verde de bromocresol) para recoger el NH₃ destilado. Se agregó cuidadosamente agua y NaOH 32% hasta que la solución tomó color marrón indicando la neutralización del ácido y exceso de base. Se destiló hasta alcanzar 150 ml en el erlenmeyer colector. El destilado se tituló lentamente con agitación constante con H₂SO₄ 0.065N hasta que el indicador viró a su color original (naranja). Se realizó en similares condiciones un blanco de reactivos sin muestra agregada.

Se utilizó el factor de conversión 6.25 g proteína/g N para calcular el porcentaje de proteínas de la muestra, mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{Proteína} = \frac{(\text{vol muestra} - \text{vol blanco}) \times N \text{ ácido} \times 0.014 \times 6.25 \times 100}{\text{g muestra}} \quad \text{Eq 2.1}$$

Se realizó por duplicado y se expresó el resultado en g proteínas/100 g producto.

2.2.1.4 Lípidos (método 24.005, AOAC, 1984)

Se determinó el contenido de lípidos por el método de Soxhlet; los ensayos se realizaron por duplicado. Se colocaron 4 g de muestra, previamente mezclado con Na₂SO₄ anhidro, en un cartucho de papel de filtro que fue colocado en el tubo extractor del equipo. Se agregó el solvente (éter etílico, EE, Peb: 35-60 °C) y se conectó al refrigerante. La extracción a reflujo se realizó durante 2 h sobre manta calefactora. Una vez finalizada, se evaporó el solvente y se obtuvo el extracto etéreo (lípidos de la muestra) en el balón.

El resultado se expresó como g de lípidos solubles en EE/100 g producto.

2.2.2 pH

El pH de la carne se determinó por duplicado mediante un electrodo de vidrio de inserción (Cole Palmer, cat u-05998-20) conectado a un pHmetro (Hach Sension pH 3, Loveland USA).

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Para la medición se utilizaron muestras de carne fresca, sin tratar, obtenidas luego de preparar los discos cárneos.

Figura 2.2.: Medición de pH en carne fresca

2.3 Color

2.3.1 Determinación de color superficial

Se realizaron en todos los ensayos mediciones de color superficial.

Procedimiento

Las medidas de color se llevaron a cabo con un colorímetro triestímulo Minolta CR-400 (Minolta CR-400, Minolta Corp Ronsey, New Jersey, USA). Este equipo es un analizador compacto triestímulo del color reflejado por superficies, el cual consta del respectivo cabezal de medida (área de medición de mm de diámetro) y un procesador de datos DP-301.

El color, en escala CIE Lab* (Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), 1931) es descripto a través de los parámetros de **luminosidad L^*** y de **cromaticidad a^* y b^*** . El parámetro L^* varía desde 100 para un blanco perfecto y 0 para el negro, a^* representa rojo cuando es positivo y verde cuando es negativo, y b^* representa amarillo cuando es positivo y azul cuando es negativo, como puede observarse en la **Figura 2.3**.

Figura 2.3: Diagrama en el cual se observan la variación en la escala de color CIE Lab* descrito por los parámetros de luminosidad L^* y de cromaticidad a^* y b^* .

Figura 2.4: Colorímetro Minolta triestímulo.

Se realizaron las mediciones sobre la carne sin ningún tratamiento. Además, se midieron las muestras que fueron sometidas al tratamiento con ozono gaseoso, las muestras que estuvieron sumergidas en las distintas soluciones durante 2.5 h y por último con el fin de verificar si los parámetros L^* , a^* y b^* se mantienen aceptables luego del tratamiento de alta presión hidrostática, se determinó el color en las muestras sumergidas en las distintas soluciones y sometidas a las diferentes presiones. Las determinaciones se efectuaron sobre ambas caras de los discos de carne; en

Capítulo 2: Materiales y Métodos

el caso de las muestras envasadas al vacío se realizó luego que estos se expusieron de ambos lados al aire durante 10 minutos. Se realizaron 3 medidas por cada cara de las muestras, y triplicados por cada condición. Durante todas las mediciones las muestras se colocaron de manera tal que las fibras musculares estuvieran siempre en dirección paralela al visor del colorímetro.

2.3.2 Reflectancia difusa

Los estudios de color se complementaron con la determinación de los espectros de reflectancia difusa que fueron obtenidos en un espectrofotómetro UV-visible de doble haz marca PG Instruments modelo T90+, equipado con accesorio de esfera integradora perteneciente al INIFTA (CONICET, UNLP). Se interpuso una placa de cuarzo (2 mm de espesor) entre las muestras y la esfera para evitar la contaminación de la misma, utilizándose BaSO_4 con la misma placa como referencia del 100% de reflectancia.

Detalles de la aplicación de esta técnica se describen en la Sección 6.4 del Capítulo 6.

Figura 2.5: Espectrofotómetro UV-visible de doble haz

Figura 2.6: Esfera integradora

2.4 Análisis de textura

El objetivo de esta determinación es evaluar los efectos de la aplicación de altas presiones hidrostáticas, del tratamiento con ozono y el tiempo de almacenamiento de los productos tratados con estas tecnologías sobre la textura de la carne.

La resistencia del producto a la compresión se determinó en un texturómetro TAXT2i Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Reino Unido) a 20 °C.

Se realizó un ensayo de compresión empleando la sonda Volodkevich (HDP/VB). Esta sonda permite simular la mordedura de un alimento con los incisivos (Wen-Ching *et al.*, 2007), lo que corresponde al primer contacto de una rodaja de carne con la boca. Se determinó en cada caso la fuerza máxima alcanzada cuando se realizó una compresión hasta el 30% del espécimen. Se realizaron tres compresiones por muestra, siendo realizados triplicados de cada condición.

Figura 2.7: Texturómetro TA-xT2i Texture Analyser

2.5 Exudado

El análisis del exudado se realizó con el fin de estudiar el efecto de las altas presiones sobre la pérdida de agua y analizar su relación con la textura.

Se determinó para cada condición la cantidad de líquido exudado por duplicado tomando dos envases independientes almacenados al vacío a 4°C, a distintos tiempos. Las muestras de carne fueron retiradas del envase, secadas cuidadosamente con papel absorbente para eliminar el líquido que pudiese haber quedado en la superficie de las mismas y pesadas (m_t). El peso inicial de las muestras fue tomado previo al tratamiento de APH (m_0). El exudado a los diferentes tiempos de almacenamiento se calculó como la pérdida de peso (%) respecto al peso inicial, (m_0).

$$E = \left\{ \frac{m_0 - m_t}{m_0} \right\} \times 100 \quad \text{Eq. 2.2}$$

Donde:

E = líquido exudado en g/100g de muestra.

m_0 = masa de la muestra previo al tratamiento (g)

Capítulo 2: Materiales y Métodos

m_t = masa de la muestra al tiempo “t” del almacenamiento (g)

2.6 Actividad acuosa

Se sabe que la calidad microbiológica de un alimento depende de la actividad acuosa del mismo, por lo que se midió la a_w de las muestras durante su almacenamiento para evaluar el efecto del tiempo y la presión del tratamiento de APH sobre esta característica y su influencia con el desarrollo microbiano.

Se utilizó un equipo Aqua Lab serie 4TE (Decagon Devices, USA) **Figura 2.8** calibrado con una solución de NaCl ($a_w = 0.75 \pm 0.005$) y agua bidestilada ($a_w = 1$). El equipo utiliza la técnica de punto de rocío por condensación sobre un espejo sometido a enfriamiento controlado eléctricamente basado en el efecto Peltier. Las medidas fueron realizadas a 25 °C por duplicado.

Figura 2.8: Equipo Aqualab serie 4TE

2.7 Oxidación lipídica

La cuantificación de la oxidación lipídica depende del método instrumental utilizado para su medición. En los productos cárnicos se recomiendan evaluar resultados basados en pruebas sensoriales, sin embargo, esta técnica es costosa y consume mucho tiempo. La selección de la

Capítulo 2: Materiales y Métodos

metodología de detección de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) se basa en resultados de Yang y col. (2002) que informaron de una correlación altamente significativa entre estas sustancias (TBARS) y las determinaciones sensoriales.

Para la determinación de la oxidación lipídica en los productos se cuantificaron entonces las TBARS (Tironi, y col., 2007, Andrés y col. 2012). La reacción se basa en la extracción con ácido tricloroacético de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) como el malonaldehído (MDA) u otros compuestos similares y la posterior formación de un aducto de color rosado entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malonaldehído (**Figura 2.9**).

Figura 2.9: Reacción entre el MDA y el TBA en el ensayo de cuantificación de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico.

Este análisis se realizó por cuadruplicado sobre 2 g de cada muestra tomada a diferentes tiempos durante el almacenamiento refrigerado para las muestras tratadas con APH y para las muestras Ozonizadas se realizó en las diferentes condicione de tratamientos. Para precipitar las proteínas y solubilizar las TBARS presentes en la muestra se usó utilizó 15 ml de ácido

Capítulo 2: Materiales y Métodos

tricloroacético (TCA) 12 g/100g y se mantuvo con agitación constante en baño de agua-hielo durante 30 minutos. Luego se filtró por papel. Se tomaron 2 ml de filtrado y se colocaron en un tubo con 2 ml de reactivo TBA 0.5 g/100g (preparado en agua el día de uso y sonicado 30 minutos para facilitar su solubilización), dejando reaccionar en baño termostático a 70 °C durante 30 minutos. Luego, se enfrió bajo canilla y se midió la absorbancia a 532 nm (A532) en un espectrofotómetro Hach DR-2800 (Hach Company, EE.UU.). Para ajustar el valor de A532 = 0 se realizó un blanco conteniendo 2 ml de la solución de TCA y 2 ml de la solución de TBA. Las TBARS se expresaron como mg de malonaldehído (MDA)/g producto, según la Eq. 2.3:

$$\text{N}^{\circ} \text{ TBARS} = \frac{M \times V_e \times 1000 \times A_{532}}{E \times L \times m} \quad \text{Eq. 2.3}$$

Donde:

M = masa molecular del malonaldehído (72g)

Ve = volumen extracto (15 mL)

E = coeficiente de extinción molar del complejo coloreado (1.56×10^5 / M cm).

L = camino óptico (1 cm)

m = masa de muestra (g)

2.8 Determinaciones analíticas

Para poder cumplimentar con los objetivos del trabajo de Tesis se propusieron diferentes formulaciones de soluciones de inmersión utilizadas previo al tratamiento de APH que incluían diversos aditivos y se analizaron los efectos de la composición de dicha solución y del tratamiento de altas presiones sobre diferentes propiedades como parámetros de color, textura, desnaturalización de proteínas, etc. Las soluciones de inmersión contenían esencialmente cloruro de sodio y nitrito, por lo cual sus concentraciones en el producto cárneo tuvieron que ser determinadas analíticamente.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.8.1 Determinación analítica de nitrito

La cuantificación de nitrito de sodio en el tejido cárneo es imprescindible ya que se debe verificar que la misma no supere los límites permitidos según el Código Alimentario Argentino, artículo 284, (menor a 0.15 g / kg) o 200 ppm (0.2 g / kg) según la USDA (USDA-FSIS 1999).

Procedimiento

El tejido cárneo, entre 12 y 13 g, fue homogeneizado con agua bidestilada a 90 °C utilizando un mixer manual (Minipimer Braun), siguiendo la técnica utilizado por Graiver et al., 2006.

Se agitó la suspensión durante 10 minutos, se llevó a 500 ml con agua bidestilada en un matraz aforado, se filtró con papel de filtro mediano y se hicieron las diluciones necesarias. Una vez realizadas estas diluciones, se tomaron 10 ml de la solución final y se le agregó el reactivo Hach, (método 371, kit Nitriver 3 de determinación de nitrito en agua, compuesto por: sal trisódica del ácido 1,2 ciclohexandiamintetraacético, sal sódica del ácido 4,5 dihidroxi 2,7 naftalendisulfónico, fosfato de potasio monobásico, piro sulfato de potasio y sulfanilato de sodio). Se dejó reaccionar 15 minutos y se midió la concentración de nitrito sódico a 507 nm en un espectrofotómetro Hach (Modelo DR/2000), utilizando como blanco la solución sin reactivo. Los resultados se expresaron como: g NaNO₂/g tejido.

La reacción colorimétrica se basa en una propiedad que tiene la sal de diazonio (formada por la reacción entre el ácido nitroso y el ácido sulfanílico) de dar un colorante azoico por unión con una amina aromática en medio ácido (reacción de Griess) o con un fenol en medio ligeramente básico (reacción de Zambelli) (**Figura 2.10**). El color rosa de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de nitrito presente en la muestra (Girard, 1991).

En la puesta a punto del método, se inyectaron diferentes cantidades conocidas de nitrito de sodio a la carne, procediendo luego a extraer y valorar el nitrito de la manera ya descripta. La recuperación fue del 98%.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

También se verificó la calibración del espectrofotómetro con muestras de concentración conocidas.

Esta determinación nos permitió verificar que con las concentraciones de nitrito que usamos en las soluciones de inmersión obtengamos un producto con las cantidades adecuadas de nitrito remanente.

Figura 2.10: Formación de un colorante azoico por la reacción entre el ácido nitroso y el ácido sulfanílico con una 1-naftol, en medio ligeramente básico.

(Reacción de Zambelli).

2.8.2 Determinación del contenido de cloruro de sodio en el tejido cárneo

Se cuantificó el contenido de cloruro de sodio con el fin de verificar que la cantidad de dicha sal incorporada a las muestras sea la adecuada para este tipo de productos, en los cuales no es conveniente que contengan un alto contenido de cloruro de sodio.

Procedimiento

Para dosar la cantidad de NaCl presente en las muestras luego de cada período de inmersión, entre 12 y 13 g por muestra de tejido cárneo fue homogeneizado con agua bidestilada a $90\text{ }^\circ\text{C}$ utilizando un mixer manual

Capítulo 2: Materiales y Métodos

(Minipimer Braun), la suspensión se agitó durante 10 minutos, se llevó a 500 ml y se hicieron las diluciones necesarias y se filtró. El contenido de cloruro fue determinado en una alícuota de 100 ml utilizando un electrodo selectivo de cloruro (Cole-Parmer 27502-12) previamente calibrado. Los resultados se expresaron como mg NaCl/ g tejido.

Diariamente se preparó una curva de calibración del electrodo, para lo cual se utilizaron soluciones patrones de NaCl de 10, 100, 250, 500 y 1000 ppm, utilizando replicados. En la Figura 2.11 se observa una curva típica.

Figura 2.11: Curva de calibración típica del electrodo selectivo para cloruro.

Para asegurar que todas las muestras y las soluciones patrones tuviesen la misma fuerza iónica se les agregó, previo a la medición, 2 ml de una solución de NaNO_3 5M a 100 ml de la muestra o estándar, ajustando así la fuerza iónica a 0.1 M. Las medidas se realizaron con una agitación suave y constante.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

En los ensayos preliminares, se inyectaron cantidades conocidas de NaCl a la carne, procediendo luego a extraer y valorar el cloruro de la manera citada anteriormente, obteniéndose una recuperación promedio de 95 %.

2.9 Calorimetría diferencia de barrido

Las técnicas de Calorimetría Diferencial de Barrido (del acrónimo inglés DCS, Differential Scanning Calorimetry) miden la diferencia de temperatura entre una muestra y una referencia interna en función del tiempo y de la temperatura. La diferencia de temperatura observada se traduce en un flujo de calor. Esto permite medir transiciones endotérmicas y exotérmicas en función de dicha temperatura.

En la técnica experimental de Calorimetría Diferencial de Barrido se dispone de dos cápsulas. Una de ellas contiene la muestra a analizar y la otra está generalmente vacía y es la llamada cápsula de referencia. Se usan calefactores individuales para cada cápsula y un sistema de control comprueba si se producen diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia. Si se detecta cualquier diferencia, los calefactores individuales se corregirán de tal manera que la temperatura se mantendrá igual en ambas cápsulas. Es decir, cuando tiene lugar un proceso exotérmico o endotérmico, el instrumento compensa la energía necesaria para mantener la misma temperatura en ambas cápsulas (Suriñach, 1992).

Esta técnica fue utilizada para medir el grado de desnaturalización proteica producida por los procesos utilizados.

Procedimiento

La calorimetría diferencial de barrido se realizó en el equipo DSC Q100 controlada por TA 5000 module (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA, **Figura 2.12**).

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Se obtuvieron muestras de 9-10 mg que fueron colocadas en cápsulas de aluminio y selladas herméticamente. Se aseguró un buen contacto entre la muestra y el fondo de la cápsula. Se empleó una velocidad de calentamiento en el DSC de 10 °C/min en el rango de 20 a 100 °C utilizando como referencia una cápsula vacía. Luego de cada corrida del DSC las cápsulas fueron perforadas y se determinó el peso seco de las muestras por secado de las mismas en estufa a 105 °C hasta peso constante. De los termogramas obtenidos se evaluaron los cambios de entalpía total. Cada ensayo fue realizado utilizando al menos cuatro muestras.

Figura 2.12: Equipo de calorimetría diferencial de barrido.

2.10 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La técnica de Espectroscopía de Infrarrojo permite la identificación de los grupos funcionales de un compuesto. Esto debido a que cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, la vibración intramolecular con frecuencia igual a la de la radiación, aumenta en intensidad, lo que genera señales con frecuencias que corresponden a la vibración de un enlace específico.

Esta técnica utiliza la radiación del espectro electromagnético cuya longitud de onda (λ) está comprendida entre los 800 y los 400000 nm (0.8 y 400 μ 1 μ = 10^{-4} cm) y su efecto sobre la materia orgánica es producir

Capítulo 2: Materiales y Métodos

deformaciones de los enlaces de la sustancia. Debido a su gran amplitud se suele dividir en tres zonas:

El IR medio es el normalmente utilizado experimentalmente en determinación estructural (2.5 - 16 μ). Debido a consideraciones de tipo histórico la unidad más usada en la espectroscopia infrarroja no es la longitud de onda (λ) sino el número de onda ($\nu = 1/\lambda \text{ cm}^{-1}$), correspondiendo el IR medio a la zona comprendida entre 4000 y 625 cm^{-1} .

El aspecto típico de un espectro IR en transmitancia es el que se muestra en la **Figura 2.13**.

Figura 2.13: Espectros de absorción IR.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Cada absorción observable en el espectro corresponde a una vibración determinada de algún enlace dentro de la molécula.

Modo de vibración de los enlaces: Hay diferentes modos normales de vibración en las moléculas, estos llevan asociado un movimiento característico de los átomos, los principales son las deformaciones de enlace, ángulos de valencia, ángulos diedros, deformaciones fuera del plano, etc.

Deformación de enlace: En una molécula con n átomos deben aparecer $3n-6$ bandas de tensión y flexión ($3n-5$ cuando la molécula es lineal); de todas ellas solo darán una banda observable en el IR aquellas vibraciones que produzcan un cambio en el momento dipolar (las vibraciones simétricas no aparecen en el IR, pero se podrían observar en la espectroscopia Raman). Las frecuencias de vibración de los diferentes enlaces en una molécula dependen de la masa de los átomos involucrados y de la fuerza de unión entre ellos. En términos generales las vibraciones pueden ser de dos tipos: estiramiento y flexión. Las vibraciones de estiramiento son aquellas en las que los átomos de un enlace oscilan alargando y acortando la distancia del mismo sin modificar el eje ni el ángulo de enlace.

Las vibraciones de flexión son aquellas que modifican continuamente el ángulo de enlace. + - se refieren a vibraciones perpendiculares al plano del papel.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

A la hora de identificar los grupos funcionales con la espectroscopia IR vamos a considerar el espectro de IR dividido en varias zonas tal y como se muestra en la siguiente figura.

Figura 2.14: Espectro IR con zonas delimitadas correspondientes a los distintos grupos que absorben a determinados números de onda.

Se pueden observar las siguientes zonas: de 4000 a 2900 cm^{-1} (Tensión de C-H, O-H y N-H); de 2500 a 2000 cm^{-1} (tensión de triples enlaces y dobles enlaces acumulados); de 2000 a 1500 cm^{-1} (tensión de C=O, C=N y C=C) y de 1500 a 600 cm^{-1} (Flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc.).

De acuerdo con dicha división se podrán identificar diversos grupos funcionales, tal y como se indica en la siguiente tabla.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Tabla 2.1: Valores de banda de absorción de IR y los movimientos vibracionales que las provocan en los enlaces moleculares de mayor interés biológico.

Grupo funcional	Numero de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Numero de onda (cm ⁻¹)
OH (enlace de hidrógeno)	3100-3200	-C $\equiv$ C-	2300-2100
OH (sin enlace de hidrógeno)	3600	-C $\equiv$ N	~ 2250
Cetonas	1725-1700	-N=C=O	~ 2270
Aldehídos	1740-1720	-N=C=S	~ 2150
Aldehídos y cetonas α,β -insaturados	1715-1660	C=C=C	~ 1950
Ciclopentanonas	1750-1740	NH	3500-3300
Ciclobutanonas	1780-1760	C=N-	1690-1480
Ácidos carboxílicos	1725-1700	NO ₂	1650-1500 1400-1250
Esteres	1750-1735	S=O	1070-1010
Esteres α,β -insaturados	1750-1715	sulfonas	1350-1300 1150-1100
δ -Lactonas	1750-1735	Sulfonamidas y sulfonatos	1370-1300 1180-1140
γ -lactonas	1780-1760	C-F	1400-1000
Amidas	1690-1630	C-Cl	780-580
-COCl	1815-1785	C-Br	800-560
Anhidridos	1850-1740 ⁽²⁾	C-I	600-500

Para evaluar el grado de desnaturalización proteica producida tanto por las altas presiones, como por los aditivos químicos se utilizó Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier.

Los espectros FTIR de las muestras de carne se registraron utilizando un Espectrómetro infrarrojo Nicolet™ iS™10, Thermo Scientific™,

Capítulo 2: Materiales y Métodos

(Madison, USA) equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) de diamante, **Figura 2.15**. El análisis se realizó a temperatura ambiente.

Figura 2.15: Espectrómetro infrarrojo

Durante la realización del trabajo se estableció un ensayo base para asegurar la repetibilidad del método de medida.

Un parámetro importante a tener en cuenta en las especificaciones del ensayo es la resolución espectral, es decir, la distancia existente entre puntos del espectro. Cuanto más pequeña es esta distancia, mayor número de puntos espectrales y por lo tanto, mayor calidad del espectro se obtiene. Sin embargo, para asegurar un buen nivel de señal a ruido se necesita un mayor número de escaneos y por tanto aumenta el tiempo de medida. Para obtener un equilibrio entre una resolución adecuada al rango de medida y un tiempo de escaneo razonable la resolución elegida fue de 4 cm^{-1} y el número de escaneos se fijó en 32. Por otro lado, en el proceso de medida siempre se toma un espectro de referencia en vacío para eliminar la interferencia de fondo. A continuación, se mide la muestra y el software Omnic 8 (Thermo Scientific™, Madison, USA) del equipo se encarga de hacer la división entre el espectro de la muestra y la referencia para la obtención final del espectro en transmitancia. Mediante software, se puede pasar el espectro a absorbancia y hacer una corrección de la línea base.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Uno de los inconvenientes que surgen cuando se quieren interpretar los espectros FTIR, es el solapamiento de las bandas que se producen en las diferentes longitudes de onda, causadas por la absorción de la radiación, a determinadas frecuencias, por los diferentes enlaces moleculares que vibran a esas mismas frecuencias. La suma de todas estas bandas forma el espectro compuesto. Una de las técnicas que permite visualizar las bandas que componen el espectro compuesto es la deconvolución de Fourier (FSD). Se realizó la deconvolución en la región de la amida I (1600-1700 cm^{-1}) para poder identificar las estructuras secundarias presentes en las proteínas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.11 Microscopía electrónica de barrido ambiental

Para observar la microestructura de un tejido cárneo se pueden utilizar diferentes técnicas de microscopía. En un microscopio óptico la potencia amplificadora está limitada por la longitud de onda de la luz visible. El microscopio electrónico, en cambio, utiliza electrones para iluminar un objeto. Dado que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz pueden mostrar estructuras más pequeñas. La longitud de onda de los electrones que se utilizan en los microscopios electrónicos es de alrededor de 0.5 ángstrom.

Se emplearon técnicas de visualización microscópica para estudiar las posibles variaciones de la microestructura de la carne debidas a las posibles modificaciones de las proteínas cárnicas producidas por el pre-tratamiento con aditivos químicos y posterior aplicación de APH, empleando un microscopio electrónico de barrido (FEI-Quanta 200, Hillsboro, Oregon, EE.UU. **Figura 2.16**).

Se tomaron pequeños trozos del centro de los discos de carne de aproximadamente 0.3 cm de espesor. Se observaron las muestras empleando microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM): técnica microscópica

Capítulo 2: Materiales y Métodos

que permite la observación de la muestra en su estado natural, sin ningún tratamiento previo.

Figura 2.16: Microscopio FEI-Quanta 200.

2.12 Recuentos microbianos

Se realizaron recuentos microbianos a las muestras con el tratamiento de curado y a las muestras curadas y tratadas con APH, ambas refrigeradas a 4°C a diferentes tiempos de almacenamiento, así como también a la carne sin tratamiento, a fin de controlar la inocuidad microbiológica del producto lograda con el tratamiento de alta presión hidrostática y además determinar la vida útil del producto durante el almacenamiento refrigerado.

Procedimiento

Se tomaron 10 g de muestra y se homogeneizaron con 90 ml de peptona 0.1 g/100 ml en Stomacher 400 (Seward, USA) durante 120 segundos a velocidad máxima. En flujo laminar se realizaron diluciones seriadas de las diferentes muestras en tubos con peptona 0.1 g/100 ml (**Figura 2.17**) y luego las diluciones fueron sembradas en profundidad (**Figura 2.18**) en los medios de cultivos detallados en el siguiente punto, con

Capítulo 2: Materiales y Métodos

el objetivo de determinar de manera diferenciada distintos microorganismos.

Figura 2.17: Esquema de diluciones seriadas.

Figura 2.18: Equipo de flujo laminar.

Medios de cultivo

Plate Count Agar (PCA, Oxoid) Para recuento de microorganismos totales o psicrótrofos.

Peptona de caseína	5 g/l
Extracto de levadura	2.5 g/l
Glucosa	1 g/l
Agar	14 g/l
pH	7.0±0.2

Se autoclavó a 121°C durante 15 minutos.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

La incubación se realizó a 30°C durante 48 h para recuento de microorganismos totales y a 4°C durante 5 días para el recuento de microorganismos psicrótrofos.

Agar Cloroanfenicol, Extracto de levadura, Glucosa (YGC) Para recuento de hongos y levaduras.

Extracto de levadura	2.5 g/l
Glucosa	1 g/l
Agar	14 g/l
Cróránfenicol	0.1g/l

Se autoclavó a 121°C durante 15 minutos.

La incubación se realizó a 25-30°C durante 5 días.

Agar de Man Rogosa and Sharpe (M.R.S) (Oxoid) Para recuento de *Lactobacillus* sp.

Peptona universal	10 g/l
Extracto de carne	5 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
D (+) Glucosa	20 g/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l
Citrato Acido de Amonio	2 g/l
Tween 80	1 g/l
Acetato de Sodio	5 g/l
MgSO ₄	0.1 g/l
MnSO ₄	0.05 g/l
Agar	12 g/l
pH	6.5±0.1

La incubación se realizó bajo condiciones anaeróbicas a 30°C, durante 48 h.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Agar Bilis Roja Violeta Glucosa (ABRV) Para el recuento de Enterobacteriaceae.

Peptona de carne	7 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
ClNa	5 g/l
D-(+)Glucosa	10 g/l
Sales Biliares	1.5 g/l
Rojo Neutro	0.03 g/l
Cristal Violeta	0.002 g/l
Agar	13 g/l
pH	7.3 ± 0.2

Se esterilizó a vapor fluente (B.M) media hora. La incubación se realizó a 37°C, durante 24 h.

Los resultados obtenidos en los diferentes medios fueron expresados como log UFC/g de muestra para los diferentes microorganismos analizados.

2.13 Inoculación y supervivencia de *Listeria monocytogenes*

Se realizaron ensayos con muestras que fueron inoculadas con *Listeria monocytogenes* cepa L261 (cultivo provisto por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP).

Inicialmente se realizó la activación de la cepa, para ello se descongelaron las mismas, se tomó 1 ml del cultivo y se sembró en un tubo con TSB (caldo triptona soja), se incubó por 24 h a 37 °C. Al día siguiente, se tomó 1 ml del caldo crecido y se sembró nuevamente en un tubo con TSB. Se realizaron 3 repiques.

Se inoculó cada muestra de forma individual con 100 µl de un cultivo de 24 h de *Listeria monocytogenes*. Se ensayaron 3 concentraciones de inóculo 10³, 10⁵ y 10⁷ UFC/ml. Luego las muestras fueron sometidas a

Capítulo 2: Materiales y Métodos

tratamientos no térmicos (ozono y APH). En el caso de APH antes de inocular las muestras éstas fueron tratadas con preservadores químicos y luego de la inoculación se envasaron al vacío.

Se analizó semanalmente por duplicado el desarrollo microbiano de *L. monocytogenes* en las muestras mediante recuento en placa (medio PALCAM) agar PALCAM.

Columbia Agar Base	39.0 g/l
D-Glucosa	0.5 g/l
D-Manitol	10.0 g/l
Esculina	0.8 g/l
Citrato de Hierro y amonio	0.5 g/l
Rojo fenol	0.08 g/l
Cloruro de litio	15.0 g/l
pH final	7.2 ±0.2

Se suspendió 33 g de polvo en 500 ml de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Luego se enfrió a 50 °C y agrego asépticamente el contenido de un vial Suplemento Selectivo para PALCAM Agar base que contiene, polimixina B, acriflavina y ceftazidima, reconstituido según instrucciones. Homogeneizó y distribuyó en placas de Petri estériles.

Se sembraron las muestras y se incubaron las placas durante 24-48 h a 37 °C. Se utilizó para los ensayos microbiológicos carne fresca inoculada como control.

2.14 Análisis sensorial

Las pruebas sensoriales pueden describirse o clasificarse de diferentes formas. Los expertos en estadística las clasifican en pruebas paramétricas y no-paramétricas, de acuerdo al tipo de datos obtenidos con la prueba.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Los especialistas en pruebas sensoriales y los científicos de alimentos clasifican las pruebas en afectivas (orientadas al consumidor) y analíticas (orientadas al producto), en base al objetivo de la prueba.

Las pruebas empleadas para evaluar la preferencia, aceptabilidad o grado en que gustan los productos alimentarios se conocen como "pruebas orientadas al consumidor". Las empleadas para determinar las diferencias entre productos o para medir características sensoriales se conocen como "pruebas orientadas al producto".

Las pruebas orientadas al consumidor incluyen las pruebas de preferencia, pruebas de aceptabilidad y pruebas hedónicas (grado en que gusta un producto). Estas pruebas se consideran pruebas del consumidor, ya que se llevan a cabo con paneles de consumidores no entrenados. Aunque a los panelistas se les puede pedir que indiquen directamente su satisfacción, preferencia o aceptación de un producto, a menudo se emplean pruebas hedónicas para medir indirectamente el grado de preferencia o aceptabilidad.

Las pruebas orientadas a los productos, utilizadas comúnmente en los laboratorios de alimentos, incluyen las pruebas de diferencias (prueba de triángulo), pruebas de ordenamiento por intensidad, pruebas de puntajes por intensidad y pruebas de análisis descriptivo.

En el presente trabajo de investigación se realizaron dos tipos de pruebas sensoriales, una para las muestras tratadas con ozono (prueba triángulo orientada al producto) la cual se describirá en el Capítulo 4, y una para las muestras sometidas al pre-tratamiento químico (pruebas hedónicas orientadas al consumidor) descripta en el Capítulo 6.

2.15 Almacenamiento refrigerado

Se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento refrigerado de las muestras tratadas (tanto con ozono como con APH) en las propiedades fisicoquímicas como en la calidad

Capítulo 2: Materiales y Métodos

microbiológica, y además la relación que había con la presión utilizada durante el tratamiento APH.

Las muestras fueron almacenadas en una cámara de refrigeración a 4° C durante dos meses; semanalmente se extrajeron 3 muestras de cada condición de presión y se realizaron determinaciones fisicoquímicas y se efectuaron ensayos microbiológicos como se explicó en la Sección 2.11.

2.16 Análisis Estadístico

Para realizar los correspondientes análisis de varianza se utilizó el software SYSTAT (SYSTAT Inc., 1990, versión 5.0), considerando que un efecto era significativo para $P < 0.05$. Para los ensayos de comparaciones de medias pareadas se empleó el método de la menor diferencia significativa, LSD ($P < 0.05$).

Los valores de los parámetros obtenidos se muestran expresados como promedios $\pm$ el error estándar

Tanto para el cálculo de las superficies de respuesta como para la optimización de la formulación de la solución de inmersión se utilizó el software Expert Design (versión 7.0.0, Stat-Ease, Inc.).

CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

En este capítulo se presentan los resultados relativos a la caracterización de la carne vacuna sin ningún tratamiento, utilizando el músculo *aductor femoris* y *semimembranoso*. Se determinó la composición nutricional de la misma obteniendo valores que concuerdan con los publicados en bibliografía.

Se hicieron mediciones de color, textura, oxidación lipídica, aw y exudado de la misma durante el almacenamiento refrigerado sin tratamiento de las muestras envasadas al vacío. Todos los parámetros estudiados se encontraron en rangos aceptados para este corte vacuno.

Se realizó un recuento microbiano para determinar cuál es la flora natural de la carne, encontrándose presentes bacterias mesófilas, enterobacterias y bacterias ácido-lácticas, las cuales luego de dos semanas de almacenamiento presentaban un recuento muy elevado demostrando la corta vida útil que presenta la carne sin tratamiento.

Para determinar la microestructura de la carne, se hicieron determinaciones de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) y Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM). Mediante DSC se encontraron los picos correspondientes a la actina, miosina y colágeno (proteínas estructurales), las proporciones de estructura secundaria α -helice, β -plegada, giros β y estructura desordenada, hallándose en mayor proporción la estructura β -plegada.

3.1 Carne Bovina

La valorización de la carne vacuna está estrechamente ligada a su valor nutricional y funcional, básicamente debido a su importancia en la dieta por el aporte concentrado de nutrientes. La calidad de la carne está particularmente definida por su composición química (valor nutricional) en cuanto al aporte de vitaminas, proteínas y minerales y por sus características organolépticas (valor sensorial) tales como la textura, el

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

color, el sabor y la jugosidad, valorándose positivamente en la actualidad la carne tierna procedente de animales jóvenes que presentan una coloración rosada, con buena jugosidad durante la masticación, y sabor y aroma característicos.

La carne vacuna es un alimento de fácil digestión y clave dentro de una dieta variada y equilibrada, ya que contribuye con un aporte de proteínas de alto valor biológico (20 g de proteínas por 100 g de producto), de minerales (hierro, yodo, zinc, selenio) y vitaminas del grupo B, especialmente B2 y B12 (Bielaski, 2005). Se caracteriza por tener una mayor disponibilidad de hierro, en forma de hierro hemínico, comparado al hierro provenientes de vegetales (Biesalski, 2005).

3.2 Composición de la carne

Se determinó el contenido proteico, lipídico, de cenizas y humedad correspondiente al tejido cárnico usado (nalga) tal como se describió en **Materiales y Métodos sección 2.2**; mientras que los hidratos de carbono se obtuvieron por diferencia entre todos los macrocomponentes que se encuentran en el corte vacuno ensayado.

La composición centesimal de la carne se presenta en la **Tabla 3.1**, los valores encontrados están dentro del rango esperado para este tipo de productos según los datos publicados por la USDA.

Tabla 3.1: Composición centesimal de la carne vacuna

Componente	Contenido (g/100 g de carne)	Contenido (g/100 g de carne) según USDA
Humedad	72.65 ± 0.80	72.16
Proteínas	20.60 ± 0.07	20.67
Lípidos	5.75 ± 0.07	6.21
Cenizas	1.10 ± 0.01	0.96
Hidratos de carbono	0.10	0.00

±corresponde al error estándar de la media.

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

Las muestras cárnicas utilizadas presentaron un valor de pH entre 5.4 y 5.7.

Para completar la caracterización de la materia prima, se determinaron los parámetros de color textura, exudado y aw, se cuantificó la oxidación lipídica, recuento microbiano y se hicieron medidas de reflectancia difusa, DSC y FTIR según la metodología descrita en las secciones 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.12, 2.3.2, 2.9 y 2.10.

3.3 Textura

La terneza es el atributo de aceptación de la carne más importante y un determinante primario de la calidad de la misma (Dikeman, 1987; Koohmaraie, 1988; Miller *et al.*, 1995). Se encuentra ligada a factores que definen la calidad de los alimentos y que el consumidor evalúa a través del proceso de masticación. Este hecho es fácilmente confirmado por la relación positiva que hay entre el precio de un corte de carne y su terneza.

Se determinó la textura midiendo la fuerza que se realizaba con la sonda Voldockevic en muestras de carne fresca y en muestras de carne almacenadas bajo refrigeración a una temperatura de 4°C por 3 semanas para analizar la variación de la terneza de la carne durante el periodo de almacenamiento. Los datos obtenidos se muestran en la **Tabla 3.2**. Se puede observar un aumento de la fuerza durante el almacenamiento. Este incremento puede estar relacionado con la pérdida de agua que se verifica durante el almacenamiento, datos que se muestran en el siguiente inciso.

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

Tabla 3.2: Fuerza en función del tiempo (semanas) de almacenamiento refrigerado de la carne fresca.

Tiempo (semanas)	Fuerza
0	1.9076±0.1456 ^a
1	2.3094±0.1589 ^b
2	2.4073±0.1223 ^b
3	2.8323±0.1272 ^c

Supraíndices diferentes indican diferencias significativas con $P < 0.05$, $\pm$ corresponde al error estándar de la media.

3.4 Exudado y Actividad acuosa

Se encontró que el exudado depende significativamente ($P < 0.05$) del tiempo de almacenamiento. Al observar la **Tabla 3.3** se ve una tendencia a aumentar el exudado, indicando que hay una pérdida de agua durante el almacenamiento refrigerado a 4°C. Esto se puede correlacionar también con la a_w de las muestras de carne, la cual durante el almacenamiento refrigerado mostró una leve tendencia a disminuir con el tiempo, en la **Tabla 3.3** se muestran los valores.

Tabla 3.3.: Evolución de la actividad acuosa (a_w) y el exudado durante el almacenamiento refrigerado de la carne fresca.

Tiempo (semanas)	a_w	Exudado
0	0.9883±0.0003 ^a	-----
1	0.9878±0.0015 ^a	0.090±0.003 ^a
2	0.9872±0.0006 ^a	0.098±0.006 ^{a,b}
3	0.9863±0.0003 ^a	0.117±0.008 ^b

Supraíndices diferentes indican diferencias significativas con $P < 0.05$ $\pm$ corresponde al error estándar de la media.

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

3.5 Color

El color se considera una de las características sensoriales más importante en la apariencia de un alimento. El color es una sensación compleja, resultante de una serie de fenómenos percibidos simultáneamente. Existe una reflexión diferencial de las diversas radiaciones luminosas del espectro visible cuyas longitudes de onda están comprendidas entre 380 y 780 nm, como consecuencia, al llegar al ojo, se produce la excitación de ciertos centros del cortex por los influjos nerviosos procedentes de las células fotosensibles de la retina (Kowaliski, 1978); por lo tanto se puede definir al color como la energía radiante que el ojo humano detecta a través de sensaciones visuales recibidas por la estimulación de la retina (Kramer, 1976). Por ende, al ser un fenómeno puramente cerebral es subjetivo y puede variar de una persona a otra.

En la carne el color es el resultado de la presencia de dos pigmentos: mioglobina y hemoglobina. El contenido de mioglobina es el que se utiliza fundamentalmente como un indicador de color (Pearson, 1966).

Este parámetro también está relacionado con el grado de desarrollo o de alteración de un alimento.

El color es el factor que más afecta al aspecto de la carne y de los productos cárnicos durante su almacenamiento, y el que más influye en la preferencia de los consumidores (Pérez y Andújar, 2008). Por lo cual la alteración del color fue objeto importante de estudio.

Se determinó el color de la carne sin ningún tratamiento de la forma descrita en la **Sección 2.3.1** obteniéndose los valores que se muestran en la **Tabla 3.4**.

Durante el almacenamiento refrigerado de las muestras envasadas al vacío, los parámetros de color de la carne se vieron afectados por el tiempo de almacenamiento, observándose durante el almacenamiento un aumento significativo del parámetro L^* y una disminución en los valores de a^* (color

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

rojizo de la carne). Jeong *et al.* (2009) relacionaron los menores valores de a^* y b^* en el tejido muscular con una acumulación de metamioglobina durante el almacenamiento refrigerado.

La mioglobina en un corte vacuno se encuentra principalmente como oximioglobina, y, conforme pasa el tiempo va aumentando el porcentaje relativo de metamioglobina en la superficie del mismo, lo que produce la decoloración de la carne fresca (Eagerman *et al.*, 1977), lo cual podría explicar la pérdida de color de las muestras almacenadas.

A pesar de que las muestras estén envasadas al vacío, esta técnica consiste en extraer casi todo el aire del interior del envase y luego sellarlo, es casi imposible evacuar todo el aire (se mantiene entre un 0,3 a 3%, después del sellado), de modo que la atmósfera interior puede cambiar durante el almacenamiento (por crecimiento microbiano, metabolismo y/o permeabilidad a los gases del material de envase). Debido a que, en la práctica, es difícil obtener envases totalmente herméticos, una pequeña penetración de aire conduce a la formación de una capa de metamioglobina marrón en la superficie de la carne debido al hecho de una oxidación real. A medida que se va deteriorando la carne debido al crecimiento microbiano, los parámetros a^* y b^* disminuyen (Renerre y Bonhomme, 1991; Hernández, 1994), siendo la coordenada roja (a^*) la de mayor disminución.

Tabla 3.4.: Evolución de los parámetros cromáticos durante el almacenamiento refrigerado de la carne fresca.

Tiempo (semanas)	L^*	a^*	b^*
0	34.54 $\pm$ 0.44 ^a	20.43 $\pm$ 0.47 ^b	9.03 $\pm$ 0.27 ^{a,b}
1	37.62 $\pm$ 0.54 ^b	19.76 $\pm$ 0.49 ^b	9.75 $\pm$ 0.35 ^b
2	38.59 $\pm$ 0.46 ^b	19.39 $\pm$ 0.40 ^b	9.30 $\pm$ 0.24 ^{a,b}
3	41.74 $\pm$ 0.43 ^c	16.97 $\pm$ 0.80 ^a	8.06 $\pm$ 0.70 ^a

Supraíndices diferentes indican diferencias significativas con $P < 0.05$
 $\pm$ corresponde al error estándar de la media.

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

Hood y Riordan (1973) y Renerre y Mazuel, (1985) en sus ensayos encontraron que cuando el porcentaje de metamioglobina llegaba a un 20% uno de cada dos consumidores rechazaba la carne y cuando alcanza un 50% la carne es considerada inaceptable por el total de los consumidores (Van den Oord y Wesdorp, 1971).

3.6 Oxidación lipídica

La oxidación lipídica de los alimentos es la segunda causa de deterioro de los mismos, después de la acción de los microorganismos. Tiene como consecuencias las alteraciones en el aroma y sabor (enranciamiento), en la textura, en el color, la pérdida de determinados nutrientes y la formación de sustancias potencialmente nocivas (Ulu, 2004), provocando por ello el rechazo por parte de los consumidores y la reducción de la vida útil del producto.

El olor rancio es el resultado de la formación de varias moléculas volátiles, algunas de las cuales poseen sabor desagradable y potencial toxicidad.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la estabilidad oxidativa de carne magra durante su almacenamiento bajo vacío, refrigeradas a 4 °C, se muestran en la **Tabla 3.5**.

Tabla 3.5: N° TBARS en función del tiempo (semanas) de almacenamiento refrigerado de la carne fresca.

Tiempo (semanas)	N°TBARS
0	0.022±0.009 ^a
1	0.033±0.004 ^a
2	0.040±0.003 ^a
3	0.064±0.004 ^b

Supraíndices diferentes indican diferencias significativas con $P < 0.05$,
±corresponde al error estándar de la media.

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

El tiempo de almacenamiento influyó significativamente ($P < 0.05$) en los valores del n° TBARS, observándose un incremento del mismo con el tiempo, siendo más significativo luego de la segunda semana de almacenamiento.

De acuerdo con Shahidi (1992), los valores de TBARS en alimentos cárnicos tienden a aumentar durante el período de almacenamiento, llegando a un valor máximo y luego disminuyendo debido a una reacción adicional de malonaldehído (MDA) con un amplio rango de compuestos e incluso entre sí formando dímeros y trímeros de MDA, los cuales presentan una reactividad reducida (Esterbauer *et al.*, 1991; Aubourg, 1993).

Si bien durante el almacenamiento hubo un aumento de la oxidación lipídica, ésta se encuentra por debajo del límite de rancidez oxidativa de productos cárnicos (< 1 mgMDA/kg dados por Boles y Parrish 1990) detectado por el consumidor, lo que puede deberse a que es un corte magro, tal cual lo corrobora el análisis composicional realizado inicialmente.

3.7 Recuentos microbianos

La carne es una matriz rica en nutrientes que proporciona un entorno adecuado para la proliferación de diversos microorganismos, deteriorantes y patógenos.

La carne además de ser altamente susceptible al deterioro también puede constituir un vehículo para la propagación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Podpečan *et al.*, 2007).

No se encontró crecimiento de hongos, levaduras y de bacterias psicrotófas en ninguna de las muestras cárnicas durante el almacenamiento refrigerado. La flora predominante estaba constituida por bacterias mesófilas y ácido lácticas (BAL) presentando una carga microbiana inicial de 5 log UFC/g y 3 log UFC/g respectivamente, durante la primer semana los recuentos de enterobacterias estaban por debajo de 2 Log

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

UFC/g. Los recuentos microbianos en las muestras control superaron, a partir de la primera semana de almacenamiento refrigerado a 4°C, los valores de UFC/g carne permitidos según el Código Alimentario Argentino Artículo 255bis - (Res 712, 25.4.85) y Artículo 286 - (Resolución Conjunta SPyRS N° 104/2005 y SAGPyA N° 414/2005), el cual establece el siguiente requisito de bacterias: recuento mesófilas a 35 °C < 10⁶ UFC/g, Enterobacterias, no mayor de 100 UFC/g, no presentando un límite para bacterias ácido lácticas.

Respecto al tiempo de almacenamiento tanto para las bacterias ácido lácticas como para bacterias mesófilas se encontró una dependencia con este presentando una diferencia significativa (P<0.05) la cual es más marcada en las BAL.

Tabla 3.6: Recuentos microbianos durante el almacenamiento refrigerado de la carne fresca.

	Mesófilas	BAL	Enterobacterias
Tiempo (semanas)	Log UFC/g	Log UFC/g	logUFC/g
0	5.14±0.31 ^a	3.54±0.06 ^a	<2
1	6.42±0.8 ^b	7.43±0.06 ^b	3.83±0.13
2	6.33±0.6 ^b	8.38±0.02 ^c	4.39±0.25

±corresponde al error estándar de la media.

3.8 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) permite observar las temperaturas de desnaturalización de las proteínas cárnicas. Una curva típica obtenida por DSC (**Figura 3.1**) se compone de tres zonas de transiciones principales, I, II y III.

Figura 3.1. Transiciones térmicas de las proteínas cárnicas estudiadas por DSC Fuente: Findlay y col. (1989).

Las transiciones endotérmicas de las proteínas de la carne están típicamente agrupados en tres regiones, con temperaturas de pico alrededor de 54 - 58°C (Fernández-Martín, 2009) relacionada con la cabeza de miosina, más termolábil (región I), 65 - 67°C para el resto de la miosina, colágeno y proteínas sarcoplasmáticas (región II), y 80 - 83°C correspondientes a la actina (región I) (Martens y Vold, 1976; Wright y col, 1977; Tornberg, 2005).

Se analizaron los termogramas (**Figura 3.2**) obtenidos con DSC de muestras de carne vacuna para hacer una caracterización de la misma. Se encontró que el músculo crudo presentó picos registrado entre 50 y 70 °C que representan el rango de temperatura de desnaturalización de la miosina (51 °C) y colágeno (68 °C) y el último pico entre 74-84 °C está relacionado con la desnaturalización de actina (79.76 °C). Tanto la actina como la miosina son proteínas miofibrilares. Similares resultados fueron reportados por Martensy Vold (1976) y Wright *et al.* (1977), quienes hallaron que en carne bovina *M. semimembranosus* la mayor temperatura del pico (Tmax 80 °C) es debida a la desnaturalización de la actina, mientras que los dos picos

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

con valores de T_{max} 59 y 66 °C representan la desnaturalización de la miosina y proteínas sarcoplasmáticas.

Figura 3.2: Termogramas obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de dos muestras de carne fresca.

3.9 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

El espectrómetro de IR con transformada de Fourier permite la obtención de espectros de forma rápida, precisa y con relaciones Señal/Ruido (S/N) elevadas. El ATR (Attenuated Total Reflection) es una técnica de muestreo utilizada en el IR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito.

Mediante Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) se estudia la estructura secundaria de las proteínas para determinar la proporción de éstas presentes en la muestra cárnica a estudiar.

Estructura Secundaria

Es la disposición espacial adoptada por la cadena polipeptídica a lo largo de su eje. Dado que los sustituyentes de los carbonos α pueden rotar en torno a los ejes constituidos por los enlaces covalentes simples, la conformación que puede adoptar la cadena polipeptídica puede ser muy variable. Sin embargo, cada cadena polipeptídica asume una conformación específica, llamada nativa. Las principales estructuras secundarias halladas en las proteínas son la α -hélice y la estructura β . La α -hélice es una estructura ordenada que contiene 3.6 restos de aminoácidos por vuelta. Las cadenas laterales se proyectan al exterior de la hélice. En ella, se establecen múltiples enlaces de hidrógeno, especialmente entre el hidrógeno del grupo ($-\text{NH}-\text{CO}-$) y el oxígeno de un enlace peptídico localizado en la vuelta siguiente. Este tipo de estructura es muy estable ya que ofrece una alta densidad que restringe las interacciones con otras moléculas. La estructura β es una estructura en zig-zag más estirada que la α -hélice. Si se produce la supresión de los puentes de hidrógeno intracatenarios puede producirse el paso de las estructuras α helicoidales a estructuras β . Estas cadenas estiradas (β) se combinan para formar estructuras denominadas en hoja plegada (β -Sheet) que se encuentran unidas entre sí por puentes de hidrógeno intercatenarios, en los que todos los enlaces peptídicos participan en su formación. Las cadenas laterales (R) de los aminoácidos se sitúan por encima y por debajo del plano de las láminas y ni sus cargas ni las restricciones estéricas limitan la existencia de estas estructuras.

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

Figura 3.3. Estructura secundaria de las proteínas: α -helice (superior) y en hoja plegada o estructura β (inferior).

La mayor parte de la información que obtenemos sobre proteínas proviene de bandas que ocurren entre 1800 y 1400 cm^{-1} , y particularmente a 1650 cm^{-1} . La posición espectral de la banda amida I depende de la estructura secundaria en que está involucrado el grupo CO-NH . Los diferentes tipos de estructura secundaria, α -Hélice, cadenas y hojas β , giros β y estructuras sin orden periódico, generan bandas amida I localizadas en números de onda característicos. Los factores que determinan la posición exacta de la banda son: i) la fuerza de las uniones por puente hidrógeno (HB) que involucran al O y al H del grupo amida y ii) la orientación relativa de los osciladores C=O .

Influencia del HB: cuando el átomo de O participa en una unión HB, se debilita el enlace C=O . La constante de este estiramiento es menor y la transición vibracional ocurre a menor energía. Para el H involucrado en un HB su vibración angular está restringida y ocurre a mayores energías. La combinación de ambas contribuciones determina, dependiendo de la fuerza de las uniones HB, la energía, y posición espectral de la banda amida I.

Influencia de la orientación relativa de dipolos: los dipolos oscilantes en un conjunto pueden interactuar eléctricamente por resonancia. Cuando un fotón incide sobre un dipolo, la energía es transferida por resonancia a los

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

demás y la absorción se produce en el conjunto de dipolos. El número de onda apropiado para la absorción del conjunto depende de la distancia y orientación relativa de los grupos. Dipolos cercanos y orientados paralelamente se acoplarán con más eficiencia que dipolos más lejanos orientados mutuamente perpendiculares. Podemos esperar entonces que un conjunto de dipolos (los grupos --C=O) arreglados en una alfa-hélice absorban a un número de onda particular y diferente de un conjunto arreglado como hojas y cadenas β o desordenadas.

La **Tabla 3.7** muestra la posición de las bandas correspondientes a diferentes elementos de estructura secundaria. La asignación de bandas a diferentes elementos de estructura secundaria es el resultado de cálculos (Krimm, 1986) y de observaciones experimentales (Byler, 1986).

Tabla 3.7: Posición de la banda amida I de diferentes elementos de estructura secundaria. (H. Torii, M. Tasumi (1996))

Número de onda (cm^{-1}) asignada	Estructura secundaria
1620-1630	hoja beta (β -Sheet) intermolecular
1620-1640	hoja beta (β -Sheet) intramolecular
1640-1650	estructura desordenada
1650-1660	α -hélice
1660-1695	Giros β (β turn)
1675	hoja beta (β -Sheet) intramolecular
1690-1700	hoja beta (β -Sheet) intermolecular

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

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

La banda de la Amida I localizada entre 1600 y 1700 cm^{-1} (**Figura 3.4**) fue investigada debido a que esta región es más sensible a cambios en las proteínas miofibrilares (Martinez *et al.*, 2017). Se obtuvieron los espectros de deconvolución de las bandas mediante el uso de la función Gaussian/Lorentzian. Este procedimiento genera un espectro con resolución aumentada “artificialmente” que nos revela la posición de las bandas subyacentes (Kauppinen, 1981) y se puede obtener una visión de los cambios en las estructuras secundarias, tales como hoja β (β -Sheet), α -hélice, giros β (β -Turn), así como estructuras al azar o desordenadas. La proporción de estructuras α -hélice, hojas β , o desordenadas corresponde aproximadamente a la proporción relativa del área de las correspondientes bandas. No es el método de elección para conocer la cantidad absoluta y exacta de elementos de estructura secundaria, pero nos permite estudiar cambios, aún muy sutiles, de estructura secundaria en diferentes condiciones experimentales.

Figura 3.4: Espectro de FTIR de tres muestras de carne fresca.

Figura 3.5: Espectro de deconvolución con las bandas subyacentes.

Se encontraron cuatro bandas (**Figura 3.5**) correspondientes a estructuras de las proteínas localizadas en las siguientes regiones de la Amida I: entre 1622-1624 cm⁻¹ correspondiente a **β -Sheet**; 1654-1656 cm⁻¹ a la fracción de α -Hélice, 1673-1678 cm⁻¹ a **β -Turn** y una banda en 1640 cm⁻¹ correspondiente a una estructura desordenada.

Capítulo 3: Caracterización de la materia prima

Tabla 3.8: Porcentaje de estructuras de proteínas (β -Sheet, Estructura desordenada, α -Hélice, β -Turn) de carne.

Tipo de estructura	%
β sheet	42 $\pm$ 0.87
estructura desordenada	23 $\pm$ 0.50
α hélice	22 $\pm$ 0.45
β turn	13 $\pm$ 0.13

$\pm$ corresponde al error estándar de la media.

3.10 Microscopía electrónica de barrido ambiental

Se utilizó la técnica de microscopia electrónica (ESEM) para observar la microestructura de un tejido cárneo sin ningún tratamiento previo.

En la **Figura 3.6** se observa el músculo sin tratamiento. Se puede ver las fibras musculares que forman la estructura del músculo.

Figura 3.6: Imagen de ESEM de muestras procesadas tejido del músculo *aductor femoris* y *semimembranoso* vacuno. Magnificación 800 x.

CAPÍTULO 4:

TRATAMIENTO CON OZONO

GASEOSO

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

En este capítulo se evaluó el efecto del tratamiento con ozono sobre muestras cárnicas. Se evaluaron diferentes concentraciones de ozono y tiempos de exposición. Se utilizaron controles que consistieron en carne fresca sin tratamiento y se evaluaron las propiedades fisicoquímicas de los productos obtenidos. Se realizaron recuentos microbianos de bacterias ácido-lácticas, bacterias mesófilas, enterobacterias, hongos y levaduras luego de los diferentes tratamientos con ozono. Se midió la variación del color mediante el espacio cromático CIELab y la oxidación lipídica mediante el análisis de TBARS.

Se encontró que el ozono producía reducciones de hasta 2 ciclos logarítmicos de UFC/g de heterótrofos, pero tiempos prolongados de tratamiento causaban defectos en las características fisicoquímicas de las carnes (color y oxidación lipídica).

Se realizó una optimización del tratamiento en el cual se buscó el tiempo y concentración de ozono que produzca una disminución en el recuento microbiano de la flora heterótrofa presente en la carne, sin afectar los parámetros de color y la oxidación lipídica (los cuales fueron los más sensibles a la ozonización). Se encontró que el tratamiento óptimo fue la aplicación de pulsos de 5 minutos de O_3 obteniéndose una concentración en la cámara de $276 \text{ mg } O_3/\text{m}^3$ con la repetición de estos pulsos cada 30 minutos durante un periodo de 5 horas.

Además, se estudió el efecto del ozono sobre una bacteria patógena, *L. monocytogenes*, la cual es resistente a las bajas temperaturas por lo que puede sobrevivir durante el almacenamiento refrigerado utilizado en la conservación de la carne. Se analizó una concentración de inóculo de 10^3 UFC/ml, que fue sembrada sobre los discos de carne que luego fueron tratados con ozono (tratamiento optimizado). El ozono presentó un efecto positivo en el tratamiento produciendo una reducción de más de 1 ciclo logarítmico de *L. monocytogenes*.

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

Se realizó un análisis sensorial (prueba triangular) a través del cual se determinó que no se detectaron diferencias significativas entre las muestras tratadas con ozono (tratamiento optimizado) y las muestras de carne fresca (control).

4.1 Tratamiento con Ozono

Los ensayos de ozonización se llevaron a cabo en una cámara de 3 l de volumen utilizando un flujo continuo de ozono. El generador de ozono (Dobzono, modelo Ozolab100) produce iones negativos y ozono mediante una tensión eléctrica (llamada "efecto Corona").

Se diseñaron cámaras de ozonización especiales utilizando recipientes de vidrio herméticos a los cuales se les realizó una adaptación de las tapas para permitir la entrada de ozono y liberar el gas presente en los recipientes. Se implementó un sistema de cierre del pasaje de gas mediante pinzas de Mohr colocadas en mangueras conectadas al generador de ozono para controlar el flujo del mismo y mangueras de salida de gas de la cámara para mantener una atmósfera constante dentro de la misma. Se utilizó un aireador como fuente de oxígeno que enviaba el aire a un caudal de 2 L/min hacia el generador de ozono. El caudal se midió con un rotámetro comercial (Vernel, modelo UVRx) cuya menor división de lectura era de 0.05 L/min.

Los niveles permitidos en el ambiente en el que se ventea ozono son 0.1ppm (0.214 mg O₃/m³) (Limits for Air Contaminants. Standards- 29 CFR, OSHA) por lo cual el equipo se colocó bajo un extractor de aire para no superar estos límites en el ambiente de trabajo.

4.1: Esquema de la cámara de ozonización

Figura 4.2: Cámara conectada al equipo de generación de ozono.

4.2 Cuantificación de ozono por iodometría

Se cuantificó la masa de ozono introducida al sistema a la salida de la cámara de ozonización, debido a que las condiciones de mezcla perfecta eran alcanzadas dentro de la cámara. Con este análisis se determinó la concentración de ozono en la corriente de salida del ozonizador.

Para la cuantificación del ozono generado, el caudal gaseoso se hizo

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

burbujear en un tren de frascos lavadores con 400 ml de una solución de yoduro de potasio (KI). El ozono oxida cuantitativamente a los iones yoduro (I^-) convirtiéndolos en yodo (I_2), que luego se cuantificó por titulación con tiosulfato de sodio según lo sugerido en la bibliografía (Kolthoff et *al.*, 1985). Previamente a cada medición se encendió el ozonizador y dejó estabilizar el caudal gaseoso durante 120 segundos; luego se conectó a la cámara y se hizo circular el gas durante un período de tiempo que permitiera recoger una masa de ozono cuantificable en los frascos. En las condiciones de ensayo este tiempo fue de 5 minutos (300 seg). Una vez apagado el ozonizador, se continuó circulando gas durante 5 minutos a fin de purgar los restos de ozono remanente en las conducciones.

Con el objetivo de retener el ozono que pudiera salir del primer frasco lavador sin haber sido retenido en éste, se colocaron varios frascos en serie y siempre se verificó que en el último de ellos no se detectara la presencia de ozono.

Figura 4.3: Tren de tres frascos lavadores en serie.

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

4.2.1 Técnica analítica

Se basa en la capacidad que presentan los oxidantes atmosféricos de oxidar KI a I₂ en medio neutro.

La iodometría se aplica a la determinación de sustancias que oxidan el ion yoduro a yodo, el cual luego es valorado con disolución patrón de tiosulfato sódico. En las iodometrías se realizan valoraciones indirectas con el yodo. En estos métodos se forma triyoduro por reacción de ion yoduro en exceso con algún agente oxidante.

Como existe una relación estequiométrica entre la cantidad inicial de oxidante y la cantidad de I₃⁻ producida, la determinación de triyoduro proporciona datos de los cuales se puede calcular la concentración del oxidante.

Para la valoración de I₃⁻ se usa una solución estándar de tiosulfato sódico. Las reacciones involucradas son:

Reacciones de iodo y ozono

Reacción de titulación con tiosulfato

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

En los métodos analíticos en los que interviene yodo no son necesarios los indicadores redox normales, porque se dispone de almidón, un indicador interno sensible que experimenta una interacción específica con yodo. El yodo libre forma un color azul muy intenso con almidón disperso coloidalmente y esta coloración sirve de indicación de la presencia de yodo.

Una cantidad tan pequeña como 2×10^{-7} M de yodo da con almidón un color azul perceptible.

Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

- Solución de KI (20 g/l), la cual se guardó en oscuridad hasta el momento del uso.
- H_2SO_4 (2N) se midieron 56 ml de H_2SO_4 (cc) y se lo llevo a 1 litro con agua destilado en un matraz. Se guardó en vidrio color caramelo.
- $Na_2S_2O_3$ (0.1N), se pesaron 25 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ y se llevó a 1 L. Se guardó en vidrio caramelo y refrigerado.
- Almidón: se pesaron 5 g de almidón soluble, se agregó 1000ml de agua hirviendo, se dejó hervir hasta color traslúcido. Se dejó sedimentar una noche y se decantó el sobrenadante
- $KH(IO_3)_2$: Se pesaron 3.2496 g, se llevó a 1 l con agua destilada y se guardó en vidrio caramelo y refrigerado.

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

4.2.2 Determinación de la concentración de entrada al tanque de ozonización

Se cargaron 2 de las cámaras de ozonización con frascos conteniendo 400 ml cada uno de solución de KI (20g/l) y se ensamblaron al tren de burbujeo. Se inició el pasaje de corriente de ozono ajustando el caudal a 2.2 L/min y se hizo circular el gas durante un período de 5 minutos. Luego se desconectó la alimentación del tren de frascos. Apenas detenido el burbujeo, se agregaron 10 ml de H_2SO_4 2N a cada frasco lavador.

Se trasvasó de cada frasco lavador a un erlenmeyer de 2L y enjuagó 2 veces. En el trasvase, se tuvo cuidado de no salpicar ni airear demasiado la solución que adquirió un color amarillo fuerte después de la oxidación. La misma se tituló con Na_2SO_3 0.1 N, agregando 5ml de almidón cuando a lo largo de la titulación la solución se vuelve amarillo pálido. El punto final de la titulación se evidenció con la desaparición del color azul producido por el agregado de almidón.

En la titulación se obtuvo que se absorbieron 3.12 mg O_3 en la masa de líquido ya que se consumieron 1.3 ml promedio de tiosulfato.

Esta cantidad de ozono resulta de hacer circular 11 litros de la mezcla aire-ozono por la cámara (5 minutos de pasaje de gas con un caudal de 2.2 L/min). Estos cálculos conducen a una concentración en la corriente de ozono de 283.6 mg/m³.

Conociendo la densidad del ozono (2.14 Kg/m³) se pudo calcular la concentración de ozono expresada en ppm volumétricos (cm³ Ozono/m³ de gas) siendo de 132.52 ppm.

4.2.3 Modelado Matemático de la evolución de la concentración de ozono en la cámara de ozonización.

Se planteó una ecuación que permite predecir la concentración de ozono en función del tiempo C (t) en la cámara de ozonización (Eq. 4.1)

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

basada en un balance de materia no estacionario. Se consideró como valor asintótico a la concentración de ozono en la cámara que no difería en más del 10% de la concentración de ozono en la entrada.

Una corriente Q proveniente del ozonizador con una concentración de ozono C_e (mg O_3/m^3) ingresa a la cámara de ozonización de volumen V conteniendo inicialmente aire (**Figura 4.1**).

$$V \frac{dC}{dt} = Q(C_e - C(t)) \quad \text{Eq. 4.1}$$

Integrando resulta:

$$\ln \frac{C_e - C}{C_e - C_0} = \frac{Q}{V} t \quad \text{Eq. 4.2}$$

Donde $C_0=0$ es la concentración inicial de ozono en la cámara. Si se considera mezclado perfecto, los cambios en la concentración de ozono a la salida ($C(t)$) coinciden con lo que ocurre dentro de la cámara. Considerando que la cámara de ozonización tenía: $V=3$ litros; $Q= 2.2$ L/h, densidad del ozono= $2.14 \text{ Kg}/m^3$, se puede predecir la concentración de ozono en función del tiempo en la cámara de ozonización (**Tabla 4.1**) conociendo la concentración de ozono que ingresa al tanque de ozonización, la cual se obtuvo mediante la titulación iodométrica.

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

Tabla 4.1: Evolución de la concentración de ozono dentro de la cámara en función del tiempo.

Tiempo (Segundos)	O ₃ (mg/m ³) = 283,6* (1- exp (-0.318 t))
0	0.0
30	86.9
60	147.2
90	189.0
120	218.0
150	238.1
180	252.1
240	268.4
300	276.3
480	282.8
600	283.4
900	283.6
1200	283.6

4.3 Aplicación de Ozono

El sistema generador de ozono que se utilizó en todos los ensayos es de tipo semicontinuo, generando ozono durante un tiempo máximo de 10 minutos; luego de ese tiempo el equipo se debe programar nuevamente. Debido a esta condición del equipo y a la inestabilidad que presenta la molécula de ozono se debieron realizar inyecciones de pulsos de ozono cada 30 minutos. Estos pulsos de ozono se aplicaron durante dos períodos de tiempo (3 y 5 h). Luego de esa etapa se dejaron las muestras en contacto con el ozono remanente dentro de la cámara refrigerada a 0°C por 24 h.

Mediante la introducción del ozono se realizó un barrido del aire

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

presente en la cámara. Se suministró un flujo de ozono a una temperatura controlada de 4 °C durante diferentes tiempos de tratamiento.

4.3.1 Ensayos con ozono

Se realizaron 4 ensayos en los cuales las variables fueron: concentración de ozono utilizada (rango entre 218-286 mg O₃/m³) el cual está relacionado con el tiempo de pasaje de ozono por la cámara (pulsos), el período de refuerzo de circulación de ozono (cada 30 minutos durante 3h o 5 h), y la disposición de las muestras dentro de las cámaras.

Ensayo A: Se utilizó una concentración de ozono en el interior de la cámara de 218 mg O₃/m³, para ello se aplicaron pulsos de 2 minutos cada 30 minutos durante un periodo de 3 horas (6 pulsos de 2 minutos que implican un tiempo total de aplicación de ozono de 12 minutos). Al terminar esta etapa se dejaron las muestras en contacto con el ozono remanente dentro de la cámara por 24 h, la cual se mantuvo refrigerada a 0°C (muestras **O3**).

Ensayo B: En este ensayo se varió el período de refuerzo de ozono. Se utilizó la misma concentración de ozono en el interior de la cámara (218 mg O₃/m³), aplicando pulsos de 2 minutos cada 30 minutos, pero durante un periodo de 5 horas (10 pulsos de 2 minutos que implican un tiempo total de aplicación de ozono de 20 minutos). Se dejaron las muestras durante 24 h con el ozono remanente en una cámara de refrigeración a 0°C (muestras **O24**).

Ensayo C: Se repitió el procedimiento realizado en las muestras **O24**. Luego de 24 horas en que las muestras estuvieron dentro de la cámara de ozonización en condiciones refrigeradas, se realizó un refuerzo del tratamiento aplicando pulsos de 2 minutos cada 30 minutos durante un periodo de 5 horas (20 pulsos de 2 minutos que implican un tiempo total de aplicación de ozono de 40 minutos) y nuevamente se dejó 24 h con el ozono remanente en la cámara bajo refrigeración a 0°C (muestras **O48**).

En los ensayos **A**, **B** y **C** las muestras de carne se colocaron sobre cajas

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

de Petri estériles de 5.5 cm de diámetro dentro de la cámara (**Figura 4.4**).

Figura 4.4: Cámaras de ozonización con las muestras de carne colocadas en los racks.

Ensayo D: Se varió la concentración de ozono y el tiempo de contacto de las muestras de carne con la corriente de ozono. Se aplicaron distintos pulsos de ozono (5, 10, 20, 40 minutos) para obtener concentraciones dentro de la cámara entre 276-283 mgO₃/m³. Se realizaron los respectivos refuerzos cada 30 minutos durante 5 h.

Como se puede observar en la Tabla 4.1 luego de 10 minutos de pasaje de ozono en la cámara, la concentración de O₃ llega a un valor prácticamente constante de 283 mg/m³.

Además, en este ensayo se varió la disposición de la carne en la cámara de ozonización, ya que en los **Ensayos A, B.C**, al estar el ozono en contacto con una sola cara de las muestras cárnicas podría influir en los resultados. Para ello, en este Ensayo las muestras se suspendieron en forma vertical dentro de la cámara para que el ozono entre en contacto con toda su superficie simulando la forma en que las reses se encuentran en una cámara frigorífica

(Figura 4.6).

Figura 4.5: Disposición de las muestras cárnicas dentro de la cámara de ozonización.

Para realizar estos ensayos se cortaron 56 discos de carne, de los cuales 49 se colocaron dentro de las cámaras para ser tratadas con ozono. El resto de las muestras se las utilizó como muestras control (CF) (Tabla 4.2).

Se estudiaron las modificaciones en la coloración superficial de las carnes rojas tratadas con ozono, en comparación con las muestras control, sin ozonizar. Para ello, se realizaron determinaciones colorimétricas como se detalló en la **Sección 2.5.1**. Se evaluó la oxidación lipídica según lo descrito en la **Sección 2.9** en las muestras control y en las muestras ozonizadas por duplicado mediante el método del ácido tiobarbitúrico (TBA). Además, se realizaron determinaciones de textura, aw.

Asimismo, se analizó el efecto del ozono sobre la flora natural

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

heterótrofa presente en las muestras cárnicas (recuentos de hongos y levaduras, bacterias lácticas, bacterias mesófilas y enterobacterias según lo detallado en la **Sección 2.11**); se trabajó con muestras de carne fresca como control.

Tabla 4.2: Diseño experimental empleado.

Código	Tratamiento con ozono	Concentración ozono (mg/m ³)	Tiempo pasaje de ozono (min)	Nº de muestras
CF	No	0	0	7
O3	Si	218	2	7
O24	Si	218	2	7
O48	Si	218	2	7
O5	S1	276	5	7
O10	S1	283	10	7
O20	S1	283	20	7
O40	S1	283	40	7

4.4 Resultados

4.4.1 Ensayos A, B y C

Se realizó una comparación de los resultados obtenidos en estos ensayos debido a que en los mismos se utilizó la misma concentración de ozono (218 mg/m³) y se producía el contacto por una sola cara. Se observó la influencia del tiempo refuerzo del tratamiento de ozono sobre los distintos parámetros estudiados.

4.4.1.1 Color

En la **Figura 4.6** se presentan los resultados de color superficial de las

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

carnes tratadas con ozono y la carne fresca correspondientes al promedio de las determinaciones realizadas por triplicado.

La luminosidad (L^*) de las muestras presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) aumentando el valor al incrementarse el tratamiento con ozono (tiempo de ozonización). Se observa que este parámetro en las muestras tratadas con ozono durante 3 horas (**Ensayo A**) no se modificó significativamente ($p > 0.05$) respecto del control presentando un valor 38.61 ± 0.24 . Con respecto a los ensayos **B** y **C** (donde se aumentó el periodo de pulsos de ozono y además en **C** se realizó un refuerzo del tratamiento luego de las 24h), este parámetro se vio más afectado, aumentando a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento llegando a valores por encima de 40.

El parámetro a^* se vio afectado en forma significativa ($p < 0.05$) por el tratamiento con ozono solo en los **Ensayos B** y **C**. En los experimentos en los que se realizaron refuerzos durante un período de 5 horas (**Ensayo B**) se observó que en las muestras tratadas con ozono durante 24h, se modificaron significativamente ($p < 0.05$) los parámetros de color superficial respecto del control (23.65 ± 0.43) obteniéndose valores de 18.32 ± 0.49 , los cuales se encontraban dentro del rango aceptable, sin embargo, el **Ensayo C** presentó una disminución muy importante del parámetro obteniéndose un valor promedio de a^* de 14.44 ± 0.65 .

Por lo tanto, con referencia al mantenimiento del color de la carne, el tratamiento con ozono con refuerzo a las 24 h (**O48, Ensayo C**) resultó ser perjudicial, no siendo así para tiempos de tratamientos **O3 (Ensayo A)** y **O24 (Ensayo B)**, donde los valores de a^* se encontraron por encima de 15.

Figura 4.6: Efecto del ozono sobre los parámetros de color: (■) parámetro L^* , (■) parámetro a^* , (■) parámetro b^* .

El color superficial se modifica en forma significativa ($p < 0.05$), siendo el parámetro a^* , el que se vio más disminuido respecto del control, debido a la oxidación de la mioglobina a metamioglobina.

4.4.1.2. Textura

Con respecto a la textura de la carne no se encontraron diferencias significativas entre las muestras tratadas con ozono y las muestras control **Tabla 4.3**. Esto podría deberse a que el corte vacuno con la cual se trabajo no es un corte que presente una dureza apreciable por la cual su modificación durante el tratamiento es mínima.

Gertzou *et al* (2017), reportaron que tratamientos con ozono en carne de pollo utilizando concentraciones que encontraban entre 5-10 mgO_3/L no afectaban los parámetros de textura, obteniéndose valores similares a la carne de pollo sin tratamiento.

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

Tabla 4.3: Efecto del tratamiento con ozono sobre la fuerza

Muestra	Fuerza
CF	3.81±0.27 ^a
O3	3.78±1.54 ^a
O24	3.61±0.22 ^a
O48	3.39±0.13 ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$); los valores promedio $\pm$ Error estándar de la media.

4.4.1.3. Recuentos microbianos

Los resultados de los recuentos de heterótrofos observados se presentan en la **Tabla 4.4**. El ANOVA realizado, indicó que los 2 factores estudiados (aplicación de ozono y tiempo de refuerzo del tratamiento) tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) en la reducción de los recuentos obtenidos de enterobacterias, bacterias mesófilas y hongos y levaduras, pero no se observó un efecto en el recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL).

Analizando los resultados del **Ensayo A**, se observa que, para los microorganismos testeados, las reducciones de los recuentos en las carnes con tratamiento de ozonización fueron de alrededor de 0.5 ciclos logarítmicos respecto a los controles.

Con referencia al **Ensayo B** en el que se hicieron refuerzos durante 5 horas y se almacenó durante 24 horas (**O24**), se pudo observar una reducción del crecimiento microbiano. Mayores reducciones en los recuentos fueron observadas en las muestras **O48** (**Ensayo C**). Para las bacterias mesófilas la reducción fue de más de 1 ciclo logarítmico para **O24** y de más de 2 ciclos logarítmicos para **O48**, por lo que podemos concluir que cuanto mayor era el tiempo de exposición al ozono mayor fue la reducción de microorganismos (**Tabla 4.4**).

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

En el caso de hongos y levaduras, las muestras que presentaron una mayor reducción en el recuento fueron las **O24** y **O48**, llegando a obtener una reducción de más de 1.5 ciclos logarítmicos. En cambio, para enterobacterias el tratamiento que presentó diferencias significativas en los recuentos fue **O48**, obteniéndose una reducción de casi 1 ciclo logarítmico.

Tabla 4.4: Recuentos de la flora heterótrofa en las muestras control (CF) y en carne vacuna tratado con 218 mg/m³ de ozono durante los distintos periodos de tratamiento.

Muestras	Mesófilas (Log UFC/g)	BAL (Log UFC/g)	Enterobacterias (Log UFC/g)	Hongos y levaduras (Log UFC/g)
CF	5.76±0.19 ^d	4.03±0.12 ^b	2.27±0.04 ^{b,c}	3.26±0.23 ^{b,c}
Ensayo A, O3	5.07±0.13 ^c	3.85±0.17 ^{a,b}	2.02±0.29 ^b	3.73±0.24 ^c
Ensayo B, O24	4.40±0.19 ^b	3.14±0.20 ^{a,b}	2.56±0.19 ^c	2.82±0.08 ^b
Ensayo C, O48	3.60±0.06 ^a	3.42±0.39 ^a	<2	<2

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$); los valores promedio $\pm$ Error estándar de la media.

Se puede concluir que los efectos más significativos en la reducción microbiana se encontraron en los tratamientos con un mayor tiempo de exposición al ozono (**Ensayo C, O48**), pero sin embargo esta exposición al ozono afectaba negativamente a los parámetros de color, obteniéndose una carne con una menor coloración rojiza por la oxidación de la mioglobina.

Se concluye que el tratamiento B en el que se realizaron refuerzos de 30 minutos de ozonización durante 5 h almacenando durante 24 horas fue el más adecuado ya que presentó reducción en los recuentos microbianos y parámetros de color aceptables.

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

4.4.2 Ensayo D

En este Ensayo D se utilizaron muestras de carne suspendidas y se aplicaron distintos tiempos de circulación de ozono en la cámara (5, 10, 20, 40 minutos) mayores a los utilizados en los Ensayos anteriores. Se obtuvieron por ello concentraciones de ozono dentro de la cámara también mayores (entre 276-283 mgO₃/m³). Asimismo, se realizaron los respectivos refuerzos cada 30 minutos durante 5 h.

Cabe señalar que luego de los 10 minutos de pasaje de gas, la concentración de ozono en la cámara llega a un valor prácticamente constante próximo a 286 mg O₃/m³. Los resultados se describen función de los tiempos de circulación de ozono (5, 10, 20, 40).

4.4.2.1 Color

Los resultados de color superficial de las carnes tratadas con ozono obtenidos se presentan en la **Tabla 4.5**, correspondiendo al promedio de las determinaciones realizadas por triplicado.

Se observa que, en las muestras tratadas con las diferentes concentraciones de ozono (relacionados con el tiempo de pasaje del mismo), se modifican significativamente ($p < 0.05$) los parámetros de color superficial respecto del control.

El parámetro más afectado por el tratamiento de ozono es el parámetro a^* , el cual está relacionado con el color rojo de la carne.

Puede observarse que las muestras tratadas durante tiempos menores a 20 minutos presentaron valores de a^* aceptables siendo mayores a 15.

Sin embargo, para el caso de muestras tratadas con ozono durante 40 minutos (concentración máxima 286 mg/m³) el color superficial se modifica en forma significativa ($p < 0.05$) disminuyendo casi a la mitad respecto del control debido a la oxidación de la mioglobina a metamioglobina. Asimismo,

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

se probó que en ese caso luego de la exposición de 30 minutos al aire de la muestra tratada con ozono, el parámetro a^* no revertía y no se alcanzaba el valor hallado en el control, eso significa que las alteraciones de color resultaban irreversibles.

Tabla 4.5: Variaciones de color superficial de muestras tratadas con ozono durante los distintos tiempos de ozonización.

Tratamiento	L*	a*	b*
CF	30.92±1.12 ^a	21.29±1.67 ^d	8.51±1.56 ^{a,b}
O5	34.30±0.68 ^b	19.32±0.32 ^c	9.95±0.19 ^{b,c}
O10	32.17±0.28 ^a	15.90±0.86 ^b	7.20±0.33 ^a
O20	37.12±0.61 ^c	15.35±0.25 ^b	11.13±0.19 ^c
O40	34.08±6.89 ^a	12.23±3.44 ^a	7.39±1.33 ^a

Letras distintas indican resultados que difieren significativamente ($p < 0.05$)

En la **Figura 4.7** se puede observar como varió el color de la carne tratada con ozono con respecto al control. A medida que aumentaba el tiempo de exposición las muestras se tornaban de color marrón, lo que significa la formación de metamioglobina.

La acción oxidante que presenta el ozono puede llegar a perjudicar la calidad de las carnes aumentando la rancidez y variando el color de las mismas. El ozono puede oxidar fácilmente los tejidos musculares, producir decoloraciones indeseables y dar lugar a sabores rancios en los tejidos grasos (Kaess y Weidemann, 1968 a,b; Clark y Takacs, 1980). Stivarius *et al.* (2001), encontraron que los valores de a^* (coordenadas rojo/verde) disminuían al utilizar ozono debido a la oxidación de la mioglobina y oximioglobina a metmioglobina.

Figura 4.7: Coloración superficial de las muestras ozonizadas según los diferentes tratamientos aplicados.

Al cortar los discos de carne se observa que en el interior se mantiene el color rojizo original de la carne por lo que se puede concluir que el ozono prácticamente no difunde hacia el interior de la muestra.

Por lo tanto, con referencia al mantenimiento del color de la carne, 40 min de tratamiento con ozono (concentración 283 mg/m^3) resulta ser perjudicial, no siendo así para tiempos de tratamientos de 20 min con la misma concentración, ya que los valores de $a^* > 14$ son aceptables por parte de los consumidores (Zamora y Zaritzky 1987).

4.4.2.2 Textura, a_w y oxidación lipídica

Con respecto a las determinaciones de textura (**Tabla 4.6**) se encontró que no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las muestras

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

tratadas con ozono y la carne fresca. Comparando con el ensayo anterior donde se trabajó con una menor concentración de ozono y en el cual no se encontraron diferencias significativas, se puede concluir que el ozono no afectó en los ensayos realizados la textura de la carne.

Con referencia a la aw, se encontró que el ozono afectó significativamente ($p < 0.05$) a este parámetro; a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento se observó una disminución de la aw, (**Tabla 4.6**) Esta disminución puede ser debida al pasaje de gas que genera una eliminación de agua en la superficie (agua libre de la muestra), siendo más marcado cuando la muestra estuvo más tiempo en contacto con el pasaje de ozono.

La oxidación lipídica es un parámetro importante que influye en la calidad y la aceptabilidad de la carne. Los valores obtenidos de rancidez, expresados como mg de malonaldehído/Kg de carne se presentan en la **Tabla 4.6**.

Considerando que valores de hasta 1 mg MDA/Kg de carne fresca, son considerados como aceptables (Boles y Parrish (1990), las muestras que presentan un valor por debajo de este límite son aptas para el consumo. Por los resultados obtenidos puede determinarse que no se observa una marcada oxidación de las carnes tratadas con ozono circulando durante 5 minutos (concentración 276 mg/m³) comparado con la carne sin tratamiento. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas de TBARS ($p < 0.05$) entre el control y las muestras expuestas más tiempo al ozono (10, 20 y 40 minutos, con una concentración 283 mg O₃/m³).

Los tratamientos de ozonización durante el rango entre 10-40 minutos, presentaron valores mg MDA/kg de carne por encima del límite de producción de rancidez de productos cárnicos (< 1 mgMDA/kg) dados por Boles y Parrish (1990) alcanzando valores de 1.7026 mg MDA/kg para 40 minutos de tratamiento, resultando este último valor inaceptable.

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

Tabla 4.6: Efecto del tratamiento con ozono sobre la textura, aw y oxidación lipídica en muestras cárneas.

Tratamiento	Fuerza	aw	Oxidación lipídica (TBARS)
CF	2.4357±0.1813 ^a	0.9894±0.0002 ^d	0.7274±0.2052 ^a
O5'	2.4547±0.3632 ^a	0.9888±0.0002 ^c	0.7381±0.0233 ^a
O10'	3.8154±0.3893 ^{a,b}	0.9879±0.000 ^b	1.1677±0.0086 ^{a,b}
O20'	2.6636±0.2426 ^a	0.9855±0.0001 ^a	1.4248±0.0331 ^{b,c}
O40'	3.0717±0.2429 ^a	0.9851±0.0001 ^a	1.7026±0.1718 ^c

Letras distintas indican resultados que difieren significativamente ($p < 0.05$).

Por lo expuesto se puede concluir que tiempos excesivos de contacto con una concentración de 286 mg/m³ resulta perjudicial en la muestra tanto desde el punto de vista de la coloración superficial como desde el punto de oxidación lipídica.

Algunos autores han reportado aumento de los niveles de oxidación de lípidos en la carne sometida al tratamiento con ozono. Coll Cárdenas *et al.*, (2011) encontraron que muestras expuestas por 24 h a al ozono presentaban una disminución del parámetro a^* que está relacionado con la coloración rojiza de la carne y un aumento en los valores de TBARS llegando a concentraciones inaceptables por el consumidor.

4.4.2.3 Recuento de microorganismos heterótrofos

Los resultados de los recuentos de heterótrofos encontrados se presentan en la **Tabla 4.7**. Se partió de una carne que presentaba recuentos de aproximadamente 10² UFC/g. En el análisis realizado, los tratamientos llevados a cabo tuvieron efecto significativo ($p < 0.05$) en la reducción de los

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

recuentos obtenidos. Analizando los resultados, se observa que, en todos los casos, las reducciones de los recuentos de la flora microbiana habitual de las carnes con tratamiento de ozonización durante los tiempos ensayados fueron entre 1 a 1.5 ciclos logarítmicos presentando diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$).

Tabla 4.7: Efecto del tratamiento con ozono sobre la inactivación de heterótrofos totales en muestras cárneas.

Tratamiento	Mesófilas (Log UFC/g)	BAL (Log UFC/g)	Enterobacterias (Log UFC/g)
CF	3.69 ± 0.05^d	2.84 ± 0.08^c	2.34 ± 0.18
O5	3.33 ± 0.14^c	2.11 ± 0.06^b	<2
O10	3.00 ± 0.07^b	2.22 ± 0.13^b	<2
O20	2.51 ± 0.05^a	<2	<2
O40	2.56 ± 0.08^a	<2	<2

Letras distintas indican resultados que difieren significativamente ($p < 0.05$).

Figura 4.8: Medios de cultivo sembrados con diluciones del homogeneizado de la carne fresca y la carne tratada con ozono.

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

Cuanto mayor era el tiempo de exposición de las muestras a una concentración de 286 mgO₃/m³, mayor fue la reducción de ciclos logarítmicos obtenidos. El efecto fue más significativo en las bacterias ácido lácticas y en las enterobacterias.

En la industria de la carne se utiliza el tratamiento con ozono en las cámaras frigoríficas para eliminar los olores y mantenerlas asépticas durante el almacenamiento de la carne. En la revista Alimentos Argentinos (edición junio 2012) exponen que la incorporación de pequeñas concentraciones de ozono a la atmósfera del lugar donde se procesan o almacenan los productos cárnicos (2 a 3 ppm. en el proceso de congelación, siendo suficiente 1 ppm. durante la conservación), logra conseguir una carne más tierna y aseguran la inocuidad de los productos cárnicos y extendiendo la vida útil de carnes y pescados. En este caso no detallan la carga microbiana inicial de las carnes ni la reducción de los microorganismos obtenidos luego del tratamiento.

En estudios utilizando una concentración de ozono de 154 mg/m³ realizados por Coll Cárdenas *et al.* (2011), se encontró una reducción menor a 1 ciclo log de los recuentos de la flora microbiana habitual de las carnes con tratamiento de ozonización durante 3 h mientras que al circular en forma continua ozono durante 24 h, las reducciones microbianas fueron entre 1 a 2 log presentando diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$). Estos resultados están acordes a los encontrados en nuestro trabajo.

Seydim, *et al.*, (2004) estudió la eficacia del ozono en la reducción de las poblaciones bacterianas en componentes alimenticios como buffer estéril clase C, soluciones al 1% de goma de algarroba, almidón soluble, caseinato de sodio y crema batida. Estos sustratos fueron inoculados con esporas de *Bacillus stearothermophilus* *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y se aplicó ozono en una concentración de 0.4 ppm por 10 minutos. Los resultados encontrados fueron que luego de 10 min de tratamiento las

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

poblaciones de *Bacillus stearothermophilus* se redujeron en 4.93 ciclos logarítmicos en el buffer, 4.56 en el almidón, 0.95 en la goma goma y 0.24 en el caseinato. No hubo una reducción significativa en las poblaciones bacterianas en la crema. Mientras que respecto a las poblaciones de *E. Coli* las reducciones en ciclos logarítmicos encontradas fueron: en buffer 6.10, almidón 6.11, goma de algarrobo 3.86, caseinato 3.76, y crema de leche 1.98. Para el *S. aureus*, se registraron reducciones en buffer de 6.48, almidón 6.47, goma 4.94, caseinato 1.47 y crema 1.02. La crema proporcionó los mayores niveles de protección de las poblaciones bacterianas. Por lo que concluyeron que la matriz ejerce un efecto protector sobre los microorganismos frente al tratamiento con ozono.

4.5 Optimización del tratamiento con ozono

Debido a que un excesivo tratamiento con ozono afecta negativamente los parámetros de color y la oxidación lipídica, se buscó la forma de optimizar el tratamiento en función de las características deseadas en el producto (reducción de microorganismos, baja oxidación lipídica y una variación del color Δa^* por debajo de 5).

Para ello se realizó un gráfico (**Figura 4.9**) en el cual se representó el recuento de mesófilas (log UFC/g) y el N° TBARS en función de los tiempos de pasaje de ozono para encontrar el punto de corte entre ambas curvas y analizar si esa combinación de tiempo y reducción microbiana produce una baja oxidación lipídica. Se encontró que la intersección de las curvas se encuentra en un tiempo de pasaje de ozono de 15 minutos, sin embargo, la oxidación lipídica sigue estando por encima de 1 mg MDA/g de carne.

Ahora si se fija un valor de TBARS por debajo de 1 mgMDA/g de carne (valor máximo aceptable de rancidez), se observa que la curva de TBARS corta en un tiempo de aproximadamente 7.5 minutos, encontrándose que para esas condiciones los recuentos microbianos son del orden de 3

unidades logarítmicas, produciendo una reducción de 0.5 ciclos logarítmicos con respecto a la carne sin tratamiento.

Figura 4.9: Recuentos de mesófilos (—) y N° TBARS (—) en función del tiempo de tratamiento con ozono a una concentración media de 279.5 mg/m³.

En la **Figura 4.10**, se grafican los recuentos microbianos y el Δa^* (variación del parámetro a^* con el tratamiento de ozono) en función del tiempo de ozonización; la intersección de las curvas se produce un tiempo de ozonización de alrededor de 23 minutos, el cual no sería recomendable en función de la oxidación lipídica. Si se adopta un tiempo de ozonización de 7.5 minutos (determinado por la **Figura 4.9**) la disminución de color rojo (Δa^*) resulta baja (de alrededor de 4 unidades) comparada con el control, obteniéndose un valor de a^* aceptable para el consumidor

Figura 4.10: Recuentos de mesófilos (—) y Δa^* (—) en función del tiempo de tratamiento con ozono a una concentración media de 279.5 mg/m³.

Se puede concluir que tratamientos con ozono con una concentración de aproximadamente 276 mgO₃/m³ utilizado pulsos de 5 minutos con un máximo de 7.5 minutos de tratamiento cada 30 minutos durante un periodo de 5 horas (lo cual implica un tiempo total de aplicación de ozono de un máximo de 75 minutos), logran mantener las características fisicoquímicas de la carne en valores aceptables y se obtienen reducciones de la carga microbiana cercanas a 1 ciclo logarítmica.

Por lo expuesto, el tratamiento de pulsos de 5 minutos cada 30 minutos durante un periodo de 5 horas con una concentración de 276mg/m³ fue seleccionado para realizar ensayos con *Listeria monocytogenes*.

4.6 Efecto del ozono sobre *Listeria monocytogenes*

La actividad antimicrobiana del ozono fue evaluada sobre un

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

microorganismo patógeno. En estos ensayos se utilizó *L. monocytogenes* la cual fue inoculada en discos de carne fresca.

Se utilizaron discos de carne que fueron colocados en placas de Petri estériles para su posterior inoculación y tratamiento con ozono. Las muestras de carne se inocularon como se detalló en la **sección 2.12**.

Se realizaron diferentes ensayos trabajándose en cada uno de los casos por triplicado.

El ensayo se realizó utilizando un inóculo de 10^3 UFC/mL de *L. monocytogenes* que, se sembró de la misma manera descrita en la **sección 2.12** sobre la superficie de las muestras mismas y se esparció mediante una espátula de Drygalsky. Parte de las muestras se trataron con ozono durante 5 minutos utilizando una concentración de 276 mg ozono/m³. Este procedimiento se repitió utilizando pulsos de ozono de 5 minutos cada 30 minutos, durante un periodo de 5h; se dejó en contacto 24 h con el ozono remanente y luego las muestras de carne se envasaron al vacío y se almacenaron en forma refrigerada en una cámara de 4°C.

Luego del proceso de ozonización se evaluaron por duplicado los recuentos microbianos de las muestras de carne inoculadas con *L. monocytogenes*. Las muestras cárnicas inoculadas sin tratamiento con ozono fueron consideradas en cada caso como control. En todos los casos se sembraron las muestras sobre el medio de cultivo PALCAM y se incubaron las placas durante 24-48 h a 37 °C.

4.6.1 Resultados

Los resultados obtenidos luego de que las muestras cárnicas fueron inoculadas con *L. monocytogenes* y ozonizadas durante 5 horas (expuestas a una concentración de ozono final de 276 mg/m³) se presentan en la **Tabla 4.8**.

Después de inocular las muestras cárnicas con 10^3 UFC/mL de *L.*

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

monocytogenes la concentración de la bacteria en la carne antes del tratamiento con ozono fue 2 log UFC/g. Se observó una disminución de los recuentos de *L. monocytogenes* en las muestras tratadas con pulsos de 5 minutos cada 30 minutos durante un periodo de 5 horas (10 pulsos de 5 minutos que implican un tiempo total de aplicación de ozono de 50 minutos); siendo esta disminución de más de 1 ciclo logarítmico con respecto a la muestra sin tratar (Control).

Durante el almacenamiento refrigerado de las muestras inoculadas con *L. monocytogenes* tratadas con ozono envasadas al vacío y almacenadas en cámara de refrigeración a 4°C se encontró que prácticamente no se modificó el número de microorganismos presentes, manteniéndose una concentración <2 log UFC/g, lo que podría demostrar que hay un efecto del ozono sobre *L. monocytogenes* lo cual impide su crecimiento normal.

Tabla 4.8: Efecto del tratamiento con ozono sobre la inactivación de *L. monocytogenes* en muestras cárneas inoculadas con 10³ UFC/ml.

<i>L. Monocytogenes</i> (log UFC/g)		
Tiempo de almacenamiento refrigerado a 4°C(días)	CF	Carne ozonizada O5
0	2.03±0.07 ^a	<2
4	3.19±0.11 ^b	<2
8	3.84±0.07 ^c	<2
12	5.10±0.29 ^c	<2
16	6.7±0.20 ^d	<2

Letras distintas indican resultados que difieren significativamente (p<0.05)

Debe destacarse que la carne fresca inoculada sin tratamiento de ozono, envasada al vacío y almacenada a 4°C presentó un aumento del

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

recuento de microorganismos llegando a una concentración de 10^5 UFC/g luego de 16 días.

Un factor importante a tener en cuenta es la relativa baja concentración de ozono final utilizada en el presente trabajo (276 mg/m^3), en comparación con la literatura.

Estudios realizados por Rasanayagam (2006) utilizan altas concentraciones de ozono, mayores a 10000 ppm (más de 21400 mg/m^3) en carnes vacunas y aves inoculados con *Salmonella*, concentración con la cual se logró reducir hasta un 99% de la población microbiana (2 ciclos log), pero afectándose negativamente el flavor y el color del producto.

Diversos autores estudiaron la eficacia del ozono y sus diferentes formas de aplicación para inactivar microorganismo El ozono en aire es efectivo para eliminar *E. coli* O157:H7 (Reagan et al., 1996). Restaino *et al.* 1995, encontraron que entre los microorganismos patógenos estudiados (*Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* y *Staphylococcus aureus*) *Listeria monocytogenes* fue la más sensible cuando se utilizó en agua ozonizada. Da Silva *et al.* (1998) estudiaron la eficacia del ozono gaseosa sobre cinco especies bacterianas en pescado, encontrando una concentración eficaz de $270 \text{ mgO}_3/\text{m}^3$ para inactivar microorganismos, la cual además mejora los aspectos sensoriales con respecto a las no tratadas, en este caso al ser pescado efecto de color es perceptible debida a la baja concentración de mioglobina que presenta.

La inactivación de microorganismos por medio del ozono es un proceso complejo debido a que actúa sobre diferentes constituyentes celulares, desorganizando las membranas y paredes, llevando a la lisis celular. La acción microbicida del ozono se debe a su capacidad de oxidar componentes celulares vitales de muchos microorganismos. El principal punto de acción son los constituyentes de la superficie celular. El ozono actúa sobre la pared celular oxidando sus componentes por lo cual se incrementa la permeabilidad y puede ocasionar la lisis celular. Además, una vez que

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

penetró la célula, el ozono daña los constituyentes de los ácidos nucleicos (ARN y ADN), como consecuencia, los microorganismos no son capaces de desarrollar inmunidad al ozono como lo hacen frente a otros agentes desinfectantes.

4.7 Análisis sensorial

Con el fin de determinar si la carne que habían recibido un tratamiento con ozono utilizando pulsos de corriente de ozono de 5 minutos cada 30 minutos, durante un periodo de 5h, eran perceptiblemente diferentes a la carne sin tratamiento se llevaron a cabo pruebas sensoriales.

Se realizó un tipo de prueba de discriminación (prueba triangular), la cual se usa cuando se desea determinar si dos muestras son perceptiblemente diferentes (Stone y Sidel, 1993). Es posible que dos muestras tengan tratamientos diferentes, pero la percepción sensorial de las personas sea incapaz de percibir la diferencia. El desarrollo de productos se basa en esta posibilidad, al reformular los ingredientes de los alimentos, procurando que el consumidor no detecte diferencia alguna. Las pruebas de discriminación son de mayor utilidad cuando se tienen solamente dos productos para evaluar.

En la prueba triangular se presentan 3 muestras simultáneamente, dos de ellas son idénticas y una es diferente. El panelista debe indicar cuál de las tres es la muestra diferente. Esta prueba permite conocer si existe diferencia perceptible entre dos productos sin tener que especificar la naturaleza de la posible diferencia (Anzaldúa-Morales, 1994). La hipótesis nula para la prueba triangular establece que la probabilidad de escoger la muestra diferente cuando no existe diferencia entre las muestras es de uno en tres ($H_0: P_t=1/3$).

En esta prueba hay seis posibles órdenes de presentación de las muestras, tal como se observa en la **Tabla 4.9**. Para servir las muestras en un orden balanceado, cada orden se debe servir un número igual de veces;

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

esto sólo es posible cuando hay seis panelistas o un número de panelistas que sea múltiplo de seis.

Tabla 4.9: Seis ordenes de presentación de una prueba triangular.

Numero de panelista	Orden de presentación de las muestras		
	Primero	Segundo	tercero
1	A	A	B
2	A	B	A
3	B	A	A
4	B	B	A
5	B	A	B
6	A	B	B

Las muestras de carne fueron cocidas (4 min en plancha), mantenidas a temperatura y presentadas a los panelistas templadas en vasos plásticos de poliestireno expandido y tapadas.

Las dos muestras diferentes (A y B), son presentadas a los panelistas en grupos de tres. Los panelistas reciben ya sea dos muestras A y una B, o dos muestras B y una A. Las tres muestras se presentan en pequeños recipientes idénticos, codificados con 3 números aleatorios.

Los números de código de las muestras presentadas a cada panelista deben ser diferentes, aun cuando dos de las muestras sean idénticas.

La evaluación se realizó en planillas entregadas a los panelistas junto a las muestras, como la que se presenta en la **Figura 4.11**.

Para evaluar la significancia de los resultados, se utiliza la tabla binomial de un extremo.

La prueba de un extremo es apropiada, ya que se sabe que una muestra es diferente y por lo tanto sólo hay una posibilidad de respuesta correcta. En la prueba triangular, se suma el número de panelistas que han

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

identificado correctamente la muestra diferente y el total se somete a la prueba de significancia utilizando la **Tabla 4.10**.

PRUEBA DE DIFERENCIA DE CARNE BOVINA	
Nombre:.....	Edad:.....
.....	
N° Evaluador:.....	Fecha:.....
En la bandeja se presentan tres muestras de carne. Dos de estas muestras son iguales y una es diferente.	
Pruebe por favor las muestras que aparecen en la lista y ponga una marca (x) al lado del código de la muestra que es diferente.	
Código	La muestra diferente es:
433	
573	
567	

Figura 4.11: Planilla de respuesta para la prueba triangular.

En esta **Tabla 4.10**, X representa el número de panelistas que eligió correctamente la muestra diferente y n representa el número total de panelistas que participa en la prueba. La tabla contiene las probabilidades para ciertas combinaciones de X y n .

En el análisis realizado intervinieron un número total 30 de panelistas (n) de los cuales 13 (X) eligieron correctamente la muestra. Entrando en la tabla con esos valores se obtiene una probabilidad de $p=0.164$. Dado que para tener significancia se exige una probabilidad de 0.05 o menos, se puede concluir que no hubo una diferencia significativa entre las muestras.

[illegible]

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

4.8 Conclusiones parciales

- El tratamiento con 218 mg O₃/m³ durante 3 h no fue efectivo para la reducción de microorganismos, y no generó cambios sustanciales en el color y textura de las muestras
- Respecto a los tratamientos con ozono durante 5 h con una concentración de 218 mg O₃/m³ y con refuerzo a las 24 y 48 h, se encontró una leve reducción de los recuentos microbianos en la flora heterótrofa.
- En el caso de muestras cárnicas tratadas con ozono, la mayor inhibición de heterótrofos (mesófilos y enterobacterias) (aproximadamente 2 ciclo log) se presentó en las muestras con mayor exposición al ozono (O48), presentando las muestras un cambio en el color en la superficie, pero sin ser un factor determinante para considerar al producto como no aceptable para su consumo posterior.
- Se puede concluir que el ozono gaseoso en la concentración ensayada (218 mg O₃/m³) aplicado durante 5 horas disminuyó como máximo 2 ciclos logarítmicos los recuentos bacterianos de las superficies cárnicas a temperaturas de refrigeración, presentando un efecto bacteriostático, pero no bactericida.
- Con respecto a los tratamientos con una concentración de ozono entre 276 y 283 mg O₃/m³ se encontró que el parámetro a* fue el más afectado por el de ozono siendo las muestras tratadas durante 40 minutos las que presentaron valores muy bajos de a* (12.23) y un color superficial poco agradable. La aw fue afectada por el ozono, disminuyendo a medida que aumenta la concentración y tiempo de tratamiento.
- El ozono facilita la oxidación lipídica presentando una marcada oxidación las muestras tratadas con mayor concentración de ozono (muestras entre O10-O40) donde los mg MDA/kg de carne se encontraron

Capítulo 4: Tratamiento con ozono gaseoso

por encima del límite de detección de rancidez

- Utilizando una concentración de ozono de 276 mg/m³ y un inóculo de 10³ UFC/ml de *L. monocytogenes* (quedando en la carne una concentración de 10¹ UFC/g), se encontró un efecto positivo del ozono produciendo la reducción de más de 1 ciclo logarítmico de *L. monocytogenes* en las muestras tratadas durante los 5 minutos con respecto a la muestra sin tratar.
- El ozono afectó a *L. monocytogenes* ya que durante 16 días las muestras inoculadas tratadas con ozono, envasadas al vacío y almacenadas a 4°C no presentaron modificación del número de microorganismos.
- Se optimizó el tratamiento de ozono buscando el tiempo y concentración de ozono que produjera una disminución del recuento de microorganismos heterótrofos, sin afectar negativamente el color superficial y la oxidación lipídica y además que reduzca y limite el desarrollo de *Listeria monocytogenes*. Se encontró como tratamiento óptimo (utilizando una concentración de 276 mgO₃/m³ dentro de la cámara) pulsos de corriente de ozono de 5 minutos con refuerzos cada 30 minutos durante un periodo de 5 horas (un total de 50 minutos de contacto con 276 mg de ozono) el cual permitiría obtener las características deseadas.
- El tratamiento con ozono (condición optimizada) no generó cambios sensoriales en el producto al compararlo con la carne sin tratamiento concluyendo que no hubo una diferencia significativa entre las muestras.

CAPÍTULO 5:

TRATAMIENTO CON ALTAS PRESIONES: OPTIMIZACIÓN DEL PRE-TRATAMIENTO QUÍMICO

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

En este capítulo se evaluó el efecto del tratamiento con alta presión hidrostática (APH) sobre muestras cárnicas. Inicialmente se evaluaron diferentes niveles de presión sobre la carne fresca y se determinó el efecto de las APH sobre el color, mediante medidas colorimétricas utilizando la escala Cielab y sobre modificaciones de la estructura debido a la desnaturalización proteica mediante DSC y FTIR. Se utilizaron controles que consistieron en carne fresca sin tratamiento. Se encontró que las muestras cárnicas al someterlas a APH perdían el color rojo característico debido a la desestabilización del pigmento mioglobina.

Se estudió el efecto de un tratamiento con aditivos químicos previo a la aplicación de APH para tratar de evitar la decoloración de la carne. Para ello se estudió la incorporación de diferentes aditivos químicos (nitrito de sodio, ácido ascórbico y cloruro de sodio) a una solución de inmersión con el fin de mejorar el color de la carne, debido a que la nitrosomioglobina es más estable a las altas presiones. Se realizaron determinaciones de color y textura en las muestras tratadas con dos niveles de presión (300 y 600 MPa)

Una vez obtenida la combinación de aditivos de la solución de inmersión que proporcionó el mejor color superficial y aspecto de las muestras cárneas tratadas con APH se procedió a la optimización de las concentraciones de ácido ascórbico y NaNO_2 (manteniendo la concentración de NaCl en 60 g/l), con el fin de lograr un color aceptable en el producto. Se variaron las concentraciones de NaNO_2 (0.05-0.11 g/100 ml) y ácido ascórbico (0-1 g/100 ml), utilizando un Diseño Central Compuesto (DCC) con 9 formulaciones y replicados en el centro. En este ensayo se utilizaron 2 presiones: 300 y 600 MPa. Se utilizó la Metodología de Superficies de Respuesta, y se optimizó buscando el máximo valor de a^* , mínimo valor de L^* y valores de fuerza máxima similares a un tejido sin tratar (entre 2 y 5 N). Luego se estudió el efecto de las soluciones de inmersión y el tratamiento de APH sobre las proteínas miofibrilares.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

5.1 Altas presiones hidrostáticas

La creciente demanda de productos “similares a los frescos” con calidad sanitaria, organoléptica y nutricional ha impulsado el desarrollo de tecnologías alternativas con el objetivo de suplir a las tradicionales o térmicas y garantizar de esta forma lo que el consumidor solicita.

En los últimos años se han introducido diferentes tecnologías emergentes para la conservación de alimentos como el calentamiento utilizando microondas, radiofrecuencia, alta presión hidrostática (APH), campos eléctricos pulsados de alta intensidad, ultrasonido, etc., debido a las consecuencias indeseables que provocan los tratamientos térmicos (pasteurización, escaldado, esterilización) sobre muchos productos, como por ejemplo la disminución del valor nutricional del alimento.

La tecnología de altas presiones hidrostáticas (APH) es una de estas tecnologías emergentes. Se basa en la aplicación de presiones entre 100 y 1000 MPa por tiempos cortos a alimentos envasados en vacío que luego se conservan bajo refrigeración. Estos tratamientos permiten extender la vida útil de los productos sin alterar su frescura y sus propiedades nutricionales (Szerman *et al.*, 2012).

5.2 Equipo y metodología

5.2.1. Aplicación del tratamiento de Altas Presiones Hidrostáticas

El tratamiento de APH se llevó a cabo con el objetivo de evaluar sus efectos sobre las características fisicoquímicas de la carne fresca y del producto cárneo pre-tratado con la solución de inmersión, con el propósito de prolongar el tiempo de conservación del producto.

Procedimiento

El tratamiento de alta presión hidrostática se llevó a cabo en un sistema Stansted Fluir Power (**Figura 5.1**) (modelo FPG9400:922, Cilindros

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

de 2 litros de capacidad, presión máxima de trabajo 900 MPa, rango de temperatura: de -20 a 120 °C) en los establecimientos del Instituto Tecnológico de Alimentos (ITA) del INTA Castelar.

Las muestras de carne (tanto fresca como tratada químicamente) se envasaron de forma individual al vacío en bolsas Cryovac BB4L (Sealed Air, Buenos Aires, Argentina), se agruparon de a 5 bolsas, se enrollaron formando cilindros los cuales luego fueron nuevamente envasados al vacío para evitar dañar el equipo por la ruptura de las bolsas y se sometieron al proceso de APH. Se colocaron 3 cilindros por corrida.

Las presiones utilizadas fueron 100, 200, 300, 400, 500 y 600 MPa y el tiempo de aplicación fue de 5 a 7 minutos. La velocidad de presurización fue 300 MPa/min y la despresurización fue instantánea. La temperatura de trabajo fue 20 ± 5 °C.

Figura 5.1: Equipo de Alta Presión Hidrostática.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

5.2.2. Soluciones utilizadas

El tratamiento con APH modifica el color de la carne, por lo cual es importante hallar la formulación de la solución de inmersión previa al tratamiento con altas presiones que evite este tipo de inconveniente. Además, se ha encontrado que la adición de nitrito a la carne mejora la estabilidad de la mioglobina frente a las altas presiones, modificando el color tras el tratamiento (Rubio, 2007).

Para poder cumplimentar con los objetivos del trabajo de tesis se propusieron diferentes formulaciones de soluciones que incluían diversos aditivos y se analizaron los efectos de la composición de dicha solución y del tratamiento de altas presiones hidrostáticas en los parámetros de color, textura, desnaturalización de proteínas, exudado, actividad acuosa, oxidación lipídica y crecimiento microbiano durante el almacenamiento refrigerado de las muestras.

Las soluciones de aditivos contenían nitrito de sodio, ácido ascórbico y cloruro de sodio, por lo cual sus concentraciones en el producto cárneo se determinaron analíticamente.

5.2.3. Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre las muestras de carne fresca

Se procedió a analizar el efecto de las APH sobre la carne fresca, para ello se prepararon 42 muestras de carne fresca de la forma descrita en la **Sección 2.1**, las cuales fueron envasadas al vacío y sometidas a presión siguiendo el protocolo descrito. Se utilizaron presiones de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 MPa, durante 5 minutos y se realizaron determinaciones de color, DSC y FTIR, para analizar el efecto de las APH sobre las características fisicoquímicas de la carne.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

5.3 Resultados

5.3.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los termogramas de la carne obtenidos por DSC se vieron afectados por los niveles presión utilizados en el tratamiento con APH.

Se observaron diferentes picos de transición particularmente en la carne fresca. Al analizar los termogramas para las muestras tratada con APH en el rango de presiones entre 100 y 600 MPa, se observa una disminución en el área de los picos de las proteínas miofibrilares. A partir de 400 MPa desaparecen los picos no pudiéndose determinar la entalpía. La presurización favorece la desnaturalización proteica. Presiones del orden de 100 a 300 MPa inducen una desnaturalización reversible y presiones superiores a 300 MPa provocan la desnaturalización irreversible de las proteínas (Hoover *et al.*, 1989). La desnaturalización parcial de la proteína causada por los tratamientos de APH estaría relacionada con la desestabilización de interacciones no covalentes en estructuras terciarias y secundarias (Chapleau *et al.*, 2004).

Figura 5.2: Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de dos muestras de carne fresca sometida a tratamiento de APH. 0 MPa (—), 100 MPa (—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—).

5.3.2. Espectroscopía Infrarroja (FTIR)

Como se mencionó en el capítulo 3, para estudiar las modificaciones de las proteínas se utiliza esta técnica, donde se analiza la zona de la amida I que está relacionada con la estructura secundaria de las proteínas tales como hoja β (β -Sheet), α -hélice, giros β (β -Turn), así como estructuras al azar o desordenadas.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Figura 5.3: Ejemplo de espectro FTIR de carne fresca (—), carne fresca sometida a 400 MPa (—) y carne fresca sometida a 600 MPa (—).

Se realizó la deconvolución de esta región para obtener las cuatro bandas correspondientes a estructuras de las proteínas localizadas en las siguientes regiones de la Amida I: entre 1622-1624 cm^{-1} correspondiente a β -Sheet; 1654-1656 cm^{-1} a la fracción de α -Hélice, 1673-1678 cm^{-1} a β -Turn y una banda en 1640 cm^{-1} correspondiente a una estructura desordenada.

En el ensayo se encontró que al someter las muestras a APH se produce una disminución del contenido de α -hélice y un aumento del contenido de estructura desordenada respecto a la carne sin tratamiento (**Figura 5.4**). Estos cambios inducidos por APH indican que las presiones producen un desdoblamiento parcial de las proteínas debido a la modificación de las interacciones no covalentes que estabilizan la estructura secundaria (Martinez *et al.*, 2017).

Figura 5.4: Porcentaje de estructuras de proteínas ((β -Sheet (■), Estructura desordenada (■), α -Hélice (■), β -Turn (■)) de muestras de carne fresca sometida a diferentes presiones (100-600 MPa).

5.3.3. Color

El atractivo color rojo es una característica principal en productos cárnicos. La cantidad del pigmento influye directamente en la intensidad del color rojo, pero no es el único factor ya que el estado químico del pigmento es importante

La luminosidad (L^*) de las muestras aumentó significativamente ($P < 0.05$) al incrementarse la presión (**Figura 5.7**). Esto puede deberse a que los tratamientos de alta presión conducen a cambios en la estructura de las proteínas miofibrilares, provocando una despolimerización como principal efecto (Cheftel y Culioli, 1997; Suzuki *et al.*, 2006). Estos cambios en la estructura podrían explicar el aumento de la luminosidad como un incremento de la relación de la luz reflejada y absorbida por el material (Campus *et al.*, 2008).

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Figura 5.5: Efecto de la presión sobre los parámetros de color. (■) Parámetro L*, (■) parámetro a*, (■) parámetro b*.

En las muestras (CF), el proceso de APH provocó una disminución del valor de a* (**Figura 5.5**); esto se debe a que la mioglobina (proteína sarcoplásmica), responsable del color rojo de la carne, no es estable a las altas presiones, oxidándose a metamioglobina (Rubio *et al.*, 2007).

Al someter las muestras de carne bovina a niveles de presión superiores a 300 MPa se afectan los parámetros de color, atenuando significativamente la tonalidad roja característica en la carne. En la **Figura 5.6** se observa la variación del color en las distintas muestras de carne sometidas a niveles de presión comprendidos entre 100 y 600 MPa. Se observa un mayor efecto de blanqueamiento (decoloración) en las muestras sometidas a alta presión.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Figura 5.6: Cambios de coloración en muestras cárnicas frescas y muestras sometidas a presiones entre 100 y 600 MPa.

5.4 Selección de aditivos a incorporar en la solución de inmersión.

Luego de analizar los resultados obtenidos en los ensayos previos y observar que las altas presiones hidrostáticas provocaban una disminución del color de la carne debido a la desestabilización del cromóforo mioglobina, obteniéndose una carne pálida (efecto más marcado a presiones por encima de 400 MPa) se decidió estudiar el efecto de un tratamiento con aditivos químicos previo a la aplicación de APH.

Se estudió la incorporación de diferentes aditivos a una solución de inmersión con el fin de mejorar el color de la carne. Mediante la utilización de nitrito se produce la formación de la nitrosomioglobina debido a que reacciona con la mioglobina produciendo el cromóforo nitrosado que proporciona la

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

coloración rojiza característica de la carne curada. El ácido ascórbico favorece la descomposición del ión nitrito en óxido nitroso, el que a su vez reacciona con la mioglobina para generar la nitrosomioglobina, además el ácido ascórbico disminuye la formación de nitrosaminas debido a que reduce el nitrito y otros agentes nitrosilantes a NO (Ohshima y Barsth, 1981; Stich *et al.*, 1984).

Se realizaron pruebas preliminares para establecer si la adición de ácido ascórbico (5 g/l) en una solución que contiene NaCl 60 g/l y NaNO₂ 1 g/l proporcionaba un mejor color de la carne sometida a APH. En ensayos previos se establecieron los tiempos de inmersión apropiados para cumplir con los límites permitidos de nitrito de sodio.

Las muestras se dividieron en 3 grupos:

Grupo CF: muestras de carne fresca, no sometidas a tratamiento químico con aditivos.

Grupo WA: muestras de carne fresca, inmersas en una solución que contiene los aditivos antes mencionados sin ácido ascórbico (WA: NaCl 60 g/l, NaNO₂ 1 g/l).

Grupo A: muestras de carne fresca, tratadas en una solución que contiene ácido ascórbico además de los aditivos antes mencionados (A: NaCl 60 g/l, NaNO₂ 1 g/l, ácido ascórbico 5 g/l).

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Durante la preparación de las soluciones que contenían ácido ascórbico se observó un desprendimiento de un gas marrón correspondiente al óxido nítrico por lo que se decidió medir el pH de las soluciones y estandarizarlo en un valor 3.8 para disminuir el desprendimiento del gas.

Se realizó el corte de las rodajas como se explicó en la **sección 2.1**, preparándose 64 discos en total. Se ensayaron dos soluciones de inmersión (WA y A) y 3 presiones diferentes (150, 300 y 600MPa) para el tratamiento APH. Los ensayos control se realizaron incluyendo muestras cárneas frescas sin ningún tipo de tratamiento, y muestras sin el proceso de inmersión, pero sometidas a altas presiones hidrostática. El tiempo de inmersión fue de 3 horas. La aplicación de APH se realizó según lo detallado en la **sección 5.2**. La **Tabla 5.1** muestra el diseño experimental empleado.

Se separaron 2 rodajas de las muestras sumergidas (WA-0 y A-0) sin tratamiento de APH y se procedió a la determinación de nitrito según lo descrito en la **sección 2.8**; las 5 muestras restantes de todas las condiciones se utilizaron para las determinaciones de color y textura. Midiendo los parámetros correspondientes al menos por triplicado en cada rodaja utilizada, mediante los métodos expuestos en las **secciones 2.3.1 y 2.4**.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Tabla 5.1: Diseño experimental empleado para la selección de otros aditivos a incorporar en la solución de inmersión.

Código	Tratamiento de Inmersión	Tratamiento de APH	Nº de muestras
Control (CF-0)	No	0 MPa	5
CF150	No	150 MPa	5
CF300	No	300 MPa	5
CF600	No	600 MPa	5
WA- 0	SI	0 MPa	7
WA-150	SI	150 MPa	5
WA-300	SI	300 MPa	5
WA-600	SI	600 MPa	5
A- 0	SI	0 MPa	7
A-150	SI	150 MPa	5
A-300	SI	300 MPa	5
A-600	SI	600 MPa	5

C: Carne fresca; WA: Sin ácido ascórbico; A: Con ácido ascórbico.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

5.4.1. Resultados y discusión

Las concentraciones de nitrito determinadas en todas las muestras se encontraron entre 0.006 y 0.007 g NaNO₂ /100 g tejido. Estos valores son adecuados debido a que se encuentran por debajo del límite de nitrito de sodio permitido por el Código Alimentario Argentino el cual establece cantidades residuales de nitritos de 150 ppm (0.015g/100g).

El análisis de color y textura reveló que L* y a* dependieron significativamente ($P < 0.05$) de los niveles de presión aplicados y el tratamiento previo, así como de la interacción entre ambos factores.

5.4.1.1. Color

La luminosidad (L*) de las muestras no varió significativamente al emplear 0 y 150 MPa mientras que a partir de 150 MPa se observa un incremento de luminosidad con el aumento de la presión (**Figura 5.7**). De la comparación de dicho parámetro entre las muestras tratadas con las distintas soluciones y la muestra control revelaron que, cuando se aplicaron niveles de presión de 300 y 600 MPa, las muestras control presentaban los valores de L* más altos ($P < 0.05$), lo que demuestra la necesidad de implementar la etapa de inmersión con el fin de reducir el aumento indeseado de luminosidad en las muestras tratadas con APH. Como se mencionó anteriormente la luminosidad de las muestras está relacionada con el blanqueamiento de las muestras debido a la desnaturalización de las proteínas.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Figura 5.7: Variación de la luminosidad (L^*) de las muestras cárneas en función de las condiciones de pre-tratamiento (CF, WA y A) a las diferentes presiones ensayadas 0MPa (■), 150MPa (■), 300MPa (■) y 600MPa (■).

El enrojecimiento de las muestras que no fueron curadas (CF) se redujo al aumentar la presión hidrostática aplicada y se observó una disminución del valor de a^* (Figura 5.8); esto se debe a que la mioglobina (proteína sarcoplásmica), responsable del color rojo de la carne, no es estable a las altas presiones, oxidándose a metamioglobina (Rubio *et al.*, 2007) como ya se mencionó en el capítulo anterior.

Sin embargo, debe señalarse que el valor de a^* tiende a aumentar cuando se aplica una presión mayor en las muestras tratadas químicamente (A y WA), alcanzando valores máximos en las muestras que contienen ácido ascórbico (A) frente a las que no lo contienen (WA). La nitrosomioglobina es más estable a las altas presiones debido a su mayor resistencia a la oxidación que la mioglobina y la oximioglobina (Rubio *et al.*, 2007). El incremento del valor de a^* con la presión de trabajo indicaría que la misma favorece la formación de nitrosomioglobina acentuando la coloración rojiza, lo cual podría estar relacionado con una mayor interacción entre el nitrito y la mioglobina.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Figura 5.8: Variación del parámetro a^* de las muestras cárneas en función de las condiciones de pre-tratamiento (CF, WA y A) a las diferentes presiones ensayadas 0MPa (■), 150MPa (■), 300MPa (■) y 600MPa (■).

Del análisis estadístico de los resultados para el parámetro b^* se puede observar la influencia de las altas presiones y de la interacción pretratamiento - APH. Para las condiciones de control, se observa que a presiones de 300 y 600 MPa los valores son significativamente ($P < 0.05$) mayores que los obtenidos a presiones más bajas, mientras que para **WA** y **A** se mantienen valores de b^* similares al control sin APH.

Mientras que la coordenada a^* está relacionada con el contenido de Mb (Johansson *et al.*, 1991), por su parte, la coordenada b^* dependería más de los diferentes estados en que ese pigmento se encuentra (Pérez Álvarez *et al.*, 1997), que para este estudio serían OMb y MetMb. En las muestras que fueron tratadas con las soluciones de inmersión, el pigmento se encuentra en estado nitrosado, el cual es más estable a las altas presiones, por lo cual se podría decir que la proporción de metamioglobina que podría producirse en las muestras es muy baja provocando una pequeña modificación del

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

parámetro b^* al aplicar APH. En cambio, en las muestras de carne fresca al aplicarles presión se observa un aumento importante del parámetro debido a la formación de metamioglobina. Cuando la superficie de la carne tiene un alto porcentaje de OMb se observa de color rojo brillante, mientras que, si predomina a este nivel el pigmento MetMb, el color resulta amarillo-oscuro a marrón (Strange *et. al*, 1974).

Figura 5.9: Variación del parámetro b^* de las muestras cárneas en función de las condiciones de pre-tratamiento (CF, WA y A) a las diferentes presiones ensayadas 0MPa (■), 150MPa (■), 300MPa (■) y 600MPa (■).

En la **Figuras 5.10** se muestra el aspecto general de las muestras cárneas sometidas a las diferentes condiciones de curado o control y al proceso de alta presión hidrostática posterior. En la misma se observa que la carne no curada sometida a APH va perdiendo gradualmente el color rojo característico de la carne vacuna fresca tal como se discutió en el punto 5.3.4.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Figura 5.10: a) 0 MPa, b) 150 MPa, c) 300 MPa y d) 600 MPa, empezando desde la izquierda se encuentra la carne fresca (CF), luego las muestras WA, A.

5.4.2. Textura

Con respecto a la textura, la Figura 5.12 muestra la máxima variación de la fuerza para los diferentes niveles de presión aplicados conjuntamente a las muestras CF y a las que se le aplicó un tratamiento previo de inmersión.

Los pre-tratamientos químicos así como el nivel de presión aplicada tuvieron una influencia significativa ($P < 0.05$) en la fuerza máxima, aunque no había ninguna interacción entre ambos factores. Para los 3 grupos de muestras – CF, A, WA – la fuerza máxima ($3,77 \pm 0.36$ N promedio de CF, A,

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

WA) a 600 MPa fue significativamente superior en 0, 150 y 300 MPa (valor promedio: 2.73 ± 0.21 N). El control (CF) mostró los valores más bajos de la fuerza máxima en la prueba de compresión 2.56 ± 0.24 N, mientras que aquellos tratados químicamente con (A) y sin (WA) ácido ascórbico no mostraron diferencias significativas (3.32 ± 0.43 N) entre sí ($P > 0.05$). Estos resultados pueden atribuirse a la desnaturalización parcial de las proteínas miofibrilares causadas por el tratamiento químico previo (Graiver et al., 2006) y por la aplicación de alta presión.

El tratamiento de APH a temperaturas superiores a 0 °C puede inducir cambios en la textura de la carne (Sol y Holley, 2010). El efecto de APH a una temperatura > 0 °C en la dureza o terneza de la carne es dependiente del estado de rigor de la carne (Cheftel y Culioli, 1997), el nivel de presión (Ma y Ledward, 2004), la temperatura de trabajo (Beilken, Macfarlane y Jones, 1990) y el tiempo de mantenimiento en la presión de trabajo (Sol y Holley, 2010). Varios autores reportaron que el tratamiento de APH a bajas o moderadas temperaturas causa endurecimiento de la carne post-rigor. Jung, de Lamballerie-Antón y Ghouli (2000) reportaron que el tratamiento de APH (130 o 520 MPa y 10 °C por 260 s) aumenta significativamente la resistencia mecánica de carne post-rigor crudas y cocidas (65 °C, 1 h), en comparación con muestras control. También informaron que existe un efecto del nivel de presión utilizado, encontrando los valores más altos de resistencia mecánica de la carne vacuna en el nivel de presión más alto evaluado (520 MPa). Jung et al., (2000) sugiere que la integridad de las miofibrillas, en lugar del componente conectivo, parece estar implicado en el efecto de APH sobre la textura de la carne. Ellos propusieron que los cambios de las proteínas miofibrilares podrían aumentar la dureza. Ma y Ledward (2004) encontraron que la dureza del músculo de carne de res aumentó con el incremento de la presión desde 200 a 800 MPa cuando el tratamiento se combinó con temperaturas de 20 y 40 °C.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

En la **Figura 5.11** se puede observar la variación de la fuerza para las diferentes presiones empleadas tanto en las muestras control como en las pre-tratadas por inmersión.

Figura 5.11: Variación de la Fuerza máxima de las muestras cárneas en función de las condiciones de pre-tratamiento (C, WA y A) a las diferentes presiones ensayadas 0MPa (■), 150MPa (■), 300MPa (■) y 600MPa (■).

Se concluyó, entonces, que las muestras que tenían mejor color superficial y aspecto luego del tratamiento con APH eran aquellas en las cuales la solución de inmersión contenía NaCl, NaNO₂ y ácido ascórbico. Como presión de trabajo se eligió continuar solamente con 300 y 600MPa, ya que en bibliografía se informa que son indicadas para inactivar los microorganismos que podrían alterar el producto durante su almacenamiento refrigerado (Tellez *et al.*, 2001).

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

5.5 Optimización del pre-tratamiento

5.5.1. Efecto de las concentraciones de ácido ascórbico y NaNO_2 en la solución de inmersión en el color y textura de las muestras de carne

Las concentraciones de ácido ascórbico y NaNO_2 fueron optimizados (manteniendo la concentración de NaCl en 60 g/l), con el fin de lograr un color aceptable en el producto.

Se utilizó la Metodología de Superficies de Respuesta, que se detalla a continuación, para analizar la influencia del nitrito de sodio y del ácido ascórbico en los parámetros de color y textura, así como también para optimizar la formulación de la solución de inmersión.

5.5.2. Metodología de superficie de respuesta (RSM)

La Metodología de Superficie de Respuesta (Myers *et al.*, 2009) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras. El objetivo es optimizar la variable de interés. Esto se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema. Consiste en representar los datos experimentales por medio de una función simple, lineal o cuadrática, llamada superficie de respuesta.

Al decir que un valor de respuesta Y depende de los niveles $x_1, x_2, \dots, x_k$ de k factores, estamos diciendo que existe una función matemática de $x_1, x_2, \dots, x_k$ cuyo valor para una combinación dada de los niveles de los factores corresponde a Y , esto es: $Y = f(x_1, x_2, \dots, x_k)$.

Generalmente se desconoce la relación entre la respuesta y las variables independientes, por ello requerimos un modelo que aproxime la relación funcional entre Y y las variables independientes. La función de respuesta predicha se representa generalmente por medio de una función polinomial de primer o segundo grado.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

El modelo de segundo orden es el siguiente:

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

Eq. 5.1

En este modelo los β_i son los coeficientes de regresión para los términos de primer orden, los β_{ii} son los coeficientes para los términos cuadráticos puros, los β_{ij} son los coeficientes para los términos de interacción y ε es el término del error aleatorio.

Los parámetros del modelo se obtienen por el método de cuadrados mínimos. Para el ajuste del modelo polinómico, también es posible utilizar una metodología “stepwise” para establecer los términos significativos de la ecuación 5.1. Una vez que se tienen los estimadores se sustituyen en la ecuación y obtenemos el modelo ajustado:

$$\hat{Y} = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^k b_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Eq. 5.2

Usualmente, las variables independientes originales se codifican usando una transformación lineal y luego se estiman los parámetros de la regresión. La significancia de los coeficientes estimados y el ajuste del modelo se prueban con el estadístico F.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

El ajuste y análisis de una superficie de respuesta se facilita con la elección apropiada de un diseño experimental. Para ajustar un modelo de segundo orden el diseño experimental debe tener al menos tres niveles de cada factor. Dentro de los diseños rotatables de segundo orden se incluye el Diseño Central Compuesto. Este diseño consiste en un factorial $2k$, donde los factores son codificados de tal manera que el centro sea $(0, 0, \dots, 0)$, aumentado por $2k$ puntos axiales y n puntos centrales. En el caso de $k=2$, el diseño expresado en variables codificadas resulta:

Figura 5.12: Diagrama del Diseño Central Compuesto

5.5.3. Optimización de múltiples respuestas

El propósito del proceso de optimización es la selección, independientemente de la multiplicidad de soluciones potenciales, de la mejor solución con respecto a algún criterio bien definido. La elección de este criterio (función objetivo) es un paso esencial en un estudio (Beveridge y Schechter, 1970). Una función objetivo es aquella que expresa el objetivo en

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

términos de los factores del sistema y/o respuestas. La idea básica del enfoque de la función conveniencia es transformar un problema de respuesta múltiple en un problema de respuesta única por medio de transformaciones matemáticas. Lowe (1967) propuso un procedimiento simple para formar funciones de conveniencia de respuestas múltiples.

La función de conveniencia (del inglés “desirability”), escrita $d_j(y_j)$, establece una relación funcional de la respuesta y_j con los factores o condiciones de operación, de tal manera que su rango es el intervalo $[0,1]$, proporcionando la mayor conveniencia cuando $d_j(y_j) = 1$ y la mínima conveniencia deseada (completamente indeseable) cuando $d_j(y_j) = 0$. En general, la conveniencia de cada respuesta debe ser mayor que cero como condición necesaria para establecer la conveniencia total de un sistema. En el intervalo $[0,1]$, la conveniencia puede tener, según el caso, una variación lineal o no lineal, dependiendo de las condiciones propias del producto y del proceso, que deberá ser previamente definida. Si $(y_{jmin}; y_{jmax})$ son mediciones de los valores más indeseables y más deseables de una respuesta “y”, respectivamente, y si se asume que la conveniencia se incrementa linealmente de y_{jmin} a y_{jmax} , entonces la conveniencia de la respuesta se calcula como (Derringer y Suich, 1980):

$$d_j = \begin{cases} 0 & ; \quad y_{jmin} > y_j \\ \frac{(y_j - y_{jmin})}{(y_{jmax} - y_{jmin})} & ; \quad y_{jmin} \leq y_j \leq y_{jmax} \\ 1 & ; \quad y_j > y_{jmax} \end{cases} \quad \text{Eq. 5.3}$$

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Hay varias formas en las cuales se pueden combinar las conveniencias individuales, una de ellas podría ser la media aritmética. Sin embargo, en la realidad existe una premisa básica: si una característica es tan pobre que no es conveniente el uso del producto, tal producto no debe ser aceptado, a pesar del resto de las características, es decir, una muestra de carne que presente un bajo valor de a^* no puede ser considerada adecuada por más que el parámetro L^* se encuentre en un valor adecuado. La reacción del consumidor a un producto está basada en gran medida en las características menos deseables de dicho producto debido a que son un foco de problemas potenciales (Harrington, 1965). Es por lo que el modelo matemático empleado es la media geométrica de los valores de conveniencia individuales (Harrington, 1965; Derringer y Suich, 1980):

$$D = \sqrt[k]{d_1 * d_2 * \dots * d_k} \quad \text{Eq. 5.4}$$

El valor de D será el más alto en condiciones donde la combinación de los diferentes criterios a nivel global es óptima y será nulo si al menos uno de los atributos resulta completamente indeseable.

5.5.4. Diseño de los experimentos de optimización de la composición de la solución de inmersión.

Del análisis de los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se procedió a la optimización de las concentraciones de NaNO_2 y ácido ascórbico (manteniendo la concentración de NaCl en 6 g/100 ml) para lo cual se llevó a cabo un ensayo donde se variaron las concentraciones de NaNO_2 (0.052 y 0.11 g NaNO_2 /100 ml), ácido ascórbico (0 a 1 g de ácido ascórbico/100ml), utilizando un Diseño Central Compuesto (DCC) con 9 formulaciones y 2 replicados en el centro (**Tabla 5.2**).

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Tabla 5.2: Concentraciones de las diferentes salmueras utilizadas en el DCC.

Soluciones	Variables codificadas		Variables decodificadas	
	NaNO ₂	Ac. ascórbico	NaNO ₂ (g/100 ml)	Ac. Ascórbico (g/100 ml)
1	0	0	0.08	0.5
2	1	-1	0.10	0.15
3	1	1	0.10	0.85
4	-1	-1	0.06	0.15
5	-1	1	0.06	0.85
6	0	-1.414	0.08	0
7	0	1.414	0.08	1
8	1.414	0	0.052	0.5
9	-1.414	0	0.11	0.5

Durante este ensayo se utilizaron 2 presiones: 300MPa y 600MPa.

Se cortaron 66 rodajas de carne, de las cuales se reservaron 6 como control de tejido fresco sin curar. Para cada condición de presión y solución de inmersión se utilizaron 3 discos para la determinación de color y textura, excepto en el centro (solución de inmersión 1) donde la experiencia se realizó por duplicado, utilizándose 6 discos para cada presión.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

El tiempo de inmersión fue de 3 h, y luego se aplicó el tratamiento de APH utilizando niveles de 300 y 600 MPa tanto a las muestras curadas como a las muestras sin curar.

Se calcularon las superficies de respuesta correspondientes a los parámetros de color L^* , a^* y b^* , y a la fuerza máxima alcanzada cuando se realizó una compresión hasta el 30% de la muestra. Posteriormente, utilizando las ecuaciones de conveniencia para cada variable, se buscó una combinación de NaNO_2 y ácido ascórbico que produzca simultáneamente las siguientes características:

- Máximo valor de a^*
- Mínimo valor de L^*
- Valores de Fuerza máxima similares a un tejido sin tratar (entre 2 y 5 N)

Se procesaron, además, muestras destinadas a la determinación de nitrito y cloruro como se detalló en el punto **2.8** y **2.9** para corroborar que no se exceden los límites permitidos; utilizando 2 muestras para cada una de las siguientes condiciones: soluciones 1 y 9, y las dos presiones ensayadas anteriormente.

5.6 Resultados

Se realizaron las determinaciones de nitrito de sodio y cloruro de sodio remanentes, por medio de los métodos descritos en la **sección 2.8** y **2.9**, en el tejido cárneo a dos de las 9 soluciones de inmersión, para corroborar que estén dentro de los valores permitidos en el caso del nitrito y deseado para el cloruro. Para este ensayo se eligió el centro y la formulación que contenía la máxima concentración de NaNO_2 .

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Los resultados se muestran en la **Tabla 5.3** como promedios $\pm$ el error estándar de la media.

Tabla 5.3: Concentración remanente de nitrito de sodio y cloruro de sodio.

Formulación	NaNO ₂ (g /100 g en el tejido)	NaCl (g /100 g tejido cárneo)
1	0.0050 $\pm$ 0.0002	5.29 $\pm$ 0.59
9	0.0058 $\pm$ 0.0003	5.38 $\pm$ 1.44

$\pm$ Error estándar de la media

5.6.1. Metodología de superficie de respuesta

Se obtuvieron las superficies de respuesta de los parámetros de color superficial L*, a* y b* en función de las concentraciones de nitrito y/o ácido ascórbico para cada una de las presiones ensayadas. Se informan únicamente aquellas ecuaciones predictivas donde el ensayo de falta de ajuste determinó que el mismo no era significativo, por lo que se consideró que el modelo era adecuado.

Para el nivel de presión utilizado de 300 MPa se observó que a partir de una concentración de ácido ascórbico de 0.37 g/100 ml en la solución de inmersión, el parámetro a* aumentó con el incremento de la concentración del mismo. Asimismo, se evidenció que dicho parámetro es independiente de la concentración de nitrito de sodio (**Figura 5.13**).

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Para el parámetro b^* no se encontró un modelo adecuado, ningún término de la ecuación general propuesta resultó significativo.

Design-Expert® Software

a^*

20.5695

16.1424

X1 = A: Ascorbico

X2 = B: Nitrito

Figura 5.13: Variación del parámetro a^* en función de las concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico en la salmuera de inmersión para el tratamiento a 300MPa.

En la **Figura 5.14** se visualiza la dependencia de la luminosidad (L^*) con las concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico a 300 MPa. Se evidencia que dicho parámetro disminuye con el aumento de la concentración del ácido ascórbico de la salmuera mientras que presenta una dependencia cuadrática con el contenido de nitrito de sodio; por lo tanto, el mínimo valor de luminosidad se obtendría para la combinación de 1 g/100 ml de ácido ascórbico y 0.085 g/100 ml de nitrito de sodio.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Design-Expert® Software

L*

54.4898

46.227

X1 = A: Ascorbico

X2 = B: Nitrito

Figura 5.14: Variación de la luminosidad (L^*) en función de las concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico en la salmuera de inmersión para el tratamiento a 300MPa.

Las superficies de respuesta para los parámetros de color obtenidos al someter las diferentes muestras cárneas al pre-tratamiento químico y posterior tratamiento de APH a 600 MPa se observan en la **Figura 5.15, 5.16 y 5.17**.

X1 = A: ascorbico

X2 = B: nitrito

Figura 5.15: Variación del parámetro de la luminosidad (L^*) en función de las concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico en la solución de inmersión sometido a 600MPa.

Se observa que el parámetro L^* correlacionó negativamente con la concentración de ácido ascórbico en la solución de inmersión, sin embargo, esta variación de la L^* con la concentración del ácido no fue significativa. El parámetro b^* mostró el efecto opuesto.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Design-Expert® Software

Figura 5.16: Variación del parámetro cromático b^* en función de las concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico en la salmuera de inmersión sometido a 600MPa.

Design-Expert® Software

Figura 4.3: Variación del parámetro cromático b^* (a) y de la luminosidad (L^*) (b) en función de la concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico en la salmuera de inmersión sometido a 600MPa.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Design-Expert® Software

Figura 5.17: Variación del parámetro cromático a^* en función de las concentraciones de nitrito de sodio y ácido ascórbico en la salmuera de inmersión sometido a 600MPa.

Las ecuaciones de las superficies de respuesta obtenidas se muestran a continuación, junto con la probabilidad obtenida para cada modelo, la probabilidad del ensayo de falta de ajuste y el valor de la “precisión adecuada”, que mide el cociente señal/ruido (es deseable un cociente mayor que 4).

A 300 MPa:

$$L^* = 73.89 - 3.07 A - 555.28 N + 3267.2 N^2$$

Eq. 5.5

Modelo: $P=0.0034$

Ensayo de falta de ajuste: $P=1.0$

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Precisión adecuada: 7.60

$$a^* = 18.81 - 3.98 A + 5.31 A^2 \quad \text{Eq. 5.6}$$

Modelo: $P=0.02$

Ensayo de falta de ajuste: $P=0.62$

Precisión adecuada: 5.35

A 600 MPa:

$$L^* = 56.64 - 1.57 A \quad \text{Eq. 5.7}$$

Modelo: $P=0.0212$

Ensayo de falta de ajuste: $P=0.0961$

Precisión adecuada: 5.645

$$a^* = 17.25 + 0.83 A + 0.49 A^2 + 0.90 B^2 \quad \text{Eq. 5.8}$$

Modelo: $P=0.0001$

Ensayo de falta de ajuste: $P=0.0961$

Precisión adecuada: 8.067

$$b^* = 15.64 + 2.08 A - 193.17 N + 1220.8 N^2 \quad \text{Eq. 5.9}$$

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Modelo: $P=0.007$

Ensayo de falta de ajuste: $P= 0.39$

Precisión adecuada: 6.25

Donde:

A= concentración de ácido ascórbico (g/100 ml)

N= concentración de nitrito de sodio (g/100 ml)

Para la optimización de la solución de la salmuera se buscó una combinación de NaNO_2 y ácido ascórbico considerando como función objetivo las siguientes características: máximo de coloración rojo (a^*), mínimo valor de luminosidad (L^*). El propósito fue hallar la combinación de aditivos que proporcionara a las muestras tratadas características similares a la carne fresca, de manera de ser atractiva para el consumidor, ya que una coloración pálida o parda produce rechazo.

Se optimizó por separado para cada presión, obteniéndose en los dos casos la misma composición de la solución de inmersión: 0.06 g NaNO_2 /100 ml, 0.85 g ác. ascórbico/ 100 ml y 6 g NaCl /100 ml.

5.6.2. Validación experimental de la concentración óptima predicha

Una vez encontradas las concentraciones óptimas de NaNO_2 y ácido ascórbico, se procedió a realizar una validación experimental.

Se preparó una solución de inmersión que contenía las concentraciones óptimas teóricas de nitritos y ácido ascórbico obtenidas de las ecuaciones derivadas de las superficies de respuesta. Luego por inmersión de las muestras de carne en esta solución se realizaron experimentos por triplicado. Se colocaron 6 discos de carne en la solución como se explicó en el punto 5.4 y luego fueron sometidas a APH (300 y 600 MPa) y finalmente se realizaron las

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

mediciones de color y textura según lo explicado en 2.3.1 y 2.4. Se incluyó en el experimento muestras control para su comparación.

Se utilizaron las Ecuaciones 5.5, 5.6, 5.7 y 5.8 para predecir los parámetros de color de las muestras. En la **Tabla 5.4** se muestran los parámetros de color predicho y medidos experimentalmente para 300MPa y 600MPa, respectivamente.

Tabla 5.4: Parámetros de color experimental y predicho de las muestras de carne sumergidas en la solución conservante optimizada y tratadas con APH a 300 y 600 MPa.

APH (MPa)	Parámetro	Experimental	Predicho
300	L*	47.46 ± 0.79	49.7
300	a*	19.74 ± 0.56	19.3
600	L*	56.26 ± 0.60	55.30
600	a*	19.31 ± 0.42	17.98

± Error estándar de la media.

Como puede observarse existe una buena concordancia entre los valores de los parámetros de color experimentales obtenidos para la concentración de la solución de inmersión optimizada y los predichos por los modelos de superficie de respuesta.

Además, al comparar los valores experimentales de la carne sumergida en la solución de inmersión óptima con la carne fresca (**Tabla 5.5**) se observó que no hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en el parámetro a^* y b^* , por lo que se logró la combinación de aditivos que proporcionó a las muestras tratadas características similares a la carne fresca.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Tabla 5.5: Comparación de los parámetros a^* y b^* entre la carne fresca y la carne tratada con la solución óptima.

Muestra	Presión (MPa)	a^*	b^*
CF	0	20.20±0.32	8.94±0.12
SOp	300	19.39±0.56	9.60±0.47
SOp	600	19.52±0.41	9.81±0.50

CF: carne fresca, SOp: carne tratada con la solución óptima: 0.06 g NaNO₂/100 ml, 0.85 g ác. ascórbico/ 100 ml y 6 g NaCl/100 ml.

5.6.3. Efecto de las soluciones de inmersión y el tratamiento de APH sobre las proteínas miofibrilares

Para evaluar los cambios de las proteínas miofibrilares después de que las muestras de carne fueron sometidas a una etapa de inmersión en la solución de conservantes optimizada (NaNO₂ 0.06 g /100 ml ácido ascórbico 0.85 g /100 ml y NaCl 6 g/100 ml), con y sin tratamiento posterior de APH se utilizó la técnica de calorimetría diferencial de barrido como se detalló en el Capítulo 2. Los termogramas fueron analizados para la determinación de los cambios de entalpía total; cada ensayo se realizó utilizando al menos tres muestras.

En la **Figura 5.18** se observa el flujo calórico en función de la temperatura para muestra: control y sumergida en solución con y sin presión.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Figura 5.18: Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de carne fresca (—), carne sumergida en la solución de inmersión (—), carne fresca sometida a 300 MPa (—), a 600 MPa (—) y carne sumergida y sometida a 300 MPa (—) y 600 MPa (—).

Un análisis de varianza determinó que la entalpía total (ΔH) dependía significativamente del pretratamiento, de la aplicación o no de APH (300 Y 600 MPa) y de la interacción entre ambos factores. Los resultados se detallan en la siguiente Tabla.

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

Tabla 5.6: Variación de entalpía total (ΔH , w/g) en las diferentes condiciones empleadas.

Pretratamiento	APH (MPa)	ΔH (w/g)
No (carne fresca)	No	22 ± 1.4 c
Si	No	13.5 ± 1.2 b
No (carne fresca)	300	0.22 ^a
Si	300	ND
Si	600	ND
No (carne fresca)	600	ND

^{a,b,c} medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P < 0.05$). ND: no se detecta la endoterma

La inmersión en la solución de muestras que no fueron sometidos a APH disminuyó la entalpía de desnaturalización proteica en un 38.5% con respecto a la carne fresca. La disminución en el pico del termograma de DSC se atribuye a la acción de sales, especialmente NaCl, en la desnaturalización de la proteína miofibrilar.

Diferentes autores analizaron el efecto de la adición de NaCl y otras sales sobre la desnaturalización proteica en diversos sistemas cárneos. Kijowski y Mast (1988) estudiaron las transiciones térmicas de pollo y de las miofibrillas aisladas de pollo (lavadas con agua), y particularmente el efecto que produce la adición de NaCl en diferentes concentraciones: 10- 40 g/L. El análisis reveló que un aumento en la concentración de NaCl condujo a una disminución de la entalpía total. Barbut y Findlay (1991) estudiaron el efecto de la adición de diferentes concentraciones de NaCl, KCl o MgCl₂ (12.5, 25 y 50 g/l) de ternera y encontraron que un aumento en la concentración de sal afecta a la estabilidad térmica de la miosina y actina. Graiver *et al.*, (2006) concluyeron que cuando carne porcina se sumerge en salmuera preparada con

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

5 a 50 g/l de NaCl, la sal activa un proceso de desnaturalización de la proteína. Quinn *et al.*, (1980) trabajaron con distintos músculos de diferentes animales (conejo, cerdo, vaca) y con emulsiones cárnicas (64% humedad, 25% grasa, 8.3% proteína y 2.9% NaCl). Analizaron el efecto del NaCl (13 g/L y 39 g/L) en cada tejido cárneo y observaron que cuando el NaCl es adicionado se producen cambios significativos en las curvas del DSC. Ellos concluyeron que la presencia de NaCl en los músculos y en las emulsiones de carne altera la estabilidad térmica y modificando los picos.

La aplicación de APH, en ambos casos provocó una pérdida casi total de la endoterma correspondiente. Los termogramas de las muestras sometidas a la solución óptima y luego a APH (300 y 600 MPa) mostraron la desaparición de los picos de las proteínas miofibrilares, no pudiéndose determinar la entalpia. La presurización favorece la desnaturalización proteica. A presiones bajas o moderadas (<100 MPa), la formación de enlaces de hidrogeno permite mantener la estructura helicoidal de las proteínas, minimizándose así los efectos sobre éstas. Presiones del orden de 100-300 MPa inducen una desnaturalización reversible y las presiones superiores a 300 MPa provocan la desnaturalización irreversible de las proteínas (Hoover *et al.* 1989).

La presión induce cambios estructurales en el principal constituyente de los filamentos del músculo, que posiblemente son causados por el aumento de la actividad ATPasa a 30 MPa, así como por un aumento de materiales solubles de las miofibrillas potenciado por la presurización por encima de 150 MPa (Bajovic *et al.*, 2012).

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

5.7 Conclusiones parciales

- Al analizar los termogramas (DSC) para las muestras de carne fresca tratada con APH en el rango de presiones entre 100 y 600 MPa, se observa una disminución en el área de los picos de las proteínas miofibrilares. A partir de 500 MPa desaparecen los picos no pudiéndose determinar la entalpía. La presurización favorece la desnaturalización proteica. Mediante FTIR encontramos que al someter las muestras a APH se produce una disminución del contenido de α -hélice y un aumento del contenido de estructura desordenada respecto a la carne sin tratamiento, esto es debido a una desnaturalización concordando con lo obtenido en el DSC.
- Al someter las muestras a mayores presiones se produce un cambio en la matriz lo cual lleva a un blanqueamiento de las muestras. Esto se puede correlacionar con los valores de cromaticidad L^* y a^* donde se observa que a mayor presión aumentan los valores de L^* y disminuye los valores de a^* , indicando un efecto de blanqueamiento de la carne como se pudo observar en las fotos de la carne tratada con altas presiones.
- Se verificó que la nitrosomioglobina formada luego de la utilización de nitrito de sodio en la solución de inmersión fue más estable a las altas presiones, ya que a 600 MPa la disminución del color no fue tan drástica como la observada en la carne sin el pretratamiento con preservadores químicos sometida a la misma presión. Se encontró que el agregado de ácido ascórbico a la solución de inmersión que contenía nitrito de sodio y cloruro de sodio mejoró el aspecto global de la carne curada y sometida a APH, obteniéndose un color deseado en la carne tanto a 300 como a 600 MPa.
- En todos los casos el dosaje de la concentración de nitrito de sodio remanente en el tejido cárneo resultó inferior a la máxima cantidad permitida por el Código Alimentario Argentino (0.015 g/100 g tejido).

Capítulo 5: Tratamiento con APH: optimización del pre-tratamiento químico

- Se comprobó que tanto el tratamiento de inmersión en soluciones salinas como la aplicación de alta presión hidrostática provocó una desnaturalización de las proteínas disminuyendo la entalpía total observadas en los termogramas.
- Se concluyó que la combinación de aditivos de la solución de inmersión que proporcionó el mejor color superficial y aspecto de las muestras cárneas tratadas con APH fue la constituida por 0.06 g NaNO_2 /100 ml, 0.85 g ác. ascórbico/ 100 ml y 6 g NaCl /100 ml.

CAPÍTULO 6: TRATAMIENTO CON APH: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NACL

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

En este capítulo se estudió el efecto de la concentración de sal en las soluciones de inmersión utilizadas en el pretratamiento químico y la aplicación de APH sobre: la microestructura del tejido cárnico, las proteínas presentes en la carne, el color superficial de las muestras y las especies de cromóforo en la carne.

Se determinó la concentración residual de NaCl y NaNO₂ para corroborar que estaban en concentraciones adecuadas para el consumo.

No se encontraron diferencias en la microestructura de la carne al tratarlas con diferentes concentraciones de NaCl (3% (S1) y 6% (S2)) y someterlas dos niveles de APH (400 y 600 MPa).

Por medio de DSC y FTIR se observaron las modificaciones en las proteínas de la carne, encontrándose que tanto las APH como la concentración de sal afectan la estructura de las mismas, desnaturalizando las proteínas y modificando la proporción de las formas de estructuras secundarias presentes (α -hélice, hoja β , giros β y estructuras desordenadas).

Además, se estudió el efecto de las APH en los pigmentos de la carne (mioglobina y sus derivados), encontrándose que las APH provocan una modificación en los cromóforos llevando a la generación de metomioglobina. Respecto a solución de inmersión se comprobó la formación del pigmento nitrosomioglobina el cual no dependió de la concentración de NaCl y se corroboró que este es más estable a las altas presiones.

Se realizó un análisis sensorial para determinar el efecto de la reducción de sal (en la solución de preservadores químicos) y determinar si el producto es aceptado por los consumidores al compararlo con la carne sin tratamiento, encontrándose que las muestras con el pretratamiento químico fueron las más aceptadas por los evaluadores.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

6.1 Consumo de sodio y sus efectos adversos en la salud

La carne y los productos cárnicos procesados contribuyen en un 16 - 25% al total del consumo diario de cloruro de sodio. Son la segunda fuente más importante de sodio en la dieta luego del pan (Weiss *et al.*, 2010). La sal es especialmente importante en las carnes procesadas, contribuyendo a su calidad y características deseables de seguridad alimentaria (Man, 2007). Una mayor ingesta de sodio se ha asociado con enfermedades cardiovasculares (Strazzullo *et al.*, 2009); se ha corroborado una relación directa entre el aumento del consumo de sodio y posterior riesgo de enfermedades cardiovasculares (Strazzullo *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2011).

El aumento del consumo de sodio está asociado con un aumento de la presión arterial, mientras que la reducción del consumo de sodio disminuye la presión sanguínea (Cutler *et al.*, 1997; He *et al.*, 2003; OMS, 2003).

La hipertensión es factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares y se estima que contribuye en un 49% a todas las enfermedades coronarias y en un 62% a todos los accidentes cardiovasculares (Mackay y Mensah, 2004). La hipertensión afecta actualmente a casi la mitad de los adultos de todo el mundo, encontrándose entre los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial.

Las recomendaciones de la Asociación Americana del Corazón (AHA, 2010) indican que es deseable un consumo menor a los 1500 mg de Na⁺/día para adultos, esto corresponde a aproximadamente 5 g NaCl/día. En Argentina el consumo medio de sal asciende a valores entre 10 y 12 g/día según la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2011). Incentivar la disminución del agregado de sal en los hogares no alcanza ya que más del 60% de la sal consumida proviene de alimentos procesados.

Por lo tanto, la reducción del consumo de sal a través de los alimentos constituye actualmente uno de los principales retos planteados por la sociedad debido al aumento progresivo de la incidencia de enfermedades

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

cardiovasculares en la población. En tal sentido analizar el efecto de la reducción de la concentración de cloruro sodio en productos cárnicos sometidos a APH resulta de gran interés.

6.2 Efecto de la concentración de cloruro de sodio en la solución de inmersión

Se estudió el efecto de la disminución de la concentración de cloruro de sodio en la formulación de la solución de inmersión, con el fin de obtener un producto más saludable.

En este ensayo se utilizó corte de nalga bovino, del que se seccionaron en total 90 discos de carne y se sumergieron en forma individual en soluciones que contenían 3 g NaCl /100 ml (S1) o 6 g NaCl /100 ml (S2) y en todos los casos 0.62 g/L NaNO₂ y 8.5 g/L ácido ascórbico, con un periodo de inmersión de las muestras cárneas de 2.5 horas. Luego se procedió a la aplicación de alta presión hidrostática como se detalló en la sección 5.2.1. Al finalizar el tratamiento APH se determinó la concentración de cloruro y de nitrito presentes en las muestras cárnicas siguiendo el procedimiento explicado en 2.8 y 2.9. Los ensayos se hicieron en todos los casos por duplicado.

Se realizó un ensayo utilizando Microscopia electrónica de barrido ambiental (ESEM) como se detalló en la sección 2.14, para observar la microestructura de las muestras de carne sumergidas en las soluciones S1, S2 y sometidas a APH (400 y 600 MPa).

Se realizó un barrido utilizando diferentes niveles de presión (100, 200, 300, 400, 500 y 600 MPa). Se llevaron a cabo determinaciones de FTIR, DSC, color, reflectancia difusa y análisis sensorial. Al utilizar diferentes muestras de carne bovina que las empleadas en los capítulos anteriores en cada caso se muestran los resultados de los respectivos controles a los efectos de tener en cuenta la variabilidad biológica.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

6.3 Resultados

6.3.1. Cuantificación de la concentración residual de NaCl y NaNO₂ en el tejido cárnicos.

Las concentraciones de nitrito de sodio y cloruro de sodio en las muestras cárnicas luego del proceso de APH, fueron: 0.0026 ± 0.0006 g NaNO₂/ 100 g tejido cárnico y 1.95 ± 0.72 g NaCl/100 g tejido cárnico para las muestras sumergidas en la solución S1.

Para las muestras sumergidas en S2, los valores fueron 0.0041 ± 0.0003 g NaNO₂/100 g tejido Cárnico y 5.24 ± 0.53 g NaCl/100 g tejido cárnico. Estos valores se encontraban en rangos aceptables, en cumplimiento de lo establecido en la legislación vigente. La normativa nacional vigente dada por el Código Alimentario Argentino (C.A.A.) sobre aditivos en productos cárnicos, limita las cantidades residuales de nitritos a 150 ppm (0.015g/100g). Según USDA FSIS (1999), el uso de NaNO₂, KNO₃ y sus combinaciones no deben exceder 200 ppm (0.02 g/100g) expresada como NaNO₂ en el producto final. FAO (1991) estableció que la máxima cantidad de nitrito en productos cárnicos acabados es de 0.02g/100kg, o puede ser menor dependiendo del tipo de carne. Sin embargo, el Codex Alimentarius establece que la dosis máxima calculada de nitritos sobre el contenido neto total del producto final, es de 125 ppm (FAO/OMS, 2016). La recomendación actual en la mayoría de los países es reducir la ingesta de sal desde valores de 9-12 a 5-6 g/día (He *et al.*, 2011).

Como se muestra en los resultados, las muestras sumergidas en la solución S2 que contiene la mayor concentración de NaCl también mostraron una mayor concentración residual de nitrito de sodio; este resultado puede atribuirse a la mayor difusividad efectiva de nitrito de sodio con el aumento de las concentraciones de NaCl en la solución de inmersión (Graiver *et al.*, 2006).

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

6.3.2. Microscopia electrónica de barrido ambiental (ESEM)

Para ver cambios en la microestructura del tejido cárnico debido al efecto del pretratamiento de inmersión con las soluciones S1 y S2 con y sin la aplicación de alta presión hidrostáticas en dos niveles (400 y 600 MPa) se observaron muestras al microscopio electrónico como se detalla en la Sección 2.14.

Figura 6.1: microestructura de la carne sometida al pretratamiento con la solución S1 y APH. a) fibras musculares a una magnificación 700X y b) 800X 0MPa, c) 800 X y 400 MPa, d) 800X y 600MPa.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.2: microestructura de la carne sometida al pretratamiento con la solución S2 y APH. a) fibras musculares a una magnificación 700X y b) 700X 0MPa, c) 800 X y 400 MPa, d) 800X y 600MPa.

Al comparar las micrografías en las diferentes condiciones utilizadas no se pudo encontrar diferencia en las fibras musculares (**Figura 6.1** y **Figura 6.2**, en comparación con **Figura 3.5**). Para poder estudiar el efecto del pretratamiento con y sin APH posterior se realizaron estudios más profundos a nivel estructural de las proteínas que componen el tejido carneo mediante determinaciones de calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía de infrarrojo.

6.3.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los termogramas de la carne obtenidos por DSC se vieron afectados por los diferentes niveles de presión del tratamiento APH y por la composición de la solución de inmersión. En la **Figura 6.3** se muestran como las curvas correspondientes a la carne fresca CF y sometidas a presiones entre 100 MPa y 600 MPa.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Se observaron diferentes picos de transición particularmente en la carne fresca. Los primeros picos registrado entre 50 y 70 °C representan el rango de temperatura de desnaturalización de la miosina y el último pico entre 74-84 °C está relacionado con la desnaturalización de actina (ambas proteínas miofibrilares).

Figura 6.3: Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de dos muestras de carne fresca sometida a tratamiento de APH. 0 MPa (—), 100 MPa (—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—).

Para el caso de las muestras tratadas con los preservadores químicos y no sometidas a APH, se observó la disminución de la entalpía total con respecto a la carne fresca; esto podría deberse a la adición de NaCl. Barbut y Findlay (1991) estudiaron el efecto que produce la adición de NaCl, KCl o $MgCl_2$ en diferentes concentraciones (12.5, 25 y 50 g/L) en carne vacuna y concluyeron que un incremento en la concentración de las sales desestabiliza térmicamente a la miosina y a la actina.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.4: Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de muestras de carne tratadas con la solución: a) S1 y b) S2. Sometida a APH. 0 MPa (—), 100 MPa (—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—).

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Al analizar los termogramas para las muestras tratada con APH en el rango de presiones entre 100 y 600 MPa (**Figura 6.3 y 6.4 a,b**), se observa una disminución en el área de los picos de las proteínas miofibrilares a medida que aumenta la presión aplicada. A partir de 500 MPa desaparecen los picos no pudiéndose determinar la entalpía. Las altas presiones favorecen la desnaturalización proteica.

Presiones del orden de 100-300 MPa inducen una desnaturalización reversible y presiones superiores a 300 MPa provocan la desnaturalización irreversible de las proteínas (Hoover *et al.*, 1989).

La desnaturalización parcial de la proteína causada por los tratamientos de APH estaría relacionado con la desestabilización de interacciones no covalentes en estructuras terciarias y secundarias (Chapleau *et al.*, 2004).

6.3.4. Espectroscopía Infrarroja (FTIR)

Como se mencionó en la **Sección 3.9**, la banda de la Amida I localizada entre 1600 y 1700 cm^{-1} (**Figura 6.5**) fue analizada debido a que esta región es más sensible a cambios en las proteínas miofibrilares. Se obtuvieron los espectros de deconvolución para obtener una visión de los cambios en las estructuras secundarias (hoja β (β -Sheet), α -Hélice, giros β (β -Turn estructuras al azar o desordenadas).

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.5: Ejemplo de espectro FTIR de carne fresca (—), carne sumergida S1 (3%) y sometida a 400 MPa (—) y carne sumergida S2 (6%) a 400 MPa (—).

Se encontraron las cuatro bandas correspondientes a estructuras de las proteínas localizadas en las regiones de la Amida I entre 1622-1678 cm^{-1} .

En el ensayo se encontró que al someter las muestras a APH se produce una disminución del contenido de α -Hélice y un aumento del contenido de estructura desordenada respecto a la carne sin tratamiento (Figura 6.6 y 6.7). Estos cambios inducidos por APH indican que las presiones producen un desdoblamiento parcial de las proteínas debido a la modificación de las interacciones no covalentes que estabilizan la estructura secundaria (Martinez *et al.*, 2017).

Se observa que las muestras tratadas con la solución de inmersión presentaron una mayor estabilidad a las altas presiones, observándose una disminución más atenuada en el porcentaje de α -Hélice. Al comparar el

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

efecto de las concentraciones de cloruro de sodio (S1 y S2) las muestras que tenían mayor cantidad de NaCl (S2) resultaron menos estables; esto puede estar relacionado con la desestabilización que produce esta sal en las proteínas. (Graiver *et al.*, 2006). (Figuras 6.6 y 6.7).

Figura 6.6: Porcentaje de estructuras de proteínas: β -Sheet (■), Estructura desordenada (■), α -Hélice (■), β -Turn (■) de carne sumergida en la solución S1 (3%) y luego sometida a diferentes presiones.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.7: Porcentaje de estructuras de proteínas: β-Sheet (■), Estructura desordenada (■), α-Hélice (■), β-Turn (■) de carne sumergida en la solución S2 (6%) y luego sometida a diferentes presiones.

6.3.5. Coloración superficial

En la **Figura 6.8** se observan las imágenes que permiten visualizar la variación del color en las distintas muestras de carne con y sin tratamiento químico (S1, S2) sometidas a dos niveles de presión (100 y 600 MPa). Se observa un mayor efecto de blanqueamiento (decoloración) en las muestras sometidas a la mayor presión (600 MPa) con y sin tratamiento previo con preservadores químicos.

El tratamiento con las soluciones preservadoras conteniendo nitrito conduce a la formación de nitrosomioglobina que es más estable a las altas presiones, atenuando el efecto decolorante de las altas presiones. La concentración de cloruro de sodio en la solución preservadora también

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

influye en la coloración superficial.

Figura 6.8: Cambios de coloración en muestras cárnicas frescas (CF) y tratadas con 3 y 6 % de NaCl sometidas a 100 y 600 MPa.

Las diferentes condiciones de tratamiento previo a APH (S1, S2 o control), las presiones empleadas y la interacción entre los dos factores, influyeron significativamente ($P < 0.05$) en los parámetros de color.

La luminosidad (L^*) de las muestras aumentó significativamente ($P < 0.05$) al incrementarse la presión (**Figura 6.9**) y varió significativamente con el tratamiento de curado. Esto puede deberse a que los tratamientos de alta presión conducen a cambios en la estructura de las proteínas miofibrilares, provocando despolimerización como principal efecto (Cheftel y Culioli, 1997; Suzuki *et al.*, 2006). Estos cambios en la estructura podrían explicar el aumento de la luminosidad como un incremento de la relación de la luz reflejada y absorbida por el material (Campus *et al.*, 2008).

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.9: Variación de la luminosidad (L^*) de las muestras cárnicas en función de las condiciones de curado a las diferentes presiones ensayadas.

Carne fresca CF (■), carne sumergida en la solución S1 (3%) (■) y carne sumergida en la solución S2 (6%) (■).

En las muestras control que no fueron tratadas con la solución de inmersión (CF), el proceso de APH provocó una disminución del valor de a^* (Figura 6.10); esto se debe a que la mioglobina (proteína sarcoplásmica), responsable del color rojo de la carne, no es estable a las altas presiones, oxidándose a metamioglobina (Rubio *et al.*, 2007).

En cambio, el valor de a^* se incrementó con el aumento de la presión en las muestras sumergidas en la solución de inmersión, lo cual podría atribuirse a la formación de nitrosomioglobina, proteína más estable a las altas presiones debido a su mayor resistencia a la oxidación que la mioglobina y la oximioglobina (Rubio *et al.*, 2007). El incremento del valor de a^* con la presión aplicada indicaría que la misma favorece la formación

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

de nitrosomioglobina acentuando la coloración rojiza.

En función de la solución de inmersión, las muestras que tienen mayor concentración de NaCl (S2) presentaron valores de a^* mayores, lo cual está relacionado con la mayor difusión efectiva de NaNO_2 favorecida por el NaCl (Graiver *et al.*, 2006).

Figura 6.10: Variación del parámetro a^* de las muestras cárnicas en función de las condiciones de curado a las diferentes presiones ensayadas. Carne fresca (■), carne sumergida en la solución S1 (3%) (■) y carne sumergida en la solución S2 (6%) (■).

El método de medición colorimétrica en función de los parámetros L^* a^* si bien cuantifica los cambios de coloración superficial en función de índices no permite identificar las especies químicas derivadas de la mioglobina que provocan dichos cambios. Por tal motivo y dado que existe escasa información sobre esta temática se aplicó un método más complejo de reflectancia difusa que logra un análisis más exhaustivo de la información obtenida.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

6.4 Reflectancia difusa

Las medidas de color en la carne están determinadas por la proporción relativa de oximioglobina (MbO_2), mioglobina (Mb) y metamioglobina (MetMb) (Francis y Clydesdale, 1975). Broumanad *et al.* (1958), desarrollaron un método espectrofotométrico para determinar los estados de la mioglobina contenida en extractos de superficie de carne.

Debido a que el procedimiento de extracción tiene un error considerable, se propuso el método de reflectancia difusa, el cual es un método no destructivo y está basado en el espectro de reflectancia de las muestras de carne que excluye los errores debidos a la extracción y fue introducido por Dean y Ball en 1960 y modificado por Stewart *et al.*, (1965) para determinar pigmentos totales y porcentaje de mioglobina.

6.4.1. Espectros de reflectancia difusa en carne fresca

La **Figura 6.11** muestra el espectro de reflectancia difusa en función de la longitud de onda para la carne fresca.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.11: Espectros de reflectancia difusa de 3 muestras de carne fresca para evidenciar las diferencias entre animales.

Esta forma de curva es típica de la oximioglobina la cual exhibe una reflectancia mínima a 545 y 575 nm según lo expuesto por Ryoichi (2000). Esto puede ser debido a que los cortes vacunos fueron obtenidos en un mercado y expuestos al oxígeno durante su manipulación.

Esta curva es similar a la obtenida por Larenas-Muñoz *et al.* (2016), para diferentes cortes de carne bovina.

Para desarrollar un método que permita medir las concentraciones de los pigmentos que colorean la carne es preciso basarse en la teoría de Kubelka-Munk.

La **Figura 6.12** muestra los espectros de reflectancia de oxi, mio y metamioglobina

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.12: Espectro de reflectancia de diferentes estados de la mioglobina (Snyder, 1965).

6.4.1. Teoría de Kubelka-Munk

La teoría de Kubelka y Munk aplicada en los puntos isobécticos correspondientes y a longitudes de onda determinadas por cada pigmento de la carne es la adecuada para seguir la evolución de la concentración de dichos pigmentos. Puntos isobécticos son aquellas longitudes de onda del espectro de absorción de una muestra donde la absorbancia total no cambia durante reacciones químicas o cambios físicos. En el caso de la carne, cuyo cromóforo es la Mb y sus derivados, a dicha longitud de onda las mencionadas especies tienen el mismo coeficiente de absorción por unidad de concentración. Esta teoría que se aplica al análisis de las modificaciones del color superficial en carne permite determinar coeficientes de carácter óptico como coeficientes de dispersión y de absorción, los que describen la

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

cantidad de luz implicada en la dispersión y absorción a una determinada longitud de onda del camino recorrido por el haz luminoso.

Para aplicar la teoría de Kubelka-Munk al tejido muscular, la carne puede considerarse como una matriz de material celular capaz de dispersar la luz, proteínas miofibrilares, tejido conectivo y pigmentos responsables de la absorción del haz luminoso que atraviesa la muestra (MacDougall, 1970).

La intensidad de la luz reflejada y por consiguiente su color y apariencia estarán determinadas por la interrelación de los componentes del sistema que dispersan la luz y la concentración y propiedades de absorción de los pigmentos. Los pigmentos coloreados absorben la luz mientras que la estructura incolora y las proteínas miofibrilares absorben y dispersan la misma.

6.4.2. Ecuaciones de la Teoría de Kubelka-Munk para tejido muscular que contiene oxi, mio y metamioglobina

Para aplicar estas ecuaciones es necesario conocer la relación (K/S) del material con el cuál se está trabajando donde K es el coeficiente de absorción y S el de dispersión (Lozano, 1978, Bevilacqua y Zaritzky, 1985)

La relación de K/S está vinculada con la reflectancia R_{∞} mediante la ecuación:

$$K/S = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2 R_{\infty}} = F(R_{\infty}) \quad \text{Eq. 6.1}$$

donde:

R_{∞} es la reflectancia de una muestra opaca cuyo espesor es tal, que al incrementarlo no se produce cambio en la reflectancia. R_{∞} (transmitancia nula) está relacionado con la absorbancia mediante $A_r = -\log R_{\infty}$ (Kortüm, 1969; Wendlant y Hecht, 1966).

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Snyder (1965) ajustó las curvas del espectro a reflectancia común a 525 nm para solucionar el problema de la influencia de la matriz de la carne.

Franke y Solberg (1971) midieron concentración relativa de MetMb ajustando el espectro a un valor constante de 750 nm y midiendo absorbancia a 632 nm; Eagerman *et al.*, (1978) propusieron un procedimiento rápido para seguir la oxidación o reducción en la carne basado en diferencias de reflectancia a 632 y 614 nm; Attrey y Sharma (1979) compararon diferentes métodos y concluyeron que la relación K/S a 572 y 525 nm daban resultados más consistentes que otras longitudes de onda para la evaluación de MetMb en carne ovina; Krzywicki (1979) propuso un método para determinar la concentración relativa de los tres pigmentos utilizando reflectancia espectrofotométrica pero adoptando los coeficientes de absorción obtenidos por Broumand *et al.*, (1958) en extractos de carne.

Si bien la autooxidación de oximioglobina en soluciones fue estudiada por varios investigadores (Brow y Mebine, 1969; Bembers y Satterlee, 1975), existe poca información sobre constantes de oxidación de mioglobina y reacciones de oxidación en carne (Satterlee y Hansmeyer, 1974; Ledward *et al.*, 1977). El espectro se ajusta de modo que el valor de la reflectancia en la escala de absorbancia sea 1 a 525 nm que es el punto isosbético de los tres derivados de la mioglobina. Con este ajuste, el punto isosbético de MbO₂ y Mb a 474 y el punto isosbético de Mb y MbO₂ a 572 m son reproducibles (Snyder, 1965).

Planteando la ecuación 6.1 para el caso de carne, considerando como sustrato a la matriz que sostiene los pigmentos oximioglobina, mioglobina y metamioglobina:

$$F(R_{\infty})_{\lambda} = \frac{K}{S} = \frac{\sum K_i C_i + Km}{S} = \frac{K_{MbO_2} C_{MbO_2} + K_{Mb} C_{Mb} + K_{MrtMb} C_{MrtMb} + Km}{S} \quad Eq. 6.2$$

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

$F(R_\infty)$: función de Kubelka y Munk para una mezcla de pigmentos sostenidos por una matriz y λ : longitud de onda elegida para hacer la medición.

- C: concentraciones de los pigmentos y del sustrato según los subíndices.
- S: coeficientes de dispersión
- K: coeficientes de absorción

$$F(R_\infty)_\lambda = \frac{K_{MbO_2} C_{MbO_2} + K_{Mb} C_{Mb} + K_{MetMb} C_{MetMb}}{S} + \frac{K_m}{S} \quad Eq. 6.3$$

Llamando:

$$F_o(R_\infty) = \frac{K_m}{S} \quad Eq. 6.4$$

Resulta:

$$F(R_\infty)_\lambda - F_o(R_\infty) = \left(\frac{K_{oxi} C_{oxi} + K_{mio} C_{mio} + K_{met} C_{met}}{S} \right)_\lambda \quad Eq. 6.5$$

Planteando la ecuación 6.5 para puntos isosbésticos: $\lambda = 525$ nm donde la mioglobina, oximioglobina y la metamioglobina absorben igual (Bevilacqua y Zaritzky, 1985)

$$K_{MbO_2}^{525} = K_{Mb}^{525} = K_{MetMb}^{525} \quad Eq. 6.6$$

Se llega a:

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

$$F(R_{\infty})_{525} - F_o(R_{\infty}) = \frac{K_{Mb=MetMb=MbO_2}^{525}}{S} (C_{MbO_2} + C_{Mb} + C_{MetMb}) \quad Eq. 6.7$$

Como, además:

$$C^{tot} = C_{oxi} + C_{mio} + C_{met} \quad Eq. 6.8$$

En $\lambda = 572$ nm se encuentra el punto isobiéstico que comparten la mioglobina y la oximioglobina $\Rightarrow K_{oxi} = K_{mio}$

Planteando la ecuación 6.5 en este punto:

$$F(R_{\infty})_{572} - F_o(R_{\infty}) = \frac{K_{MbO_2=Mb}^{572} (C_{Mb} + C_{MbO_2}) + K_{MetMb}^{572} C_{MetMb}}{S} \quad Eq. 6.9$$

Llamando

$$F(R_{\infty}) - F_o(R_{\infty}) = \Delta F$$

$$\Delta F^{525} = \frac{K_{Mb=MetMb=MbO_2} C^{tot}}{S} \quad Eq. 6.10$$

la ecuación 6.9 queda:

$$\Delta F^{572} = \frac{(K/S)_{Mb=MbO_2}^{572} (C^{tot} - C_{MetMb})}{C_s} + \frac{(K/S)_{MetMb}^{572} C_{MetMb}}{C_s} \quad Eq. 6.11$$

Dividiendo la ecuación 6.12 por la ecuación 6.11, tenemos:

$$\frac{\Delta F^{572}}{\Delta F^{525}} = \frac{(K/S)_{Mb=MbO_2}^{572}}{(K/S)_{Mb=MbO_2=MetMb}^{525}} - \frac{(K/S)_{Mb=MbO_2}^{572} x^{MetMb}}{(K/S)_{Mb=MbO_2=MetMb}^{525}} - \frac{(K/S)_{MetMb}^{525} x^{MetMb}}{(K/S)_{Mb=MbO_2=MetMb}^{525}} \quad Eq. 6.12$$

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Considerando que la fracción de cada compuesto X_i es:

$$X_i = \frac{C_i}{C_t} \quad \text{Eq. 6.13}$$

Trabajando de la misma manera con el punto isobiéstico de $\lambda = 473$ nm se obtiene la expresión para calcular la fracción de mioglobina:

$$X^{Mb} = \frac{\left((\Delta F^{473} / \Delta F^{525}) - (K/S)_{MbO_2=MetMb}^{473} \right)}{\left(\frac{(K/S)_{Mb}^{473}}{\left((K/S)_{Mb=MbO_2=MetMb}^{525} \right)} - \frac{(K/S)_{Mb=MetMb}^{473}}{\left((K/S)_{Mb=MbO_2}^{572} \right)} \right)} \quad \text{Eq. 6.14}$$

Reordenando se permite calcular la fracción de metamioglobina con la ecuación:

$$X^{MetMb} = \frac{\left(\frac{\Delta F^{572}}{\Delta F^{525}} - \frac{(K/S)_{Mb=MbO_2}^{572}}{(K/S)_{Mb=MetMb=MbO_2}^{525}} \right)}{\left(\frac{(K/S)_{MetMb}^{572}}{(K/S)_{Mb=MetMb=MbO_2}^{525}} - \frac{(K/S)_{Mb=MbO_2}^{572}}{(K/S)_{Met=Mb=MbO_2}^{525}} \right)} \quad \text{Eq. 6.15}$$

Para calcular la fracción oximioglobina:

$$X_{MbO_2} = \frac{\frac{\Delta F_{580}}{\Delta F_{525}} (K/S)_{Mb=MbO_2=MetMb}^{525} + x^{MetMb} \left[(K/S)_{580}^{Mb} - (K/S)_{580}^{MetMb} \right] - (K/S)_{580}^{Mb}}{\left((K/S)_{580}^{MbO_2} - (K/S)_{580}^{Mb} \right)} \quad \text{Eq. 6.16}$$

Bevilacqua y Zaritzky (1985) utilizando sistemas modelos con concentraciones conocidas de pigmentos de oximioglobina, mioglobina y metamioglobina, desarrollaron un procedimiento de cálculo utilizando la teoría de Kubelka-Munk, obteniendo las siguientes ecuaciones para determinar la fracción de cada pigmento en muestras de carne:

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

$$X_{MetMb} = 1.58 - 1.05 (\Delta F_{572} / \Delta F_{525}) \quad Eq\ 6.17$$

$$X_{Mb} = 2.24 - 2.38 (\Delta F_{473} / \Delta F_{525}) \quad Eq\ 6.18$$

$$X_{MbO_2} = 1.685 X_{MetMb} + 1.85 (\Delta F_{580} / \Delta F_{525}) - 2.65 \quad Eq\ 6.19$$

6.4.3. Determinación de reflectancia para los pigmentos mio, meta, oxi y nitrosomioglobina en muestras de tejido (Muestras de referencia)

La reflectancia difusa es la técnica recomendada especialmente para seguir los cambios de color del músculo cárnico o para la estimación de las distintas formas de la mioglobina (Hunt *et al.*, 1991).

Para este ensayo no destructivo se seleccionó el espesor de las piezas de forma que pudiera considerarse, R_∞ , que es la reflectancia de una capa suficientemente gruesa como para que un cambio de espesor no modifique el valor de reflectancia. Se seccionaron muestras circulares de carne (3 cm de diámetro, 4 mm de espesor) que se ajustaban a las dimensiones del portamuestras del equipo. Se registraron medidas entre 400 y 800 nm.

Se determinaron los espectros de reflectancia en muestras de carne denominadas de referencia conteniendo los pigmentos mioglobina, metamioglobina, oximioglobina y nitrosomioglobina. Para ello se modificó el estado de la mioglobina siguiendo tres protocolos. La mioglobina de las muestras de carne fresca fue convertida a metamioglobina mediante la inmersión de las mismas en ferrocianuro de potasio 1% durante 3 minutos, una vez escurridas las muestras y secadas se envasaron en una bolsa plástica permeable al oxígeno durante 12 h a 4 °C para que se lleve a cabo la oxidación del pigmento. Para la formación de oximioglobina se expusieron las muestras de carne en un ambiente oxigenado a 4 °C durante 2 h y se midió la reflectancia difusa inmediatamente. Para obtener

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

nitrosomioglobina las muestras de carne fresca fueron sumergidas en una solución compuesta por 2 g/L NaNO_2 , 30 g/L NaCl y 8.5 g/L ácido ascórbico, durante 2.5 h, una vez escurridas y secadas fueron envasadas al vacío. Para la mioglobina, se utilizó carne recién cortada evitando las zonas en la cuales estuvo la muestra en contacto con el aire.

En primer lugar, se obtuvieron los espectros de los pigmentos puros y la matriz, luego se calcularon los (K/S) para las distintas longitudes de onda que eran de interés. Para independizar los valores de la función Kubelka-Munk de los pigmentos respecto a los correspondientes a la matriz, se sustrajo de los espectros el valor de dicha función correspondiente a la matriz sin colorear para realizar los cálculos.

En la **Figura 6.13** se pueden observar los espectros de reflectancia obtenidos para la mioglobina, oximioglobina, metamioglobina y nitrosomioglobina, obtenidos luego de tratar a las muestras de carne fresca. En el caso del espectro de mioglobina, debido a que las muestras de carne utilizadas son obtenidas de un local comercial y están expuestas al oxígeno, se debió digitalizar un espectro de bibliografía, ya que los obtenidos presentaban el formato de las curvas de oximioglobina.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.13: Espectro de reflectancia en función de la longitud de onda para muestras Matriz (—), Metamioglobina (—), Mioglobina (—), Oximioglobina (—), Nitrosomioglobina (—).

Luego se determinó la función de remisión la cual es proporcional a la concentración de los pigmentos de la carne (**Figura 6.14**). Esto nos permite ver la diferencia entre las curvas de cada pigmento y la matriz para luego comparar con las muestras tratadas con APH.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.14: Espectro de la función de Kubelka Munk en función de la longitud de onda para muestras Matriz (—), Metamioglobina (—), Mioglobina (—), Oximioglobina (—), Nitrosomioglobina (—).

Se puede observar que la matriz influye muy poco en la absorción de la carne. Se vislumbra el punto isobéptico común de las especies en 525 nm, donde ahora se incorpora a NitroMb. Considerando esto, se procedió a normalizar todo el espectro en 525 nm, ajustando el $F(R_{525})$ de las otras especies al mismo valor que el de MetaMb. Se tomó como referencia el espectro de MetaMb pues es el que presentó menor variabilidad entre muestras. El procedimiento de normalización implica multiplicar cada espectro por un factor de normalización tal que ajuste $F(R_{525})$ al valor requerido. Esto produce cambios muy bajos, 4% (factor 0.96), en Mb, del 17% (factor 0.83) para NitroMb y del 37% (factor 0.63) para OxiMb. Estos factores reflejan la variabilidad inherente a diferentes muestras cárnicas, pudiéndose observar que el espectro que presenta una desviación más apreciable respecto de las demás especies es el de OxiMb. En la **Figura 6.15**

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

se muestran las curvas de $F(R)$ normalizadas a 525 nm para las distintas especies de la mioglobina.

Figura 6.15: Espectro de la función de Kubelka Munk normalizado en función de la longitud de onda para muestras Matriz (—), Metamioglobina (—), Mioglobina (—), Oximioglobina (—), Nitrosomioglobina (—).

A partir de esta normalización surgen otros puntos isobécticos entre las distintas especies. Como puede observarse en la **Tabla 6.1** estos puntos isobécticos coinciden con los reportados en bibliografía (Snyder, 1965). Se encontraron además otros puntos isobécticos (NitroMb-Mb a 563 y 593 nm y Mb-MetaMb a 460 y 605 nm) y máximos de absorción (580 y 542 nm para OxiMb, 510 y 630 nm para MetaMb). Otro punto interesante es notar que alrededor de 730 nm todas las especies presentar un $F(R)$ similar (0.69 ± 0.14) y que es superior al valor de la matriz.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Tabla 6.1: Puntos isobésticos entre los diferentes pigmentos

	Experimental	Bibliografía (Snyder, 1965)
Todas las especies	525 nm (ajustado)	525 nm
MetaMb-OxiMb-NitroMb	472 nm	473 nm
OxiMb-Mb	571 nm	572 nm

Para verificar la identidad de los espectros determinados, se calculó con ellos la absorbancia $A = -\log(R)$ y se los comparó con los espectros publicados, además se calcularon la relación de los valores K/S para cada forma de los derivados de la mioglobina en diferentes longitudes de onda y se compararon con los presentados en literatura (Tabla 6.2).

Figura 6.16: Comparación de las curvas obtenidas para los patrones y la encontrada en bibliografía. Oximioglobina (—), mioglobina (—), metamioglobina (—) y matriz (—). Bevilacqua y Zaritzky, 1985.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Como puede observarse en la **Figura 6.16** la coincidencia es buena, tanto en forma como en intensidad, incluso para la matriz. Esto demuestra que se medió correctamente los espectros de las especies y que ajustar $F(R525)$ al valor de MetaMb fue adecuado, dando seguridad sobre los espectros obtenidos de las especies.

En la **Tabla 6.2** se muestran los valores obtenidos de (K/S) para los pigmentos oxi, mio, metamioglobina y nitrosomioglobina para las distintas longitudes de onda. Dichos valores se encuentran divididos por el valor $(K/S)_{525}$, con esto se logra independizar el valor $(K/S)_\lambda$ de la cantidad de pigmento total que contuviera cada muestra de carne. Esto está avalado por el trabajo de Stewart *et al.* (1965) que tiene en cuenta la cantidad total de pigmento contenido.

En la **Tabla 6.2** los valores marcados dentro de la misma fila corresponden a los puntos isosbéticos los cuales presentan valores comparables como puede observarse.

Los resultados de la **Tabla 6.2** son comparables con los reportados en bibliografía. Con esto podemos concluir que los espectros obtenidos corresponden a los diferentes derivados de la mioglobina y a partir de estos podemos analizar el efecto de las altas presiones y los procesos de tratamiento químico sobre la mioglobina y relacionarlo con la modificación del color que se producen en las muestras tratadas.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Tabla 6.2: Comparación de proporción K/S para los pigmentos de la carne.

Relación de valores de K/S a dos longitudes de onda					
	OxiMb	Mb	MetaMb	NitroMb	Fuente
r 572/525	1.40±0.16	1.40±00.16	0.56±0.04		Stewart <i>et al.</i> 1965
r 572/525	1.33±0.07	1.33±0.08	0.61±0.04		Snyder y Armstrong 1967
r 473/525	0.96±0.04	0.54±0.4	0.96±0.02		Pierson <i>et al.</i> 1970
r 572/525	1.37±0.05	1.37±00.05	0.62±0.02		
r 473/525	0.92±0.03	0.58±0.04	0.90±.02		
r 572/525	1.49±0.04		0.55±0.03		Van der Oord and Wesdorp 1917a
r 473/525	0.91±0.01		1.06±0.02		
r 572/525	1.50±0.03	1.50±0.02	0.55±0.02		
r 473/525	0.94±0.02	0.52±0.03	0.94±0.04		Bevilacqua <i>et al.</i> 1985
r 580/525	1.97±0.03	1.43±0.03	0.52±0.03		
r 572/525	1.38±0.06	1.29±0.08	0.64±0.05	1.36±0.09	
r 473/525	0.85±0.06	0.65±0.04	0.91±0.04	0.89±0.06	
r 580/525	1.87±0.09	1.25±0.07	0.61±0.05	1.34±0.06	Presente estudio
r 593/525	0.58±0.03	0.85±0.05	0.57±0.03	0.89±0.05	
r 563/525	1.15±0.07	1.32±0.07	0.66±0.06	1.34±0.07	

± el desvío estándar

± e1 desvío estándar

6.4.4. Resultados de Reflectancia Difusa en muestras sometidas a tratamiento químico y altas presiones

Se realizaron los espectros de las muestras cárnicas sometidas a diferentes niveles de presión entre 100 y 600 MPa, para ello se cortaron 36 discos de carne de los cuales 12 fueron sometidos directamente a APH, 12 fueron tratados previamente con la solución S1 y los 12 restantes con la

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

solución S2; posterior al pretratamiento químico fueron sometidos a los diferentes niveles de presión.

El objetivo de este ensayo fue determinar el estado de la mioglobina tanto en la carne fresca como en las carnes con tratamiento químico, y la modificación del cromóforo luego de ser sometidos a los diferentes niveles de presión.

Los resultados obtenidos luego de medir la reflectancia de las muestras de carne fresca y de las muestras tratadas con las soluciones S1 y S2, todas sometidas a APH (100-600MPa) se representan en las siguientes figuras. Además, se graficaron los $F(R)$ para cada situación.

En las **Figuras 6.17a , 6.18a y 6.19a** se puede observar el efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre la reflectancia difusa de las muestras cárnicas.

Al someter las muestras a presiones mayores a 200 MPa se produce un cambio en la matriz evidenciado por un aumento en los valores de reflectancia, lo cual lleva a un blanqueamiento de las muestras. Esto coincide con lo observado en las fotografías de la **Figura 6.8**.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.17: Carne fresca a) Espectro de reflectancia difusa, b) Espectro de la función de Kubelka Munk de: Matriz (—), 0 MPa (—), 100 MPa (—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—).

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.18: Carne sumergida en la solución de inmersión S1, a) espectro de reflectancia difusa, b) Espectro de la función de Kubelka Munk de: Matriz (—), 0 MPa (—), 100 MPa (—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—).

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.19: Carne sumergida en la solución de inmersión S2, a) espectro de reflectancia difusa, b) Espectro de la función de Kubelka Munk de: Matriz (—), 0 MPa (—), 100 MPa (—), 200 MPa (—), 300 MPa (—), 400 MPa (—), 500 MPa (—) y 600 MPa (—).

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Asimismo, en las Figuras 6.17b, 6.18b y 6.19b se observan modificaciones en los cromóforos que están determinadas por los cambios en los F(R) en el intervalo entre 500 y 600 nm. Esto se puede evidenciar al comparar las curvas de las muestras sometidas a 400, 500 y 600 MPa con la obtenida en la matriz decolorada. Al correlacionar estos resultados con los valores de cromaticidad L*, donde se observa que a mayor presión aumentan los valores de L*, indicando un efecto de blanqueamiento de la carne, que se vincula con los aumentos registrados en la reflectancia de las muestras.

Figura 6.20: Proporción de las especies de mioglobina presentes luego de la aplicación de APH a muestras de carne fresca. Mioglobina (—), oximioglobina (—) y metamioglobina (—).

Utilizando ecuaciones 6.17, 6.18 y 6.19 desarrolladas por Bevilacqua y Zaritzky (1985) se calcularon las fracciones de cada pigmento presente en la carne fresca en función de las presiones a las que fue sometida. (Figura 6.20)

La cuantificación refuerza las tendencias observadas en las relaciones de F(R.) El aumento de presión parece favorecer la oxidación de Mb, formando MetMb como puede observarse, cuanto mayor es la presión mayor

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

es la proporción de metamioglobina presente. Como se mencionó en el **Capítulo 5 Sección 5.3.3** se produce un blanqueamiento de las muestras debido a un incremento de la relación de la luz reflejada y absorbida por el material al aumentar la presión causado por la desnaturalización de las proteínas y no a la proporción de cromóforo que contiene.

Para el caso de las muestras curadas (S1 y S2) tratadas a diferentes presiones, se calcularon las relaciones $r_{572/525}$ y $r_{473/525}$ características para cada tipo de pigmento obteniendo los resultados mostrados en la **Figura 6.21**.

Figura 6.21: Relación $r_{572/525}$ para las muestras tratadas con la solución S1 ($\blacktriangle$) y con la solución S2 ($\blacklozenge$), y relación $r_{473/525}$ para las muestras tratadas con la solución S1 ($\bullet$) y con la solución S2 ($\blacksquare$) en función de la presión, comparadas el patrón de nitrosomioglobina ($\circ$).

Como puede observarse los valores encontrados para las muestras con pretratamiento químico y APH son similares a los obtenidos en el caso de la

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

muestra de referencia de nitrosomioglobina. Por esto se puede asegurar que el pigmento presente en las muestras tratadas con los preservadores químicos es nitrosomioglobina y que no se ha podido detectar efecto del NaCl en el grado de nitrosación de Mb.

Por otro lado, las relaciones de $F(R)$ no cambian con la presión y son consistentes con la formación NitroMb, Esto es compatible con NitroMb como la principal especie independientemente de la presión. En este caso la decoloración de la carne puede atribuirse a destrucción del cromóforo más que a oxidación a metamioglobina.

Como puede observarse en la **Figura 6.22** los espectros de $F(R)$, normalizados en 525 nm, de las muestras curadas tratadas con diferentes presiones dan, dentro del error experimental, iguales al espectro de la especie NitroMb.

Figura 6.22: Función de Kubelka-Munk de las muestras con tratamiento químico con las soluciones S1, S2 y sometidas a presión y del patrón de nitrosomioglobina.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

6.4.5. Efecto del tratamiento químico y la presión aplicada en la decoloración de las muestras utilizando reflectancia difusa

Utilizando los datos de la figura 6.18 el objetivo de esta sección es demostrar que las muestras tratadas con los preservadores químicos y sometidas altas presiones muestran mayor estabilidad del cromóforo en comparación con las que no han sido tratadas químicamente. Para ello se utilizar la teoría de Kubelka-Munk, para expresar la función de remisión, $F(R)$ incluyendo la presencia de nitrosomioglobina

$$F(R) = \frac{(1-R)^2}{2R} = \frac{K}{S} = \frac{\sum_i K_i C_i}{S} + \frac{K_M}{S} = \frac{\sum_i K_i C_i}{S} + F_0(R) \quad \text{Eq. 6.20}$$

donde R es la reflectancia difusa, K y S son los coeficientes de absorción y de scattering de la muestra, K_M es el coeficiente de absorción de la matriz, C_i son las concentraciones de las especies i , respectivamente, y $F_0(R)$ es la función de remisión asociada a la matriz.

Teniendo en cuenta la presencia de nitrosomioglobina la expresión queda de la siguiente forma.

$$F(R)_\lambda = \frac{K_{MbO_2} C_{MbO_2} + K_{Mb} C_{Mb} + K_{MetMb} C_{MetMb} + K_{NitroMb} C_{NitroMb}}{S} + F_0(R) \quad \text{Eq. 6.21}$$

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

$$K_{Mb}(525nm) = K_{OxiMb}(525nm) = K_{MetaMb}(525nm) = K_{NitroMb}(525nm)$$

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Por lo tanto, la ecuación (6.18) a 525 nm puede escribirse como:

$$F(R_{525}) - F_0(R_{525}) = \Delta F_{525} = \left[\frac{K_{Mb=MbO_2=MetMb=NitroMb}^{525nm}}{S_{525nm}} \right] \cdot C_{Total} \quad Eq. 6.22$$

Como podemos ver en la ecuación 6.19 ΔF_{525} es proporcional a la concentración total de cromóforo, es decir, de Mb y sus especies. Teniendo los espectros de las muestras tratadas a diferentes presiones y el espectro de la matriz (carne decolorada), se calculó el ΔF_{525} y graficó en función de la presión para evaluar la destrucción del cromóforo con la presión para carne fresca y las muestras tratadas químicamente.

Asumiendo que prácticamente no hubo decoloración entre 0 y 100 MPa podemos considerar el ΔF_{525} promedio entre 0 y 100 MPa como el valor correspondiente al 0% de decoloración (o correspondiente al 100% de mioglobina). Llamando a este promedio como ΔF_{525_0} y dado que ΔF_{525} es proporcional a la concentración de cromóforo, entonces, en cada caso, $(\Delta F_{525}/\Delta F_{525_0})$ refleja la fracción de cromóforo que queda respecto del inicial después del tratamiento. Normalizando de esta manera para cada curva obtenemos el siguiente gráfico (Figura 6.23).

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.23: ΔF_{525} normalizado en función de la presión para las muestras de Carne fresca (●), carne sumergida en la solución S1 (●) y carne sumergida en la solución S2 (●).

Presentando los datos como porcentaje de decoloración ($1 - \Delta F_{525}/\Delta F_{525o} * 100$) se obtiene el siguiente gráfico (**Figura 6.24**):

Figura 6.24: porcentaje de decoloración en función de la presión para las muestras de Carne fresca (●), carne sumergida en la solución S1 (●) y carne sumergida en la solución S2 (●).

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Como puede observarse las muestras tratadas con la solución S2 presentan una menor decoloración en función de la presión, esto se puede relacionar con la formación de nitrosomioglobina la cual es más estable a las altas presiones. Esto se puede corroborar al analizar el porcentaje de decoloración obtenido para la carne fresca sometida a presiones mayores de 300 MPa y las muestras que tuvieron un tratamiento químico previo y que exhiben un menor porcentaje de decoloración. En la carne fresca sometida a APH el cromóforo se va destruyendo y se llega a un valor de alrededor de 85% de decoloración.

6.5 Análisis sensorial de las muestras tratadas con los preservadores químicos.

La sal (NaCl) es un ingrediente multifuncional actúa como conservante, asegura diversas características funcionales favorables y mejora el sabor (Gillette, 1985), incrementando los atributos de sabor más positivos. Por lo tanto, las acciones destinadas a reducir la cantidad de sal en alimentos deben lidiar no sólo con la disminución del sabor salado percibido, sino también con la forma en que la reducción de sal impacta en otros atributos de sabor. La reducción del contenido de sodio de los productos puede no ser igualmente aceptado por todas las poblaciones.

Se realizaron pruebas sensoriales con el fin de determinar el efecto de la reducción de sal (en la solución de preservadores químicos) en los atributos sensoriales y determinar si las muestras son aceptadas por el consumidor. Para ello se realizaron pruebas hedónicas.

Estas pruebas destinadas a medir cuánto agrada o desagrade un producto utilizan escalas categorizadas, que pueden tener diferente número de categorías y que comúnmente van desde "me gusta muchísimo, pasando por "no me gusta ni me disgusta", hasta "me disgusta muchísimo".

Se realizó un análisis sensorial mediante panel no entrenado de 30 personas, utilizando una escala hedónica de 9 puntos para evaluar el grado

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

de aceptación de los productos (9 = me gusta mucho; 5 = no gusta ni disgusta, 1 = me disgusta mucho) de acuerdo a su aroma, sabor, textura y aceptabilidad general.

La evaluación se realizó en planillas entregadas a los panelistas junto a las muestras, como la que se presenta en la **Figura 6.25**.

ENSAYO DE ACEPTABILIDAD POR ATRIBUTOS DE CARNE BOVINA COCIDA									
Nombre:..... Edad:									
Nº Evaluador:..... Fecha:									
Ud. ha recibido tres muestras codificadas en cada bandeja., pruébelas de izquierda a derecha.									
Por favor evalúe la aceptabilidad de cada atributo marcando con una cruz sobre la escala. Tenga en cuenta que primero debe evaluar todos los atributos de una muestra antes de pasar a la siguiente. No olvide enjuagarse la boca después de probar cada muestra.									
En una escala de 1 a 9 (1=me disgusta mucho, 5=no gusta ni disgusta, 9= me gusta mucho)									
Muestra 825									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aceptabilidad Gral.									
Sabor									
Textura									
Aroma									
Muestra 648									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aceptabilidad Gral.									
Sabor									
Textura									
Aroma									
Muestra 378									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aceptabilidad Gral.									
Sabor									
Textura									
Aroma									

Figura 6.25: Planilla presentada a los evaluadores para realizar el análisis sensorial de los productos.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

A los panelistas se les pidió evaluar muestras codificadas de 3 productos (muestras tratadas con la solución S1, muestras tratadas con la solución S2 y Carne fresca sin tratamiento). Las muestras fueron cocidas (4 min en plancha), mantenidas a temperatura y presentadas a los panelistas templadas en vasos plásticos de poliestireno expandido y tapadas, codificadas con números aleatorios de 3 dígitos y en orden al azar, junto con agua fresca para enjuagar la boca entre muestras.

Se analizó el puntaje medio obtenido para cada atributo sensorial. En la **Figura 6.26** y **6.27** se muestran los resultados obtenidos para las tres formulaciones estudiadas. Se encontró que, para las tres formulaciones estudiadas, todos los atributos evaluados fueron aceptados (> 5) por los panelistas. El panel no entrenado no evidenció diferencias significativas en los atributos aroma y aceptabilidad general de las 3 muestras presentadas. Solamente se encontraron diferencias significativas en los parámetros textura y sabor, evidenciando el mayor efecto de este último cuando las muestras son tratadas con preservadores, teniendo mayor aceptabilidad por el consumidor.

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Figura 6.26: Expresión gráfica de los perfiles sensoriales de muestras de carne fresca (—), carne tratada con la solución S1 (—) y tratadas con la solución S2 (—).

Figura 6.27: Atributos sensoriales obtenidos para las diferentes muestras analizadas. Carne fresca (—), carne tratada con la solución S1 (—) y tratadas con la solución S2 (—).

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

Si se consideran las formulaciones con diferente concentración de sal, se corroboró que los productos obtenidos lograron características de sabor y textura aceptadas por el panel, indicando que la reducción de sodio no fue detectada, mediante estos parámetros.

Estos ensayos sensoriales indican que, en el sistema cárnico estudiado, resulta posible reducir el contenido de NaCl, logrando productos más saludables.

6.6 Conclusiones parciales

- Mediante los ensayos de DSC y FTIR se observó que las APH modificaron las estructuras de las proteínas. Se evidenció en los termogramas de DSC la desaparición de los picos correspondientes a las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares cuando son sometidas a diferente concentración salina y diferentes niveles de presión.
- A partir de los espectros de FTIR se observó una disminución en el contenido de estructuras α -Hélice y un aumento de la estructura desordenada cuando aumentaba la presión. En las muestras tratadas con la solución S2 la disminución de α -Hélice fue del 10 % en cambio al tratar las muestras con la solución S1 esta disminución fue de aproximadamente 5 %. Aumentando en ambos casos la proporción de la estructura desordenada.
- Se encontró que el tratamiento de APH afectó los parámetros de color, presentando las muestras tratadas a mayor presión un menor valor de a^* (disminución de la coloración rojiza) y un mayor valor de L^* , lo cual se pudo correlacionar con las mediciones de reflectancia difusa. Los preservadores químicos mejoraron la estabilidad del cromóforo disminuyendo el blanqueamiento de las muestras (producido por la aplicación de APH).

Capítulo 6: Tratamiento con APH: Efecto de la concentración de NaCl

- En la carne fresca sometida a APH el cromóforo se va destruyendo y se llega a un valor de alrededor de 85% de decoloración. Las muestras que tuvieron un tratamiento químico previo exhiben un menor porcentaje de decoloración, siendo menos afectada las muestras sometidas a la solución con mayor concentración de NaCl (S2).
- La formación de nitrosomioglobina estabilizó el color rojo reduciendo la destrucción del cromóforo mioglobina por el efecto de las APH.
- Las muestras con el pretratamiento químicos fueron más aceptadas por los consumidores y la reducción de cloruro de sodio no fue detectada, logrando productos más saludables.

CAPÍTULO 7:

EFECTO DE APH EN LA ESTABILIDAD FÍSICO- QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

En este capítulo se evaluó el efecto de alta presión hidrostática aplicada en dos niveles (400 y 600 MPa) en la estabilidad físicoquímica y microbiológica de las muestras cárnicas tratadas previamente con las soluciones de preservadores químicos S1 y S2 durante el almacenamiento refrigerado a 4°C. Se utilizaron controles que consistieron en carnes frescas sin tratamiento y se evaluaron las propiedades físicoquímicas de los productos obtenidos. Se determinó la variación del color mediante el espacio cromático CIELab y la oxidación lipídica mediante el análisis de TBARS, además de las variaciones en la textura. Se realizaron recuentos microbianos de bacterias mesófilas, bacterias ácido lácticas, enterobacterias, hongos y levaduras durante 6 semanas de almacenamiento refrigerado a 4 °C de las muestras tratadas con APH y preservadores como también de carne fresca sin tratamiento.

Se encontró que la aplicación de APH prolongaba la vida útil de las muestras por más de 4 semanas al utilizar 400 MPa y por más de 6 semanas al utilizar 600 MPa sin afectar los parámetros de color ni la oxidación lipídica. Con respecto a las soluciones salinas, las muestras tratadas con la solución S1 (menor concentración de NaCl) y APH, presentan una estabilidad menor que las tratadas con S2, pero sin embargo se encuentra por encima que la carne sin tratamiento.

Además, se estudió el efecto de APH sobre *L. monocytogenes*. Se estudiaron dos concentraciones de inóculo (10^5 y 10^7 UFC/ml) y dos temperaturas de almacenamiento (4 y 10 °C) en muestras de carne tratadas con la solución S1 (que contiene la menor concentración de NaCl). Se encontró que la utilización de APH como procedimiento de control del desarrollo de *Listeria monocytogenes* en un producto cárnico fue efectivo para disminuir los recuentos iniciales después del tratamiento, y durante el almacenamiento siendo más efectivo el uso de 600 MPa. Se pudo modelar el desarrollo de las bacterias mediante la ecuación de Gompertz. También en

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

este caso se midieron coloración superficial y textura a las dos temperaturas de almacenamiento

7.1 Estabilidad fisicoquímica durante el almacenamiento refrigerado a 4°C en muestras sometidas a dos tratamientos químicos y dos niveles de APH

Se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento refrigerado de las muestras tratadas con los preservadores químicos y sometidas a APH en dos niveles de presión (400 y 600 MPa) sobre las propiedades fisicoquímicas como también en la calidad microbiológica, y además la relación que había con la presión utilizada durante el tratamiento APH.

Se seccionaron 28 rodajas de carne fresca para determinación de color, oxidación lipídica y análisis microbiológico. Además, se prepararon 240 muestras de carne curadas con las soluciones (S1 y S2) ensayadas en el **Capítulo 6**, las cuales fueron pesadas y envasadas a vacío en bolsas CRYOVAC BB4L (Sealed Air, Bs As, Argentina). Del total del material, 120 rodajas fueron sometidas a 600 MPa y 120 a 400 MPa de la forma descripta en **2.4**. Luego fueron almacenadas en una cámara de refrigeración a 4° C durante dos meses.

Semanalmente se extrajeron 6 muestras de cada condición de presión y se realizaron determinaciones de color, textura, oxidación lipídica y se efectuaron ensayos microbiológicos (se hicieron recuento de bacterias ácido lácticas, bacterias mesófilas, enterobacterias, hongos y levaduras) de acuerdo a las técnicas descriptas en el **Capítulo 2**.

Estos resultados, junto con la determinación de la calidad sanitaria permitieron determinar la vida útil del mismo.

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

7.1.1 Color

El aspecto visual es un parámetro crítico en la compra y consumo de productos cárnicos. El valor promedio de los parámetros de color de muestras frescas no tratadas fue $a^*=20.28\pm0.12$ y $L^*=39.59\pm0.15$. Durante el almacenamiento refrigerado a 4°C los valores cambiaron a $a^*=19.10\pm0.76$ y $L^* = 42.46\pm0.68$ después de la segunda semana (Tabla 7.1).

Tabla 7.1: Parámetros de color L^* , a^* durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C de muestras de carne fresca (control).

Tiempo (semanas)	L^*	a^*
0	39.59 ± 0.15^a	$20.28 \pm 0.12^{a, b}$
1	44.89 ± 0.39^c	$21.52 \pm 0.72^{b, c}$
2	45.22 ± 0.57^c	22.42 ± 0.12^c

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$); los valores promedio $\pm$ SD

Para la carne fresca se obtuvieron datos durante 2 semanas, porque las muestras control perdieron su calidad microbiológica durante la segunda semana. El parámetro b^* no cambió significativamente a lo largo del período de almacenamiento ($P > 0.05$) llevando a un valor promedio de 12.20 ± 0.53 .

La diferencia total de color (ΔE^*) se determinó como una estimación de los cambios de color según:

$$\Delta E^* = [(L^* - L^*_{\text{ref}})^2 + (a^* - a^*_{\text{ref}})^2 + (b^* - b^*_{\text{ref}})^2]^{1/2} =$$

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Eq. 7.1}$$

Los valores de color del control (muestras de carne no tratada) fueron utilizados como referencia en el cálculo de ΔE^* .

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

En el caso de las muestras previamente sumergidas en las soluciones salinas S1 y S2 y luego tratadas con APH, ΔE^* dependió significativamente ($P < 0.05$) de la composición de la solución de inmersión y de la presión, como se muestra en la **Tabla 7.2**.

La diferencia total de color, ΔE^* , no fue influenciada significativamente ($P > 0.05$) por el tiempo de almacenamiento en las muestras sometidas a 600 MPa. Sin embargo, ΔE^* cambió ligeramente durante el almacenamiento refrigerado en las muestras sometidas a 400 MPa; en este caso, durante el tiempo de almacenamiento de 6 semanas a 4°C, los valores ΔE^* aumentaron de 11.70 a 12.89 para S1 y de 9.70 a 11.59 para S2.

Tabla 7.2: Efecto de APH presiones (400 y 600 MPa) y la concentración de cloruro de sodio en la solución de inmersión (S1: 30 g NaCl/l y S2: 60 g NaCl/l) en el ΔE^* durante almacenamiento refrigerado a 4°C de las muestras de carne de res.

ΔE^*	400 MPa		600 MPa	
Tiempo (semanas)	S1	S2	S1	S2
0	11.70±1.16 ^{a,A,B}	9.70±1.40 ^{b,c,A}	16.54±2.50 ^{a,C}	12.92±1.56 ^{a,B}
1	16.51±1.75 ^{c,C}	9.16±1.32 ^{a,b,A}	17.23±1.14 ^{a,C}	13.85±1.48 ^{a,B}
2	10.58±0.57 ^{a,b,A}	10.33±1.81 ^{b,c,d,A}	16.84±2.17 ^{a,C}	14.07±1.03 ^{a,B}
3	12.81±2.05 ^{a,b,A,B}	10.80±0.38 ^{c,d,A}	17.32±1.83 ^{a,C}	14.09±0.85 ^{a,B}
4	14.44±2.19 ^{b,c,A,B}	11.43±0.20 ^{d,A}	17.54±3.57 ^{a,B}	14.18±1.65 ^{a,A,B}
5	14.08±3.11 ^{b,c,B}	7.96±0.81 ^{a,A}	15.69±1.89 ^{a,B}	12.08±3.07 ^{a,B}
6	12.89±2.29 ^{a,b,A}	11.59±0.36 ^{d,A}	16.65±3.72 ^{a,B}	13.86±0.90 ^{a,A,B}

a–d: valores promedio con letras distintas en la misma columna son diferentes ($p < 0.05$).

A–C: valores promedio con letras distintas en la misma fila son diferentes ($p < 0.05$).

Valores promedio ± SD.

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

Se puede observar en la **Tabla 7.2** que ΔE^* aumentó con la presión aplicada y con la disminución de la concentración de NaCl en la solución de inmersión. Con el fin de interpretar mejor los resultados de ΔE^* , es conveniente analizar los parámetros individuales del color (L^* , a^* , b^*).

El valor de la b^* no se consideró significativo para representar las variaciones de color en las muestras por lo tanto resultados de los parámetros L^* y a^* son los que se analizaron.

Los valores de luminosidad (L^*) en las muestras de carne previamente sumergido en las soluciones S1 y S2, y sometidos a dos niveles de presión de 400 y 600 MPa se muestran en la **Tabla 7.3**. Se puede observar que los valores de L^* de las muestras tratadas fueron mayores que los obtenidos en las muestras de carne fresca (**Tabla 7.1**) pero menor que en las muestras sometidas a alta presión sin un tratamiento químico previo ($L^* = 60$ a 600 MPa) como observamos en los datos expuestos en el **Capítulo 5**.

El análisis de varianza mostró que, para las dos presiones ensayadas, las muestras inmersas en S2 (60 g NaCl/l) tenían valores L^* más bajos en comparación con aquellas sumergidas en S1 (30 g NaCl/l). En función de las presiones, las muestras sometidas a 400 MPa tuvieron valores más bajos de L^* que los sometidos a 600 MPa. Este resultado es consistente con los trabajos de Bak *et al.*, (2012) y Jung *et al.*, (2003). Estos autores observaron un aumento en la luminosidad de la carne (L^*) a presiones superiores a 200 MPa. Goutefongea *et al.*, (1995) explicó que el incremento en la luminosidad es debido a la desnaturalización de la globina con ruptura del anillo porfirínico o liberación bajo la acción de la presión.

El umbral de presión en el cual es visible el efecto de blanqueamiento depende de varios factores, como la temperatura de APH, tiempo de tratamiento, contenido de lípidos y especies de carne (Duranton *et al.*, 2014). Carlez *et al.*, (1995) y Marcos *et al.*, (2010) observaron que el efecto de blanqueamiento a menudo se asocia con una disminución en el

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

enrojecimiento (a^*), conduce a un color gris/marrón, como en carne cocida.

Tabla 7.3: Efecto de APH presiones (400 y 600 MPa) y la concentración de cloruro de sodio en la solución de inmersión (S1: 30 g NaCl/l y S2: 60 g NaCl/l) en el parámetro de color L^* durante almacenamiento refrigerado a 4°C de las muestras de carne de res.

L^*	400 MPa		600 MPa	
Tiempo (semanas)	S1	S2	S1	S2
0	51.19±1.14 ^{a,b,A,B}	48.75±1.77 ^{b,c,A}	56.01±2.40 ^{a,C}	52.27±1.59 ^{a,B}
1	55.08±0.33 ^{c,B,C}	47.92±1.62 ^{a,b,A}	56.40±0.85 ^{a,C}	53.14±1.49 ^{a,B}
2	49.92±0.48 ^{a,A}	49.38±1.74 ^{b,c,d,A}	56.15±2.09 ^{a,C}	53.01±1.00 ^{a,B}
3	52.24±2.16 ^{a,b,A,B}	50.21±0.45 ^{c,d,A}	56.22±1.68 ^{a,C}	53.41±0.83 ^{a,B}
4	53.82±2.17 ^{b,c,A,B}	50.68±0.29 ^{d,B}	55.95±4.01 ^{a,A}	53.09±1.78 ^{a,A,B}
5	53.55±3.19 ^{b,c,B}	46.56±0.96 ^{a,A}	54.73±1.55 ^{a,B}	51.11±3.18 ^{a,B}
6	52.04±2.50 ^{a,b,A}	50.99±0.36 ^{d,A}	56.01±3.49 ^{a,B}	53.10±0.82 ^{a,A,B}

a–d: valores promedio con letras distintas en la misma columna son diferentes ($p < 0.05$).

A–C: valores promedio con letras distintas en la misma fila son diferentes ($p < 0.05$).

Valores promedio ± SD.

El tiempo de almacenamiento no influyó significativamente ($P > 0.05$) en los valores de este parámetro para las muestras a 600 MPa, aunque en el caso de 400 MPa L^* cambio ligeramente durante almacenamiento refrigerado.

Se encontró que el parámetro a^* dependió significativamente ($P < 0.05$) de la composición de la solución de inmersión, la presión y del tiempo de almacenamiento como se muestra en la **Tabla 7.4**. Las muestras tratadas a 400 MPa en general tenían valores de a^* más altos que aquellos sometidos

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

a 600 MPa.

Las muestras sumergidas en S2 tenían una mayor coloración rojiza (a^*) que las muestras tratadas con S1. Este resultado combinado con un menor L^* puede atribuirse a la mayor difusividad efectiva de NaNO_2 con el aumento de las concentraciones de NaCl en la solución de inmersión (Graiver *et al.*, 2006), mejorando la estabilidad del color debido a la formación de una mayor concentración de nitrosomioglobina.

Resultados similares fueron reportados por Bak *et al.*, (2012) que estudió el efecto de APH en el color del jamón cocido.

Los cambios de ambos parámetros (a^* y L^*) con el nivel de presión puede atribuirse al efecto de APH en la desnaturalización de proteínas sarcoplásmicas (principalmente mioglobina) con la disrupción del anillo porfirínico o liberación debido a la acción de presión y modificación de la composición de la fracción de proteína sarcoplásmica (Marcos *et al.*, 2010, Grigera y McCarthy, 2010 y Szerman *et al.*, 2011).

Durante el almacenamiento refrigerado de las muestras tratadas, a^* disminuyo ligeramente; este resultado puede atribuirse a los cambios causados por la desnaturalización de la globina y/o el desplazamiento o liberación del grupo hemo (Cheftel y Culiol 1997, Andrés *et al.*, 2004 y Bak *et al.*, 2012). Otra razón podría ser la oxidación de la mioglobina ferrosa a metamioglobina férrica (Andrés *et al.*, 2004; Campus *et al.*, 2008), aunque el último efecto puede minimizarse por la formación de nitrosomioglobina. Jung *et al.*, (2003) reportaron que el sistema enzimático implicado en la reducción de metamioglobina y las reacciones involucradas en la formación de este pigmento puede verse alterado por la aplicación de APH. Estos autores envasan sus muestras en polietileno que es una película de alta permeabilidad gaseosa. Se debe destacar que, en el presente trabajo, las muestras eran envasadas al vacío en películas de baja permeabilidad; por lo tanto, la disminución de los valores de a^* durante el tiempo de

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

almacenamiento fue menos notorio que en los casos donde las muestras se han almacenado en películas de alta permeabilidad gaseosa (Jung *et al.* 2003) llegando a valores de $a^* < 9$ o en las muestras tratadas con APH en contacto con el oxígeno ($a^* < 6$) (Carlez *et al.*, 1995).

Tabla 7.4: Parámetro de color a^* de muestras de carne en función de la solución de inmersión (S1 y S2) y altas presiones (400 y 600 MPa) durante almacenamiento refrigerado a 4 °C.

a^*	400 MPa		600 MPa	
Tiempo (semanas)	S1	S2	S1	S2
0	19.07±0.26 ^{c,A}	21.85±0.81 ^{c,B}	19.31±1.04 ^{d,A}	20.09±0.51 ^{c,A,B}
1	17.50±0.14 ^{a,A}	19.09±0.47 ^{a,B}	17.58±0.76 ^{b,c,d,A,B}	18.61±0.44 ^{b,B}
2	18.90±0.44 ^{c,A,B}	19.74±0.60 ^{a,b,B}	17.74±0.69 ^{b,c,d,A}	17.26±0.42 ^{a,A}
3	18.85±0.15 ^{b,c,B}	20.29±0.43 ^{a,b,c,C}	15.79±0.52 ^{a,b,A}	18.74±0.12 ^{b,B}
4	18.27±0.30 ^{b,c,C}	19.68±0.17 ^{a,b,D}	14.72±0.16 ^{a,A}	17.22±0.31 ^{a,B}
5	19.00±0.04 ^{c,B}	21.53±0.87 ^{c,C}	16.56±0.74 ^{a,b,c,A}	17.47±0.22 ^{a,AB}
6	17.59±0.30 ^{b,A}	21.26±0.20 ^{b,c,B}	18.06±1.00 ^{c,d,A}	18.86±0.36 ^{b,B}

a–d: valores promedio con letras distintas en la misma columna son diferentes ($p < 0.05$).

A–C: valores promedio con letras distintas en la misma fila son diferentes ($p < 0.05$).

Valores promedio ± SD

Los resultados obtenidos demostraron que presiones más altas condujeron a valores más altos de la L^* y valores más bajos de a^* ; sin embargo, en todos los casos ensayados, los valores de a^* obtenidos para diferentes condiciones estaban en el rango entre 14.72 y 21.85, siendo los valores de $a^* > 14$ conveniente para los consumidores (Zamora & Zaritzky 1987).

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

7.1.2 Textura

Del análisis estadístico de los resultados para la textura se puede observar que las diferentes condiciones de tratamiento previo a APH (S1 o S2), las presiones empleadas (400 y 600 MPa), el tiempo de almacenamiento y la interacción triple entre estos factores, influyeron significativamente ($P < 0.05$) en la fuerza.

La textura aumentó significativamente ($P < 0.05$) al incrementarse la presión (**Figura 7.1**) y varió significativamente con el pretratamiento químico, presentando una mayor dureza las muestras tratadas con la solución S2 de mayor concentración de NaCl. Estos resultados pueden atribuirse a la desnaturalización parcial de las proteínas miofibrilares causadas por el tratamiento químico previo (Graiver *et al.*, 2006) como se expuso en el **Capítulo 6** con la determinación de DSC.

Figura 7. 1: variación de la textura durante el almacenamiento refrigerado a 4°C de: Carne sumergida en la solución S1 y sometida a 400 MPa (■), sometida a 600 MPa (■) y carne sumergida en la solución S2 sometida a 400 MPa (■) y a 600 MPa (■).

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

Con respecto a la presión, las muestras sometidas a 600 MPa presentaron una mayor dureza que a 400MPa (**Figura 7.2**), lo que podría estar relacionado con la mayor producción de exudado, al incrementar la presión que conduce a un tejido muscular con menor contenido de humedad. se pone como ejemplo la producción de exudado producida por las muestras tratadas con la solución S2 y sometida a los dos niveles de presión.

Figura 7.2: Exudado de las muestras sumergidas en la solución S2 y sometidas a 600 MPa y 400 MPa.

7.1.3 Oxidación lipídica

Los productos cárnicos tratados con APH son más susceptibles a la oxidación lipídica durante el almacenamiento que el producto almacenado crudo. Esto se debe a que las operaciones de alta presión hidrostática alteran el balance pro-oxidante/antioxidante propio de la matriz del alimento porque se mezclan catalizadores de oxidación con lípidos, promoviendo la oxidación de la mioglobina, liberando el hierro de las proteínas e inactivando enzimas antioxidantes (Lee *et al.*, 2006b).

Se analizó la oxidación de lípidos en las muestras sumergidas en las soluciones conservantes y tratadas a 400 o 600 MPa y en muestras de carne sin ningún tratamiento (control).

Los valores TBARS de muestras frescas no tratadas durante el almacenamiento refrigerado cambiaron de 0.040 ± 0.004 a 0.117 ± 0.001 mg MDA/g carne después de 6 semanas (**Figura 7.3**). El tiempo de

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

almacenamiento influye significativamente ($P < 0.05$) en los valores TBARS, aumentando con el tiempo (**Figura. 7.3, 7. 4 y 7. 5**); sin embargo, en todos los casos los valores permanecieron por debajo del límite de detección de rancidez en productos carnicos (< 1 mgMDA/g) dados por Boles y Parrish (1990).

Figura 7.3: Oxidación lipídica en la carne no tratada durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C.

La aplicación de APH aumentó significativamente ($P < 0.05$) el índice TBARS, observando mayores valores a MPa 600 que a 400 MPa. Sin embargo, en todos los casos los valores obtenidos después de almacenamiento refrigerado se mantuvieron por debajo del límite de detección de la rancidez para dichos productos, siendo por tanto apta para el consumo (**Figura. 7.4 y 7.5**). Cheah y Ledward (1996) reportaron que las altas presiones disminuyeron la estabilidad oxidativa de la carne. MA *et al.*, (2007) y McArdle *et al.*, (2010) informaron un aumento en valores TBARS en carne (Longissimus dorsi) tratado con presiones ≥ 400 MPa en comparación con carne fresca.

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

Figura 7.4: Efecto de APH en la oxidación lipídica en muestras cárnicas durante almacenamiento refrigerado a 4 ° C. (■) carne sumergida en solución S1 sin APH. Carne sumergida en solución S1 y tratada con 400 MPa (■) o 600MPa (■). Barras verticales indican la desviación estándar.

Figura 7.5: Efecto de APH en la oxidación de lípidos en las muestras cárnicas durante almacenamiento refrigerado a 4 ° C. (■) carne sumergida en solución S2 sin APH. Carne sumergida en solución S2 y tratada con 400 MPa (■) o 600MPa (■). Barras verticales indican la desviación estándar.

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

Las soluciones de inmersión influyeron significativamente ($P < 0.05$) en los valores TBARS. Las muestras inmersas en la solución S1 presentaron valores más altos de TBARS, y esto puede ser debido a la menor concentración de nitrito en el producto. Según Freybler *et al.*, (1993) y MacDonald *et al.*, (1980), nitrito de sodio tiene un efecto estabilizador sobre la oxidación de lípidos en la carne.

Andrés *et al.*, (2004) reportaron que la alta presión podría iniciar la formación de radicales que podrían promover la oxidación lípida y el deterioro de los pigmentos de la carne. Hé *et al.*, (2012) declaró que los fosfolípidos principalmente se alteraron cuando las muestras fueron tratadas a 350 MPa (20°C, 20 min). Además, Carballo *et al.*, (1997) demostraron que APH favoreció la ruptura de los adipocitos en la carne y que las enzimas antioxidantes posiblemente estar afectadas por APH.

7.2 Recuentos microbianos de heterótrofos (hongos y levaduras, bacterias ácido lácticas, mesófilas, psicrótrofas y enterobacterias)

Durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C no se observó crecimiento de hongos, levaduras y bacterias psicrótrofas en muestras de carne sometidas a 400 y 600 MPa. En carne fresca la flora predominante fue constituida por bacterias ácido lácticas y mesófilas presentando una carga microbiana inicial de 4 log UFC/g y 6 log UFC/g respectivamente.

Los recuentos microbianos en las muestras control, exceden los valores (UFC/g de carne) permitidos bajo las regulaciones de Argentina desde la primera semana de almacenamiento refrigerado a 4 °C (**Figura 7. 6 y 7. 7**), El código Alimentario Argentino (artículo 255bis (res 712, 25/04/85) y artículo 286) establece los siguientes requisitos microbiológicos:

- Bacterias mesófilas (recuento a 35 °C) $< 10^6$ ufc/g,
- Enterobacteriaceae, < 100 UFC/g,

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

- Hongos y levaduras, $<10^3$ UFC/g
- No presenta un límite para bacterias ácido lácticas.

Estos valores pueden considerarse como una referencia para el producto pre-tratado con preservadores químicos y productos cárnicos sometidos a APH.

Se observa en los **Figuras 7.6 y 7.7** que las soluciones de curado (S1 y S2) inicialmente disminuyen el recuento microbiano en aproximadamente en 2 ciclos logarítmicos con referencia a la carne fresca y mantuvieron esta diferencia durante el almacenamiento refrigerado. S1 presentó un desarrollo microbiano mayor que S2, esto puede deberse a la menor concentración de NaCl y nitrito en las muestras los cuales tienen un efecto bacteriostático, aunque en la cuarta semana para el caso de bacterias mesófilas se llegó a la misma concentración de microorganismos. Se observa en los dos casos una cinética diferente de crecimiento.

En contraste, las muestras sumergidas en la solución S1 y tratadas a 400 MPa mostraron recuentos de bacterias mesófilas $< 2 \log$ UFC/g durante las primeras 3 semanas de almacenamiento. Después de la cuarta semana, los recuentos eran cercanos a $4 \log$ UFC/g aumentando aproximadamente un ciclo logarítmico en la quinta semana. En el caso de las bacterias lácticas (LAB) después de la cuarta semana, los recuentos eran cercanos a $3 \log$ UFC/g. Para las muestras tratadas a 600 MPa, el crecimiento de bacterias mesófilas se observó después de la quinta semana mientras que el crecimiento de bacterias ácidolácticas se produjo después de la sexta semana. Las muestras sumergidas en la solución S2 presentan un crecimiento de bacterias ácido lácticas $< 2 \log$ UFC/g para ambas presiones y el crecimiento de bacterias mesófilas luego de la quinta semana para las muestras sometidas a 400 MPa, y después de la sexta semana en las tratadas 600 MPa.

Las muestras en la solución S2, que contenía mayor concentración de

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

NaCl mantuvieron la estabilidad microbiológica por tiempos más largos de almacenamiento; esto puede atribuirse al efecto bacteriostático producido por NaCl y NaNO₂ que, como se explicó previamente, aumenta la tasa de difusión en el tejido de la carne con el aumento de concentración de NaCl. Benedict (1980) y Tompkin (2005) encontraron que el nitrito tiene un efecto bacteriostático y en combinación con la sal inhibe bacterias en alimentos. El ácido nitroso, que se encuentra en equilibrio químico con el nitrito en medio ácido, se ha demostrado que es reactivo con varios grupos de proteínas bacterianas asociados con el metabolismo energético celular (Morita *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 1981) o con la permeabilidad de la membrana (Buchman y Hansen 1987; Cammack *et al.*, 1999).

En las muestras sometidas a APH no se observó crecimiento de enterobacterias durante el almacenamiento.

La inactivación de las bacterias se atribuye a varios tipos de daño acumulado dentro de la célula. Después de la presurización, se observan cambios estructurales y morfológicos en las células (Bajovic *et al.*, 2012). La APH puede perturbar la integridad de la membrana de la célula disminuyendo la fluidez de la membrana y desnaturalizar los enlaces de las proteínas de membrana (Tao *et al.*, 2014 y Rivalain *et al.*, 2010). La resistencia a la presión de las células bacterianas en el rango de 300 – 600 MPa depende de las especies de bacterias y el sistema de alimentos implicado. En general, bacterias Gram-positivas, como lactobacilos son más resistentes a la presión que las bacterias Gram-negativas, mohos y levaduras. (Cheftel 1995, Fonberg- Broczek *et al.*, 2005 y Pilavtepe-Çelik *et al.*, 2008).

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

Figura 7.6: Crecimiento microbiano de bacterias mesófilas en muestras de carne sometidas a APH a 400 MPa (a) y a 600 MPa (b), durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C. (▲) carne sin APH; carne tratada con la solución S1 (●) o S2 (▲) antes del tratamiento de APH. S1 + APH (◆) y S2 + APH (■). Barras verticales indican el error estándar o la media.

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

Figura 7.7: Crecimiento microbiano de bacterias Ácido lácticas en muestras de carne sometidas a APH a 400 MPa (a) y a 600 MPa (b), durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C. (▲) carne sin APH; carne tratada con la solución S1 (●) o S2 (▲) antes del tratamiento de APH. S1 + APH (◆) y S2 + APH (■). Barras verticales indican el error estándar o la media.

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

7.3 Efecto del tratamiento con aditivos químicos y APH sobre el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y parámetros fisicoquímicos durante el almacenamiento refrigerado a 4 y 10 °C

El desarrollo de bacterias patógenas y microorganismos de deterioro en los alimentos resulta indeseable desde el punto de vista de la salud de los consumidores, debido a que pueden ser causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) (WRO, 1998). El crecimiento microbiano está gobernado por la acción simultánea de diversos factores físicos y químicos limitantes. La capacidad de sobrevivir e iniciar el crecimiento de cada tipo de microorganismo, tanto los alteradores como los causantes de enfermedades alimenticias está influenciada por la acción conjunta de factores extrínsecos, como pH, temperatura, aw, intrínsecos (propios del alimento) y los propios del microorganismo.

La alta presión hidrostática (APH) es un método de conservación utilizada en alimentos que logra alargar su vida útil. En el caso de carne bovina esta tecnología permite controlar el desarrollo de microorganismos alteradores y microorganismos patógenos. Entre los microorganismos patógenos la *Listeria monocytogenes* es capaz de sobrevivir a temperaturas de refrigeración, pueden crecer a 4 °C en pocos días a diferencia de otras bacterias patógenas. Además, crece en concentraciones altas de NaCl 10% y sobrevive a concentraciones entre 16 y 20%. (Schöbitz *et al.*, 2009, Marzocca, *et al.*, 2004) constituyendo un serio problema de salud pública.

El objetivo de este ensayo fue estudiar el efecto del tratamiento de alta presión hidrostática (400 y 600 MPa) sobre el desarrollo de *L. monocytogenes* inoculada en un producto cárnico sometido a un pretratamiento con aditivos químicos (S1) durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C y 10 °C. Además, se propuso un modelo matemático para describir el desarrollo de la bacteria. Asimismo, se midieron coloración superficial y textura a las dos temperaturas de almacenamiento

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

7.3.1 Color y Textura

Del análisis de varianza realizado se encontró que la luminosidad L^* se vio afectada significativamente tanto por el tiempo de almacenamiento como por las presiones ensayas no siendo significativa la temperatura. Las interacciones dobles entre estas variables afectan significativamente este parámetro. Las muestras sometidas a 400 MPa presentaron un menor valor de L^* que las muestras sometidas a 600 MPa (**Figura 7.8 a, b**) a ambas temperaturas de almacenamiento, esto concuerda con lo expuesto por Bak *et al.*, (2012) quien reportó que el aumento de la presión por encima de 300 MPa conduce a un pequeño aumento en la luminosidad.

El parámetro a^* dependió significativamente ($P < 0.05$) de la presión ensayada, de la temperatura de almacenamiento, del tiempo y de la interacción entre estos tres factores. En función de las presiones, las muestras tratadas a 400 MPa presentaron un mayor valor de a^* comparadas con las muestras tratadas a 600 MPa; esto se debe al efecto de las altas presiones sobre las proteínas sarcoplásmicas. En la **Figura 7.9 a, b** puede observarse que a ambas presiones hay una disminución del parámetro a^* durante el tiempo de almacenamiento. En función de la temperatura, se observó que las muestras almacenadas a 4 °C presentaron un mayor valor de a^* que las muestras almacenadas a 10 °C. Sin embargo, en todos los casos, los valores obtenidos de a^* fueron adecuados para el producto desarrollado ($a^* > 14$).

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

Figura 7.8: Variación de la luminosidad (L^*) de las muestras cárnicas en función del tiempo para las presiones: (—) 400 MPa y (—) 600 MPa, almacenadas a las temperaturas: a) 4 °C y b) 10 °C.

Figura 7.9: Variación del parámetro a^* en las muestras cárnicas en función del tiempo para las presiones: (—) 400 MPa y (—) 600 MPa, almacenadas a las temperaturas: a) 4 °C y b) 10 °C.

Con respecto a la textura se encontró que la fuerza máxima dependió significativamente ($P < 0.05$) de la presión ensayada y de la temperatura de almacenamiento, no así del tiempo. En todos los casos las muestras tratadas a 600 MPa mostraron mayores valores de fuerza máxima que aquellas sometidas a 400 MPa (Figura 7.10), pudiéndose relacionar con el mayor exudado producido al incrementar la presión que conduce a un tejido

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

muscular con menor contenido de humedad.

Figura 7.10: Variación de la fuerza máxima en función del tiempo para las muestras sometidas a presiones de (—) 400 MPa y (—) 600 MPa, almacenadas dos temperaturas: a) 4 °C y b) 10 °C.

7.3.2 Desarrollo de *L. monocytogenes*

7.3.2.1 Inoculación

Posteriormente a la etapa de tratamiento químico de las muestras cárnicas con la solución S1 (3 g NaCl /100 ml, 0.62 g/L NaNO₂ y 8.5 g/L ácido ascórbico), la cual se seleccionó debido a su menor concentración de NaCl, se inoculó cada una de forma individual con 100 µl de un cultivo de 24 h de *Listeria monocytogenes*. El ensayo se llevó a cabo utilizando dos concentraciones de inóculo 10⁵ y 10⁷ UFC/ml. Luego las muestras fueron envasadas al vacío y se sometieron al proceso de APH. Se utilizaron dos niveles de presión 400 y 600 MPa durante 5 min. Al finalizar el proceso fueron almacenadas en cámaras de refrigeración a 4 y 10 °C.

Se tomaron muestras cada semana y se evaluaron por duplicado los recuentos microbianos de *L. monocytogenes*. Las muestras cárnicas inoculadas sin tratamiento con APH fueron consideradas en cada caso como control. Se realizó la siembra de las muestras sobre el medio de cultivo

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

PALCAM (medio selectivo para *L. monocytogenes*) y se incubaron las placas durante 24-48 h a 37 °C.

7.3.2.2 Modelado Matemático del desarrollo microbiano: Modelo de Gompertz

La ecuación de Gompertz es una función doble exponencial basado en 4 parámetros que describen una curva sigmoideal asimétrica:

$$\text{Log } N = A + C \exp \{ - \exp[-B(t-M)] \} \quad \text{Eq 7.2}$$

donde: Log N es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos [log (UFC/ml)] al tiempo t, dado en horas; A es el logaritmo de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente (aproximadamente equivale al logaritmo de los niveles iniciales de bacterias) [log(UFC/ml)]; C es el logaritmo de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (es el número de ciclos log de crecimiento) [log UFC/ml]; M es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento [h]; B es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo M [h] . De estos parámetros se deriva: la velocidad específica de crecimiento ($\mu = B.C/e$ con $e = 2,7182$ [log (UFC/ml) /h]; la duración de la fase de latencia (LPD= $M-1/B$, [hs]) y la máxima densidad de población (MPD= $A+C$, [lag UFC/ml]).

Figura 7.11: Parámetros del modelo de Gompertz

La utilización de la Microbiología Predictiva permite:

- Predecir la durabilidad y seguridad de los alimentos.
- Determinar la estabilidad microbiana de nuevos productos alimenticios que hayan sufrido algún cambio en su formulación.
- Ayudar en la evaluación del riesgo potencial para la salud en caso de alimentos sometidos a diversas condiciones ambientales.

Los modelos podrían reducir la necesidad de exámenes microbiológicos, permitiendo así un considerable beneficio económico. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los modelos no permiten predecir fuera del rango de condiciones en el cual se hicieron los experimentos y se obtuvieron los resultados.

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

7.3.2.3 Desarrollo de *L. monocytogenes* y modelado de los resultados

Para ejemplificar la aplicación del modelo de Gompertz, en la **Figura 7.12, 7.13** y las **Tablas 7.5 y 7.6** se muestran los datos experimentales, así como la curva ajustada mediante SYSTAT al desarrollo de *listeria* en la carne, sometida a distintos tratamientos, durante su almacenamiento refrigerado a 4 °C y 10 °C.

La **Figura 7.12 a,b** corresponde a muestras inoculadas con 10^5 UFC/ml, (quedando una concentración en la carne de 10^3 UFC/g carne) y almacenadas a dos temperaturas diferentes 4 °C (**Figura 7.12 a**) y 10 °C (**Figura 7.12 b**). Podemos observar que las muestras tratadas con la solución de aditivos químicos, inoculadas y sometidas a APH en los dos niveles de presión y almacenadas tanto a 4 °C como a 10 °C, presentaron recuentos por debajo del límite de detección (2 log UFC/g) lo cual significa que las altas presiones afectaron a las bacterias, impidiendo así su desarrollo normal.

Debe señalarse la notoria disminución del recuento inicial después del tratamiento con altas presiones disminuyendo la concentración microbiana en alrededor de 3 ciclos logarítmicos.

En cambio, las muestras frescas (CF) y las tratadas con la solución de aditivos químicos (CS) que fueron inoculadas, presentaron un recuento por encima de 3 log UFC/g, aumentando a lo largo del almacenamiento refrigerado. En el caso de las muestras almacenadas a una temperatura de refrigeración de 10 °C, se observó un crecimiento mayor.

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

Figura 7.12. Aplicación del modelo de Gompertz a los recuentos de *Listeria monocytogenes* en carnes almacenadas inoculada en niveles de 10^3 UFC/g y almacenadas a) 4 °C y b) 10 °C ● carne fresca, ◆ carne con solución, ■ 400 MPa y ▲ 600 MPa.

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

La **Figura 7.13** corresponde a muestras inoculadas con 10^7 UFC/ml (quedando una concentración en la carne de 10^5 UFC/g carne) y almacenadas a dos temperaturas: 4 °C (**Figura 7.13 a**) y 10 °C (**Figura 7.13 b**). En el caso de las muestras tratadas con APH se observa que las muestras sometidas a 600 MPa presentaron un menor crecimiento que las muestras sometidas a 400 MPa, evidenciando el mayor efecto que produce las altas presiones sobre las bacterias, sin embargo, el hecho de tener una mayor cantidad de inóculo inicial podría provocar un efecto de protección en las bacterias que permitiría luego en el almacenamiento el crecimiento de las mismas.

Con respecto a las temperaturas de almacenamiento, no se observó crecimiento a 4 °C para las muestras tratadas a 600 MPa durante todo el almacenamiento y en el caso de las muestras tratadas a 400 MPa, durante la primera semana no se registró crecimiento microbiano. En cambio, a 10 °C, se notó crecimiento durante la primera semana para 400 MPa y luego de la segunda semana para el tratamiento de 600 MPa, llegando a una concentración final igual para todas las muestras. Se observa que las bacterias que fueron sometidas a APH presentan una cinética de crecimiento distinta a la de las muestras no sometidas a altas presiones; esto podría deberse a una adaptación de la bacteria luego de estar expuesta a condiciones adversas.

Figura 7.13. Aplicación del modelo de Gompertz a los recuentos de *Listeria monocytogenes* en carnes almacenadas inoculada en niveles de 10^5 UFC/g y almacenadas: a) 4 °C y b) 10 °C. ● carne fresca, ◆ carne con solución, ■ 400 MPa y ▲ 600 MPa.

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

Bozoglu *et al.*, (2004) estudiaron el efecto de la alta presión hidrostática sobre la *L. monocytogenes* y encontraron que luego de un tratamiento a 450 y 550 MPa estas bacterias se vieron afectadas, pero que durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C hay un proceso completo de reparación que podría deberse a la naturaleza psicrófila de dichas bacterias. Si bien no se conocen aún los sitios en que se producen los daños celulares de las bacterias, podrían afectarse por la APH la pared celular, la membrana citoplasmática, ADN, ARN y ciertas enzimas dependiendo de la cepa específica.

Con respecto a las muestras frescas (CF) y las tratadas con la solución de aditivos químicos (CS) que fueron inoculadas, éstas presentaron un mayor recuento al inicio y se obtuvo al término del almacenamiento una concentración final similar a la presentada por las muestras inoculadas con una menor concentración de bacterias.

Para ambas concentraciones de inóculo se observa que el crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante el almacenamiento refrigerado, a las dos temperaturas 4 y 10 °C, en la carne con el pretratamiento químico es similar al obtenido en la carne fresca, por lo que podemos concluir que el tratamiento químico previo no produce un efecto bacteriostático; esto podría deberse a la capacidad de este patógeno a crecer en elevadas concentraciones de NaCl y a la baja concentración de nitrito en la muestra. Estos resultados concuerdan con lo observado por Myers *et al.*, (2013).

Se observa la influencia que presenta el tratamiento de APH sobre la velocidad de decrecimiento de dicho microorganismo, manteniéndose este durante mayor tiempo en fase de latencia. En la **Tabla 7.5** y en la **Tabla 7.6** se pueden observar los parámetros del desarrollo de *Listeria monocytogenes* en las distintas condiciones de ensayo.

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

Tabla 7.5. Aplicación del modelo de Gompertz al desarrollo de *Listeria monocytogenes* en un medio de cultivo de producto cárneo mantenido a 4 °C y 10 °C y sometido a 400 y 600 MPa. Inóculo 10³ UFC/g

Temperatura (°C)	Muestras	A	C	B	M	μ	LPD	MPD
4 °C	Carne fresa	3.08±0.82	4.96±1.17	3.57±0.13	2.00±0.37	6.51	1.72	8.76
	Carne con tratamiento S1 s/APH	2.65±1.00	3.49±1.71	1.84±0.36	1.44±0.79	2.36	0.89	6.14
	S1 + 400 MPa	1.02±0.06	---	---	---	0.09±0.02	---	---
	S1 + 600 MPa	0.28±0.07	----	---	---	0.16±0.03	---	---
10 °C	Carne fresca	3.10±0.14	4.79±0.27	1.64±0.08	2.09±0.07	2.89	1.48	7.80
	Carne con tratamiento S1 s/APH	2.43±1.60	3.89±2.05	1.31±0.61	1.31±0.69	1.87	0.55	6.32
	S1 + 400 MPa	1.09±0.05	---	---	----	0.06±0.02	---	---
	S1 + 600 MPa	0.25±0.08	----	----	----	0.19±0.04	---	---

A: log (UFC/ml), C: log (UFC/ml), B: semanas, M: semanas, μ: log (UFC/ml) /semanas, MPD: log (UFC/ml)

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

Tabla 7.6. Aplicación del modelo de Gompertz al desarrollo de *Listeria monocytogenes* en un medio de cultivo de producto cárneo mantenido a 4 °C y 10 °C y sometido a 400 y 600 MPa. Inóculo 10⁵ UFC/g

Temperatura (°C)	Muestras	<i>A</i>	<i>C</i>	<i>B</i>	<i>M</i>	μ	<i>LPD</i>	<i>MPD</i>
4 °C	Carne fresca	5.44±0.18	2.09±0.21	3.57±0.13	0.81±0.11	2.74	0.53	7.53
	Carne con tratamiento S1 s/APH	5.13±0.29	2.61±0.79	0.86±0.75	2.24±0.47	0.82	1.08	7.74
	S1 + 400 MPa	0.96±0.45	7.62±0.87	1.05±0.27	1.93±0.19	2.94	0.98	8.58
	S1 + 600 MPa	0.13±0.05	0.76±0.062	1.79±0.51	1.40±0.11	0.50	0.84	0.98
10 °C	Carne fresca	5.43±0.25	2.14±0.29	6.02±0.99	0.81±1.13	4.73	0.64	7.57
	Carne con tratamiento S1 s/APH	5.16±0.010	2.23±0.01	2.78±0.03	1.60±0.03	2.28	1.24	7.49
	S1 + 400 MPa	0.29±1.644	7.91±2.02	1.54±0.41	7.91±2.02	4.48	7.26	8.20
	S1 + 600 MPa	0.33±0.42	8.58±1.52	1.02±0.41	2.57±0.27	3.21	1.59	8.89

A: log (UFC/ml), C: log (UFC/ml), B: semanas, M: semanas, μ : log (UFC/ml) /semanas, MPD: log (UFC/ml)

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

Los modelos matemáticos permiten predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos en función de determinadas condiciones ambientales tales como la temperatura y el pH.

A partir de estas ecuaciones se logra predecir la duración y seguridad de los alimentos así también como determinar la estabilidad microbiana de nuevos productos alimenticios y ayudar en la evaluación de posibles riesgos para la salud pudiendo tener como principal desventaja que las predicciones no fueran del todo precisas, indicando sólo una tendencia o la imposibilidad de predecir fuera del rango de las condiciones consideradas.

Por otro lado, las recomendaciones del Código Alimentario Argentino (CAA) para asegurar la calidad de este tipo de productos es que debe tener ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de muestra.

En el ensayo de presencia-ausencia realizado en las muestras donde no se observó desarrollo, luego del enriquecimiento y siembra en placa se encontró la presencia de *Listeria monocytogenes*, por lo que podemos concluir que el tratamiento de alta presión hidrostática no elimina este patógeno de las muestras cárnicas, sino que dependiendo de la presión aplicada produce daño que puede repararse durante el almacenamiento.

Se puede concluir que la aplicación APH (en dos niveles: 400 y 600 MPa) y un pretratamiento químico con soluciones de curado logran disminuir el recuento inicial de la flora natural de la carne y de *L. monocytogenes* inoculada disminuyendo la concentración microbiana en alrededor de 3 ciclos logarítmicos, prologando la vida útil del producto y manteniendo las características organolépticas en valores aceptables.

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

7.4 Conclusiones parciales

- Las muestras control (carne fresca sin ningún tratamiento) mostraron después de la primera semana, alto recuento microbiano (por encima de 10^6 UFC/g de carne). Los pretratamientos químicos disminuyen los recuentos iniciales de bacterias y limitan el desarrollo durante las primeras dos semanas de almacenamiento.
- Las muestras tratadas con la solución S2 (60 g NaCl/l), que conduce a una concentración en el tejido de 5.24 g NaCl cuando se someten a 400 MPa mantienen su estabilidad microbiológica durante más de 5 semanas (recuento $<2 \log$ UFC/g); mientras que al someterlas a 600 MPa la estabilidad se mantuvo por más de 6 semana (recuento $<2 \log$ UFC/g). En contraste, las muestras tratadas con solución S1 que contiene una menor cantidad de NaCl (30 g NaCl/l) correspondiente a 1.95 g NaCl/g de tejido tuvieron menor estabilidad microbiológica llegando las muestras tratadas a 400 MPa a una concentración de aproximadamente 10^6 UFC/g de bacterias mesófilas luego de 6 semanas de almacenamiento y mientras que las muestras tratadas a 600 MPa llegan a 10^4 UFC/g.
- Las APH y las soluciones de curado afectan los parámetros organolépticos sin embargo estos se mantiene en valores aceptables. Los valores de oxidación lipídica se encuentran por debajo del límite de detección de rancidez del consumidor mientras que los parámetros de color fueron visualmente aceptables ($a^* > 14$).
- Se encontró que variando la concentración de NaCl en la solución se afecta la estabilidad microbiológica después del tratamiento, sin embargo, la vida útil del producto con menor concentración de NaCl se encuentra por

Capítulo 7: Efecto de APH en la estabilidad físico-química y microbiológica

encima de las 4 semanas de almacenamiento cuando se trató con 400 MPa.

- La utilización de APH como procedimiento de control del desarrollo de *Listeria monocytogenes* en un producto cárnico fue efectivo para disminuir los recuentos iniciales después del tratamiento. Se consiguieron reducciones de más de 3 ciclos logarítmicos cuando se inoculó con 10^7 UFC/ml, y más de 2 ciclos cuando se inoculó con 10^5 UFC/ml.
- Cuando la concentración de inoculo es de 10^5 UFC/ml, los recuentos se encontraron por debajo de 2 ciclos logarítmicos durante el almacenamiento refrigerado tanto a 4 °C como a 10°C.
- Utilizando un inoculo de 10^7 UFC/ml y una presión de 400 MPa, se encontró que durante la primera semana de almacenamiento a 10 °C se produce el desarrollo de las bacterias, no siendo así a 4 °C donde se observa crecimiento luego de la primera semana. Cuando se trata con 600 MPa el desarrollo de la bacteria se produce luego de la primera semana a 10 °C, y se mantiene por debajo de 2 ciclos logarítmicos cuando es tratada con 600 MPa.
- La vida útil del producto de carne vacuna tratada con alta presión puede ser regulada, mediante la modificación de la concentración salina en el tejido ajustando la formulación y los tiempos de inmersión en solución preservadora.

CAPÍTULO 8:

CONCLUSIONES

Conclusiones Generales

En el presente trabajo se aplicaron y desarrollaron métodos de conservación no térmicos en muestras de carne bovina. Los tratamientos que se utilizaron fueron Ozono Gaseoso y Altas Presiones Hidrostáticas. Estas técnicas tienen como ventaja que no afectan el valor nutricional de los alimentos al no trabajar con altas temperaturas y permiten prolongar la vida útil de la carne. Se lograron productos con buenas características organolépticas y una estabilidad microbiológica logrando reducir la carga microbiana heterótrofa presente en la carne y la de *Listeria monocytogenes* inoculado en las muestras.

Tratamiento con ozono gaseoso

El tratamiento con ozono gaseoso es una alternativa de preservación de productos cárnicos debido principalmente a su baja toxicidad, a sus propiedades como desinfectante y a la escasez de residuos al finalizar el proceso. Se utiliza en frigoríficos para mantener asépticas las cámaras y desodorizar el ambiente. Es considerado como un agente antimicrobiano de amplio espectro que actúa contra una variedad de patógenos transmitidos por los alimentos.

Se desarrolló un sistema de ozonización mediante el diseño de cámaras de ozonización utilizando recipientes de vidrio herméticos a los cuales se les realizó una adaptación de las tapas para permitir la entrada de ozono y liberar el gas presente en los recipientes. Se implementó un método analítico para la cuantificación de ozono mediante un sistema donde se recogía el ozono circulante y se procedía a realizar una titulación iodométrica. Se pudo establecer que el caudal de aire que circulaba por la cámara presentaba una concentración de ozono constante de 218 mg O₃/m³.

Capítulo 8: Conclusiones

Se modeló matemáticamente mediante un balance de materia no estacionario la evolución de la concentración de ozono dentro de la cámara de ozonización en función del tiempo.

Se logró disminuir en hasta 2 ciclos logarítmicos el recuento de heterótrofos (bacterias ácido lácticas, mesófilos y enterobacterias) en las muestras cárnicas tratadas con ozono, utilizando concentraciones entre 218-283 mg O₃/cm³.

Se optimizó el tratamiento determinando el tiempo y concentración de ozono en la cámara que produjo una disminución significativa del recuento de microorganismos heterótrofos, sin afectar negativamente el color superficial y la oxidación lipídica.

El tratamiento óptimo consistió en pulsos de corriente de ozono de 5 minutos con refuerzos cada 30 minutos durante un período de 5 horas, que condujeron a una concentración de 276 mgO₃/m³ dentro de la cámara.

El tratamiento optimizado permitió la reducción de más de 1 ciclo logarítmico el recuento de *L. monocytogenes* inoculada en la carne frescas en una concentración de 10³ UFC/ml.

El ozono afectó el desarrollo de *L. monocytogenes* ya que durante dos semanas de almacenamiento las muestras inoculadas tratadas con ozono, envasadas al vacío y mantenidas a 4°C no presentaron modificación del número de microorganismos.

El tratamiento con ozono bajo condiciones operativas previamente optimizadas no generó cambios sensoriales en el producto al compararlo con la carne sin tratamiento a partir de ensayos realizados mediante panel sensorial (ensayo triangular).

Capítulo 8: Conclusiones

Tratamientos con alta presión hidrostática

El tratamiento con alta presión es una técnica que se viene utilizando en los últimos años a nivel internacional en la industria alimentaria. La aplicación comercial de APH a la carne roja fresca no se ha utilizado todavía debido a la severa decoloración de la carne a niveles de presión necesarios para la inactivación de microorganismos alterantes y patógenos. Por lo que es necesario desarrollar un método que permita disminuir este efecto, esto se logró aplicando un tratamiento químico previo al tratamiento de alta presión hidrostática.

Se desarrolló un producto cárnico el cual fue sometido a un pre-tratamiento químico y altas presiones hidrostáticas. Esta técnica novedosa de APH permite prolongar la vida útil de los alimentos sin afectar el valor nutricional del mismo.

Mediante técnicas de DSC y FTIR se analizó el efecto de las APH sobre la estructura de las proteínas cárnicas y por medio de reflectancia difusa se analizaron los pigmentos presentes en la carne fresca y la carne tratada con APH.

Se observó que la utilización de altas presiones hidrostáticas por encima de 300 MPa, produce una pérdida del color rojo de la carne fresca debido al efecto de las APH sobre el cromóforo mioglobina.

Se desarrolló una combinación de aditivos químicos (pre-tratamiento) que mejoraron el color de la carne al ser tratada con alta presión. Los aditivos químicos utilizados fueron ácido ascórbico, nitrito de sodio y cloruro de sodio. El mejoramiento del color en la carne luego de la aplicación de alta presión hidrostática se atribuyó a la formación de nitrosomioglobina.

La presencia de ácido ascórbico en la solución de inmersión que contiene nitrito de sodio y cloruro de sodio es esencial para obtener el color deseado en la carne después del tratamiento con alta presión hidrostática.

Capítulo 8: Conclusiones

Mediante diseño central compuesto y metodología de superficie de respuesta se pudieron obtener las ecuaciones que mostraron la dependencia de los parámetros de color con la concentración de ácido ascórbico y nitrito de sodio.

Se obtuvo una solución de aditivos óptima para las dos presiones ensayadas; la misma estaba compuesta por 0.06 g NaNO_2 /100ml, 0.85 g ác. ascórbico/ 100 ml y 6 g NaCl /100 ml, que proporcionaba al tejido el máximo valor de a^* y el mínimo valor de L^* . Esta combinación de aditivos aportaba a las muestras tratadas características atractivas para el consumidor, ya que una coloración pálida o parda produce rechazo.

Se varió la proporción de NaCl en la solución de inmersión con el objeto de analizar el efecto de la concentración salina en la estabilidad de la carne tratada por APH.

Se realizó un panel sensorial utilizando la escala hedónica para analizar la aceptabilidad del consumidor por las muestras conteniendo distintos niveles de cloruro de sodio.

Utilizando FTIR se establecieron las proporciones de las diferentes estructuras secundarias de las proteínas presentes en la carne vacuna (α -hélice, β -plegada, giros β y estructura desordenada), hallándose en mayor proporción la estructura β -plegada. A partir de los espectros de FTIR se pudo determinar la disminución en el contenido de estructuras α -Hélice y un aumento de la estructura desordenada cuando aumentaba la presión aplicada en el tratamiento APH .

Se determinaron por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en las muestras de carne fresca los picos correspondientes a la actina, miosina y colágeno (proteínas estructurales). Se comprobó que tanto el pre-tratamiento químico como la aplicación de alta presión hidrostática provocaba una desnaturalización de las proteínas disminuyendo la entalpía

Capítulo 8: Conclusiones

total observada en los termogramas obtenidos por DSC. Se evidenció en los termogramas la desaparición de los picos correspondientes a las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares cuando eran sometidas a los diferentes niveles de presión y concentración de preservadores químicos.

Mediante espectrometría de reflectancia difusa se desarrolló un método para la determinación del cromóforo nitrosomioglobina, el cual está presente en las muestras tratadas con aditivos químicos. Los preservadores químicos mejoraron la estabilidad del cromóforo natural de la carne (mioglobina) disminuyendo el blanqueamiento de las muestras (producido por la aplicación de APH) debido a la transformación a nitrosomioglobina.

Se pudo determinar la destrucción del cromóforo mioglobina debido a las APH obteniéndose un 85% de decoloración luego de someter la carne a 600 MPa. Esta decoloración fue disminuida al utilizar los preservadores químicos.

Mediante el tratamiento químico y las APH se disminuyó la carga microbiana inicial de la carne (compuesta por bacterias mesófitas, ácido lácticas, enterobacterias, hongos y levaduras). Asimismo se prolongó la vida útil del producto envasado al vacío y almacenado a 4°C por más de 4 semanas en muestras sometidas a 400 MPa y por más de 6 semanas en aquellas tratadas con 600 MPa, sin afectar los parámetros de color de las mismas.

La aplicación de APH es eficiente en la conservación de productos cárnicos. Pudo reducirse el contenido de NaCl en un 50% (de 6% a 3% en la solución preservadora y quedando una concentración en el tejido de 5.24 g NaCl/100 g y 1.95 g NaCl/100 g respectivamente) logrando un producto con adecuados atributos sensoriales y una vida útil.

La utilización de APH como procedimiento de control del desarrollo de *Listeria monocytogenes* en un producto cárnico fue efectivo para disminuir

Capítulo 8: Conclusiones

los recuentos iniciales después del tratamiento, siendo más eficiente el tratamiento a 600 MPa que a 400 MPa. Utilizando la ecuación de Gompertz se pudo predecir la velocidad de crecimiento de los *L. monocytogenes* en función de las condiciones ensayadas tales como la solución de inmersión, el nivel de presión utilizado y la temperatura de almacenamiento refrigerado.

En este trabajo de **Tesis Doctoral** se estudiaron métodos de conservación no térmicos (utilización de ozono gaseoso y altas presiones hidrostáticas) que permitieron desarrollar un producto cárnico mejorando la vida útil del mismo.

Publicaciones realizadas

Los ensayos realizados en esta Tesis dieron lugar a los siguientes trabajos publicados:

❖ Trabajos en revistas internacionales con referato:

- Physicochemical characteristics and quality parameters of a beef product subjected to chemical preservatives and high hydrostatic pressure. Giménez Belén, Graiver Natalia, Califano Alicia, Zaritzky Noemí. Meat Science. Elsevier. ISSN: 0309-1740. Publicado on-line octubre de 2014. Meat Science 100 (2015) 179–188. Champaign, IL. USA. DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.10.017.
- Quality attributes and shelf life of high pressure preserved Beef as affected by pre-treatment condition. Giménez Belén, Graiver Natalia, Califano Alicia, Zaritzky Noemí. Food and Bioprocess Technology. Springer. Publicado on-line agosto de 2017. DOI 10.1007/s11947-017-1967-3.

❖ Trabajos en Congresos Internacionales

- “Desarrollo de un producto cárnico innovador utilizando alta presión hidrostática”. Belén Gimenez, Natalia Graiver, Alicia Califano, Noemí Zartizky. Actas- International Conference on Food Innovation., Concordia, Entre Ríos, octubre de 2014. Tomo II, pag. 117. ISBN 978-950-698-340-6.
- “Alta presión hidrostática en productos cárnicos pre-tratados en salmuera: su influencia en parámetros de calidad” Belén Gimenez, Natalia Graiver, Alicia Califano, Noemí Zartizky. Actas -V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba, 2014 (ISBN 978-987-45738-5-8).

-
- “Estudio de la vida útil de un producto cárnico vacuno sometido a un tratamiento combinado de inmersión en sales de curado y alta presión hidrostática” Belen Giménez, Natalia Graiver, Alicia Califano, Noemi Zaritzky. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL 2015). ISBN 978-987-22165-7-3. Premio IPCVA a la innovación tecnológica en carne vacuna, otorgado por el Instituto de Promoción de la Carne Vacuna argentina.
 - “Parámetros de calidad de un producto carnico sometidos a tratamiento químico y alta presión hidrostática” Dirección de tesis: Director; Natalia Graiver/ Co-director. Noemi Zaritzky. Primeras Jornadas de Tesistas de la Facultad de Ciencias Exactas. Octubre 2015. Pag 41.
 - “Efecto del proceso de alta presión hidrostática sobre el desarrollo de listeria monocytogenes en un producto cárnico” Belén Gimenez, Natalia Graiver, Leda Giannuzzi, Noemí Zartizky. Actas -VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, 2016. ISBN 978-987-45380-0-0.
 - “Efecto de recubrimientos comestibles a base de quitosano para la conservación refrigerada de papas y manzanas mínimamente procesada” Melissa Diaz, Belén Gimenez, Natalia Graiver. Noemí Zartizky. Actas - VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología.
 - Análisis del desarrollo de listeria monocytogenes en un producto cárnico sometido a alta presión hidrostática” Belén Gimenez, Natalia Graiver, Leda Giannuzzi, Noemí Zartizky. Libro digital, IV Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión, La Plata, 2017. ISBN 978-950-34-1453-8.
 - “Influencia del tratamiento de altas presiones hidrostáticas sobre las características fisicoquímicas y el desarrollo microbiano en carne bovina”

Belén Gimenez, Natalia Graiver, Leda Giannuzzi, Noemí Zartizky. IX Congreso Argentino de Ingeniería Química, CAIQ2017, Bahía Blanca, 2017. Actas de Trabajos Completos del CAIQ201, ISSN: 1850-3519.

➤ “Aplicación de una tecnología no térmica (alta presión hidrostática) para la conservación de un producto cárnico” Giménez Belén, Graiver Natalia, Giannuzzi Leda. Zaritzky Noemí. XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL 2017), Mar del Plata.

➤ “Características fisicoquímicas de carne vacuna tratada con soluciones salinas y sometidas a tratamiento de altas presiones.” Gimenez Belén; Rodríguez Hernán B.; Graiver Natalia; Zaritzky Noemí. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas CLICAP 2018-. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria- UNCUIYO. San Rafael, Mendoza. 2018. Revista. Artículo Completo. <http://fcai.uncuyo.edu.ar/upload/02-trabajo-completo-alimentos.pdf>

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- ❖ AHA American Heart Association (2013). 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk a report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines. *Journal of American Coll Cardiology*, 65-101.
- ❖ Andrés, A. I., Møller, J. K. S., Adamsen, C. E., y Skibsted, L. H. (2004). High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on radical formation, lipid oxidation and colour. *European Food Research and Technology*, 219(3), 205–210.
- ❖ Andrés, S.C., Pennisi, S.C., Ranalli, N., Zaritzky, N.E. y Califano. (2012). Healthier Functional Beef Burgers. En: Hendriks, B.P. (Ed.) *Agricultural Research Updates* - Volumen 2 (pp. 185 – 211) Nueva York: Nova Science Publishers, Inc. In-press.
- ❖ Anzaldúa–Morales, A. (1994). La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y la Práctica. Acribia. Zaragoza, España.
- ❖ AOAC (1980). Official methods of analysis. 13th ed. Washington,DC: Association of Official Analytical Chemists. 1018.
- ❖ Attrey, D. P. y Sharma, T. R. (1979). Estimation of fresh mutton color by reflectance spectrophotometry. *Journal of Food Science*. 44, 916-917.
- ❖ Aubourg, S. (1993). Review: interaction of malondialdehyde with biological molecules new trends about reactivity and significance. *International Journal of Food Science y Technology*. 28:323-325.
- ❖ Aymerich, T., Picouet, P. A. y Monfort, J. M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78, 114-129.
- ❖ Bablon, G., Belamy, W.D., Billen, G., Bourbigot, M.M., Daniel, F.B., Erb, F., Gomella, C., Gordon, G., Hartemann, P., Joret, J.-C.,

Bibliografía

Knocke, W.R., Langlaris, B., et al. (1991). Practical Applications of Ozone: Principles and Case Studies. *Lewis Publisher*, USA, 133-316.

❖ Bajovic, B., Bolumar, T., y Heinz, V. (2012). Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. *Meat Science*, 92, 280–289.

❖ Bak, K. H., Lindahl, G., Karlsson, A. H., Lloret, E., Ferrini, G., Arnau, J. y Orlien, V. (2012). High pressure effect on the color of minced cured restructured ham at different levels of drying, pH, and NaCl. *Meat Science*, 90, 690–696.

❖ Barbut, S. y Findlay, C. (1991). Influence of sodium, potassium and magnesium chloride on thermal properties of beef muscle. *Journal of Food Science*, 56, 180-182.

❖ Beilken, S. L., Macfarlane, J. J. y Jones, P. N. (1990). Effect of high pressure during heat treatment on the Warner–Bratzler shear force values of selected beef muscles. *Journal Food Science*, 55(1), 15–18.

❖ Bell, RG; Phillips, DM y Jones, RJ (1997) Predictive microbiology: Quality assurance tool or computer game. Proc.43 ed Internat. *Cong. Meat Science and Technology*. 14-18.

❖ Beltran, F.J., (2004). Ozone Reaction Kinetics for Water and Wastewater System. CRC Press, New York, NY. CLL.

❖ Bembers, M. y Satterlee, L. D. (1975). Physico chemical characterization of normal and PSE porcine muscle myoglobins. *Journal of Food Science*. 40, 40-43.

❖ Benedict, R. C. (1980). Biochemical basis for nitrite-inhibition of *Clostridium botulinum* in cured meat. *Journal of Food Protection*, 43, 877– 891.

❖ Beveridge, G. S. G. y Schechter, R. S. (1970). optimization: Theory and Practice. New York: Mc Graw Hill.

Bibliografía

- ❖ Bevilacqua A. E. y Zaritzky N. E. (1985). Rate of pigment modifications in packaged refrigerated beef using reflectance spectrophotometry. *Journal of Food Processing and Preservation* 10, 1-18.
- ❖ Bhandare S. G, Sherikarv A. T, Paturkar A. M, Waskar V. S. y Zende R. J. (2007). A comparison of microbial contamination of sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops. *Food Control*, 18: 854-868.
- ❖ Biesalski, H.K. (2005). Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet. *Meat Science*, 70, 509–524.
- ❖ Boles, J. A. y Parrish Jr., F. C. (1990). Sensory and chemical characteristics of precooked microwave-reheatable pork roasts. *Journal of Food Science*, 55, 618–620.
- ❖ Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M. y Aymerich, T. (2011). Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. *Food Microbiology*, 28, 804-809.
- ❖ Brooks J., Haines, R. B., Moran, T. y Pace, J. (1940). The function of nitrate, nitrite and bacteria in the curing of bacon and hams. *Food Investing*. Special report. N 49, London.
- ❖ Broumand, H., Ball, C. O. y Stier, E. F. (1958). Factors affecting the quality of prepackaged meat 11 E. Determining the proportions of heme derivatives in fresh meat. *Food Technology*. 12, 65-77.
- ❖ Brown W.D. y Mebine B.L. (1969). Autoxidation of oxymyoglobins. *Journal of Biology Chemistry* (244: 6696)
- ❖ Buchman, G. W. y Hansen, N. (1987). Modification of membrane sulphydryl groups in bacteriostatic action of nitrite. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 79.

Bibliografía

- ❖ Buchanan, R.L. (1992). Predictive microbiology. Mathematical modeling of microbial growth in foods. ACS Symposium Series 484 Ch 24,250-260.
- ❖ Callow, E. H. (1936). Ann. Rep. Food Invest. Board 75 citado en Girard, J.P. 1991. Tecnología de la Carne y de los Productos Cárnicos. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.
- ❖ Cammack, R., Joannou, C. L., Cui, X. Y., Torres Martinez, C., Maraj, S. R. y Hughes, M. N. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411, 475–488.
- ❖ Campus, M., Flores, M., Martinez, A. y Toldrá, F. (2008). Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin. *Meat Science*, 80(4), 1174–1181.
- ❖ Cantalejo M. J., Zouaghi F. y Perez-Arnedo I. (2016). Combined effects of ozone and freeze-drying on the shelf-life of Broiler chicken meat. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 400-407
- ❖ Carballo, J., Fernández, P., Carrascosa, A. V., Solas M. T., Jiménez- Colmenero, F. (1997). Characteristics of low- and high-fat beef patties: Effect of high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 60 (1), 48-53.
- ❖ Carlez, A., Veciana-Nogues, T. y Cheftel, J. C. (1995). Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 528– 538.
- ❖ Chang Fornaris, L. (1998). 6º Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CICTA 6, Cuba.

Bibliografía

- ❖ Chapleau, N.; Mangavel, C.; Compoint, J. P. y De Lamballerie-Anton, M. (2004). *Effect of high-pressure processing on myofibrillar protein structure. Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(1), 66–74.
- ❖ Cheah, P. B. y Ledward, D. A. (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science*, 43(2), 123-134.
- ❖ Cheftel, J. C., Rosec, J. P., Richard, N., Carlez, A. (1993). High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated mince beef muscle. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 26(4), 357-363.
- ❖ Cheftel, C. (1995). Review: high-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*, 1, 75.
- ❖ Cheftel, J. C. y Culiol, J. (1997). Effect of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 46, 211–236.
- ❖ Clark, D.S. y Takacs, J. (1980). Gases as preservatives. In: *Microbial Ecology of Foods I. Factors Affecting Life and Death of Microorganisms*. J.H.
- ❖ Siliker, R.P. Elliot, A.C. Baird-Parker, F.L. Bryan, J.H.B. Christian, D.S. Clark, J.C. Olson Jr. y T.A. Roberts (Eds.). pp. 170-192. Academic Press, New York, N.Y.
- ❖ Comisión del Codex Alimentarius. Programa conjunto de la FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del Codex sobre Aditivos alimentarios. Documento de debate sobre el uso de nitratos y nitritos. (2016) Disponible en URL: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/shproxy/zh/?lnk=1yurl...fao>. (2017)
- ❖ Código Alimentario Argentino. Capítulo I, disposiciones generales artículo 6, Res 205, 7.03.88.

Bibliografía

- ❖ Código Alimentario Argentino. Capítulo V: Normas para la Rotulación y Publicidad de los Alimentos. Capítulo VI: Alimentos cárneos y Afines Disponible en URL:
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp (2018)
- ❖ Código Alimentario Argentino Artículo 255bis - (Res 712, 25.4.85) y Artículo 286 - (Resolución Conjunta SPyRS N° 104/2005 y SAGPyA N°414/2005).
- ❖ Código Alimentario Argentino. Capítulo VI. Alimentos cárneos y afines Artículo 284 - (Resolución Conjunta SPyRS N° 56/2000 y SAGPyA y N° 250/2000).
- ❖ Coll Cárdenas F., Andrés S., Giannuzzi L. y Zaritzky N. (2011). Antimicrobial action and effects on beef quality attributes of a gaseous ozone treatment at refrigeration temperatures. *Food Control*, 1442-1447.
- ❖ Crehan, C.M., Troy, D.J. y 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, 123-130.
- ❖ Cullen, P.J., ValDRAMIDIS, V.P., Tiwari, B.K., Patil, S., Bourke, P. y O'Donnell, C.P., (2010). Ozone processing for food preservation: an overview on fruit juice treatments. Ozone: *Science and Engineering* 32, 166e179.
- ❖ Cutler, J.A., Follmann, D. y Allender, P.S. (1997) Randomized trials of sodium reduction: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 643-651.
- ❖ Da Silva, M. V., Gibbs, P. A. y Kirby, R. M. (1998). Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad (*Trachurus trachurus*). *Journal of Applied Microbiology*, 84, 802-810.

Bibliografía

- ❖ Dean, R. W. y Ball, C. O. 1960. Analysis of the myoglobin fractions on the surfaces of beef cuts. *Food Technology*. 14, 271-286.
- ❖ Derringer, G. y Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*, 12, 214-219.
- ❖ Díez, A. M., Santos, E. M., Jaime, I. y Rovira, J. (2009). Effectiveness of combined preservation methods to extend the shelf life of Morcilla de Burgos. *Meat Science*, 81, 171-177.
- ❖ Dikeman, M.E. (1987). Fat reduction in animals and the effects on palatability and consumer acceptance of meat products. Reciprocal Meat Conference Proceedings. 40:93-101.
- ❖ Dow, S.M., Barbeau, B., Von Gunten, U., Chandrakanth, M., Amy, G. y Hernandez, M. (2006). The impact of selected water quality parameters on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores by monochloramine and ozone. *Water research*. 40. 373-82. 10.1016/j.watres.2005.10.018.
- ❖ Durantón, F., Guillou, S., Simonin, H., Chéret, R. y 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(2012),373–380.
- ❖ Eagerman, B. A., Clydesdale, F. M. y Francis, F. J. (1978). A rapid reflectance procedure for following myoglobin, oxidative or reductive changes in intact beef. *Journal of Food Science*. 43, 468-469
- ❖ Esterbauer, H., Schaur, R. y Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*. 11:81-128.
- ❖ FAO (1991). Guidelines for slaughtering meat cutting and further processing.

Bibliografía

- ❖ FAO. (2000). Consulta FAO/OMS de Expertos sobre la Evaluación de Riesgos de Peligros Microbiológicos en los Alimentos. Estudios FAO: Alimentación y Nutrición, No 7.
- ❖ Fernández, P. P., Sanz, P. D., Molina-García, A. D., Otero, L., Guignon, B. y Vaudagna, S. R. (2007). Convencional freezing plus high pressure-low temperatura treatment: Physical properties, microbial quality and storage stability of beef meat. *Meat Science*, 77, 616-625.
- ❖ Fernández-Martín, F. López-López, I., Cofrades, S. y Jiménez-Colmenero, F. (2009). Influence of adding Sea Spaghetti seaweed and replacing the animal fat with olive oil or a konjac gel on pork meat batter gelation. Potential protein/alginate association. *Meat Science*, 83, 209–217.
- ❖ Findlay, C.J., Parkin, K.L. y Stanley D.W. (1989). Differential scanning calorimetry can determine kinetics of thermal denaturation of beef muscle proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 10, 1–15.
- ❖ Foegeding, E., Lanier, T. y Hultin, H. (2000). Características de los tejidos musculares comestibles. En Química de los alimentos. Fennema O. Zaragoza, España: Editorial Acribia. p 1039-1115.
- ❖ Francis F.J., Clydesdale F.M., Westport, Connecticut. (1975). Food Colorimetry: Theory and Applications. A VI Publishing Company.
- ❖ Franke, W. C. y Solberg, M. 1971. Quantitative determination of metmyoglobin and total pigment in an intact meat sample using reflectance spectrophotometry. *Journal of Food Science*. 36, 515-519
- ❖ Freybler, L. A., Gray, J. I., Asghar, A., Booren, A.M., Pearson, A.M., y Buckley, D. J. (1993). Nitrite stabilization of lipids in cured pork. *Meat Science*, 33, 85–96.
- ❖ Gertzou, I. N., Karabagias, I. K., Drosos P. E. y Riganakos K. A. (2017). Effect of combination of ozonation and vacuum packaging on shelf life extension of fresh chicken legs during storage under

Bibliografía

refrigeration. *Journal of Food Engineering* 213, 18-26

❖ Gibson, AM; Bratchell, N, y Roberts, TA (1988) Predicting microbial growth: growth response of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology*. 6, 155-178.

❖ Gillette, M. (1985). Flavor effects of sodium chloride. *Food Technology*, 39, 47-52.

❖ Gilmour M.W., Graham M., Domselaar G.V., Tyler S., Kent H., Trout-Yake K.M., *et al.* (2010). High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics* 11:1471-85.

❖ Giménez, B., Graiver, N., Califano, A. y Zaritzky, N. (2015). Physicochemical characteristics and quality parameters of a beef product subjected to chemical preservatives and high hydrostatic pressure. *Meat Science*, 100, 179–188.

❖ Girard, J. P. (1991). Tecnología de la Carne y de los Productos Cárnicos. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.

❖ Gottschalk, C.; Libra, J.A. y Saupe, A. (2000). Ozonation of Water and Waste Water: A Practical Guide to Understanding Ozone and its Application, Willey - VCH Verlag GmbH, Weinheim (Germany).

❖ Goutefongea, R., Rampon, V., Nicolas, J. y Dumont, J.P. (1995). Meat color changes under high pressure treatment. In: Proceeding of the 41st International Congress of Meat Science and Technology, 20–25 August 1995, San Antonio, Texas, Pages, 384–385.

❖ Graiver, N., Pinotti, A., Califano, A. y Zaritzky, N. (2006). Diffusion of sodium chloride in pork tissue. *Journal of Food Engineering*, 77, 910–918.

❖ Grigera, J. R. y McCarthy, A. N. (2010). The behavior of the

Bibliografía

hydrophobic effect under pressure and protein denaturation. *Biophysical Journal*, 98, 1626–1631.

❖ Grindley, H.S. (1929). “The influence of potassium nitrate on the action of bacteria and enzymes”. *Studies in Nutrition*, Univ. of Illinois, Urbana, 111., 2, 359.

❖ Hamm R. (1960). “Biochemistry of meat hydratation”. *Advances in Food Research*, 10, 355-463.

❖ Haldane, J. (1901). The red color of salted meat. *J. Hug. Camb.*, 1- 115.

❖ Harrington, J. (1965). The Desirability Function. *Industrial Quality Control*. 21, 494-498.

❖ He F.J. y MacGregor G.A. (2003). How far should salt intake be reduced Hypertension, 42, 1093-1099.

❖ He, Z., Huang, Y., Li, H., Qin, G., Wang, T. y Yang, J. (2012). Effect of high pressure treatment on the fatty acid composition of intramuscular lipid in pork. *Meat Science*, 90, 170–175.

❖ Hedrick, H.B., Aberle E. D., Forrest J. C., Judge M. D. y Merkel, R. A. (1994). *Principles of Meat Science*. 3rd. ed., Kendall Hunt PublishingCo., Dubuque, Iowa. 1, 3, 274, 289, 317.

❖ Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M. y Aymerich, T. (2012). High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 107-112.

❖ Hernández, B. (1994). Estudio del color en carnes: caracterización y control de calidad. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, España.

❖ Herrero A.M. y Romero de Avila M. D. (2006). Innovaciones en el Procesado de Alimentos: Tecnologías no Térmicas. Artículos de

Bibliografía

Revisión, Revista Medicina, Universidad Navarra. Vol 50, Nº 4, 71-74 71.

- ❖ Hood, D.E. y Riordan, E.B. (1973). Discolouration in pre-packaged beef: measurement by reflectance spectrophotometry and shopper discrimination. *Journal of Food Technology*, nº8, págs. 333-334.
- ❖ Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A. M., Farkas, D. F. y Knorr, D. (1989). Biologival effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology*, 43, 99-107.
- ❖ Horvath, M., Bilitzky, L. y Hunter, J. (1985). Fields of utilization of ozone. In: R. J. H. Clark, editor. Ozone. New York, NY.: Science PubUshing Co., Inc. P 257-316.
- ❖ Hugas, M., Garriga, M. y Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model Technology. *Meat Science*, 62, 359-371.
- ❖ Hui, Y. H. (2001). Meat Science and Aplications. Cap. 20 en: Meat Curing Technology,.Edit. Marcel Dekker, New York.
- ❖ Hunt M.C. y Hedrick B. (1977). Chemical, physical and sensory characteristics of bovine muscles from four quality groups. *Journal of Food Science* (42:716).
- ❖ Hunt, N.K. y Marinas, B.J. (1997). Kinetics of Escherichia coli inactivation with ozone. *Water Research* 31, 1355e1362.
- ❖ Hunt, M.C., Acton, J.C., Benedict, R.C., Calkins, C.R., Cornforth, D.P. Jeremiah, L.E., Olson, D.P., Salm, C.P., Savell, J.W. y Shivas, S.D. (1991). American meat Science Association, Guidelines for meat colour evaluation. Chicago, National Live Stock and Meat Board.
- ❖ ICMSF. (1998). Microorganisms in Foods - Microbial Ecology of Food Commodities. Vol 6, Blackie Academic y Professional, London, p 1. 2.
- ❖ Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina (IPCVA)

Bibliografía

2011. Disponible en:

http://www.ipcva.com.ar/nomenclador2015/cortes-detalle.php?categoria_id=6ycorte_id=74. Acceso 29-01-2018.

❖ Jeong, J.Y., S.J. Hur, H.S. Yang, S.H. Moon, Y.H. Hwang, G.B. Park and S.T. Joo. (2009). Discoloration characteristics of 3 major muscles from cattle during cold storage. *Journal of Food Science*. 74(1): C1-C5.

❖ 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 convenient meat products. *Food Science and Technology*, 42, 924-928.

❖ Jofré, A., Aymerich, T., Bover-Cid, S., y Garriga, M. (2010). Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. *International Microbiology*, 13, 105–112.

❖ Johansson, G.; Tornberg, E. y Lundström, K. (1991). Meat colour in loin and ham muscles of normal meat quality from Hampshire, Swedish Landrace and Yorkshire pigs. Proc. 37th International Congress of Meat Science and Technology. Kulmbach, Alemania. P. 394-397.

❖ Jung, S., de Lamballerie-Anton, M. y Ghoul, M. (2000a). Modifications of ultrastructure and myofibrillar proteins of post-rigor beef treated by high pressure. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 33, 319–319.

❖ Jung S., Ghoul M. y 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.

❖ Kaess, G. y Weidemann. (1968a). Ozone treatment of chilled beef I. Effect of low concentration of ozone on microbial spoilage and surface colour of beef. *Journal of Food Technology*, 3:325.

Bibliografía

- ❖ Kaess, G. y Weidemann. (1968 b). Ozone treatment of chilled beef. n. Interaction between ozone and muscle. *Journal of Food Technology*, 3:335.
- ❖ Karaca H. y Velioglu Sedat Y. (2007). Ozone Aplications in Fruit and Vegetable Processing. *Food Reviews International*, 23:91–106. DOI: 10.1080/87559120600998221.
- ❖ Khadre, M. A., Yousef, A. E. y Kim, J. G. (2001). Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food Science*, 66(9), 1242-1252.
- ❖ Kerr, R. H., Marsh, C. T., Shroeder W. F. y Boyer A. E. (1926). The use of sodium nitrite in curing of meat. *J. Agr. Res.*, 33, 541.
- ❖ Kim, J. G., Yousef, A. y Chism, G. (1999). Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. *Journal of Food Safety*, 19, 17-33.
- ❖ Kim J., y Yousef A. (2000). Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. *Journal of Food Science*, Vol. 65, No 3.
- ❖ Kijowski, J. M. y Mast, M. G. E. (1988). Effect of sodium chloride and phosphates on the thermal properties of chicken meat proteins. *Journal of Food Science*, 53 (2), 367-370, 387.
- ❖ Knorr, D. (2000). Process aspects of high-pressure treatment of food systems. En: Barbosa-Cánovas GV y Gould, GW, editor. Food preservation technology series. *Innovations in Food Processing*. Technomic Publishing CO. Inc. 13-31.
- ❖ Kogelschatz, U. (1988). Advanced Ozone Generation. In: Stucki, S. (Ed.), *Process Technologies for Water Treatment*. Plenum Publishers, New York, NY, pp. 87e120.
- ❖ Kolthoff, I. M., Sandell, E. B., Meehan, E. J., y Bruckenstein S. (1985). *Análisis químico cuantitativo*. Editorial: Librería y Editorial Nigar, Buenos Aires.

Bibliografía

- ❖ Koohmaraie, M. (1988a). The role of endogenous proteases in meat tenderness. *Reciprocal Meat Conference Proceedings*. 41:89.
- ❖ Koohmaraie, M., Seideman, S. C., Schollmeyer, J. E., Dutson T. R. y Babiker, A. S. (1988b). Factors associated with the tenderness of three bovine muscles. *Journal of Food Science*. 53(2):409.
- ❖ Kortüm G. (1969). *Reflectance Spectroscopy*, Springer-Verlag, New York.
- ❖ Kowaliski B.R. (1978) *Chemometric Chem. Ind.*, 22, 882.
- ❖ Kramer, A. (1976). Use of color measurement in quality control of foods. *Food Technology*. 62.
- ❖ Larenas-Muñoz F. I. (2016). Evaluación de las variaciones de textura, color y pH en 3 cortes comerciales de carne bovina, envasados al vacío y almacenados en refrigeración a 4°C durante 90 días”. Tesis, Universidad de Concepción Chillán-Chile. <http://repositorio.udec.cl/handle/11594/2120>.
- ❖ Lawrie, R. A. (1974). *Ciencia de la carne*. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- ❖ Ledward, D.A., (1985). Post-slaughter influences on the formation of metmyoglobin in beef muscles. *Meat Science*, n°15, págs. 149-171.
- ❖ Ledward, D.A, Smith, C.G., Clarke, H.M. y Nicholson, M., (1977). Relative role of catalysts and reductants in the formation of metmyoglobin in aerobically stored beef. *Meat Science*, Volume 1, n°2, págs.149-156.
- ❖ Lehman, K.B. (1899). Uber das haemorrhodin, ein neues weitverbreitetes Bluttarbstoffderivat.Sitzt. Phvsikal. Med. Ces. Wurzburg. 4, 57.
- ❖ Lewis, W. y Vose, R. (1926). The use of sodium nitrite in meat curing. *Inst Am. Meat Packers Bull*.

Bibliografía

- ❖ Liu D., Lawrence L.M., Gorski L., Mandrell R.E., Ainsworth A.J. y Austin F.W. (2006). *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular features. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:214-7.
- ❖ Liu, G.R., Wang, Y., Gui, M., Zheng, H.T., Dai, R.T. y Li, P.L. (2012). Combined effect of high hydrostatic pressure and enterocin LM-2 on the refrigerated shelf-life of ready-to-eat sliced vacuum-packed cooked ham. *Food Control*, 24, 64-71.
- ❖ Livingston, D.J. y Brown, W.D., (1981). The chemistry of myoglobin and its reactions (Meat pigments, food quality indices). *Food Technology*, Vol.35, n°5, págs. 238-252.
- ❖ Lowe, C.W. (1967): A report on simplex evolutionary operations for multiple responses. Transactions of the Institution of Chemical Engineers, 45 T3-T7.
- ❖ Lozano, R. (1978.9 El color y su medición. Editorial Americalee. Buenos Aires. Argentina.
- ❖ Lyu F., Shen k., Ding X. y Ma X. (2016). Effect of pretreatment with carbon monoxide and ozone on the quality vacuum packaged beef meats. *Meat Science*, 117, 137-146
- ❖ Ma H.J, Ledward D.A. (2004). High pressure/thermal treatment effects on the texture of beef muscle. *Meat Science*, 68(3):347-55. doi:10.1016/j.meatsci.2004.04.001
- ❖ Ma, H. J., Ledward, D. A., Zamri, A. I., Frazier, R. A. y Zhou, G. H. (2007). Effects of high pressure/thermal treatment on lipid oxidation in beef y chicken muscle. *Food Chemistry*, 104, 1575–1579.
- ❖ 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*

Bibliografía

Science of Food and Agriculture. 21, 568- 571.

- ❖ MacDougall, D.B. (1982). Changes on the colour and opacity of meat.

Food Chemistry, Vol. 9, págs. 75-88.

- ❖ Mackay, J. y Mensah G. (2004) The atlas of heart disease and stroke.

OMS. Disponible en:

http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/. Acceso:21-

10-2013

- ❖ Mackey, B.M. and Manas, P. (2008) Inactivation of ~ *Escherichia coli*

by high pressure. In *High Pressure Microbiology* ed. Michiels, C., Aertsen, A., Bartlett, D. and Yamanos, Y. pp. 53–85. Washington DC: ASM Press.

- ❖ Man, C.M.D. (2007). Technological functions of salt in food products. En: Kilcast, D. y Angus, F. (Eds.). *Reducing salt in foods*. Boca Raton, pp. 157–73.

- ❖ Mañas, P. y 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, 1545-1554.

- ❖ Marcos, B., Kerry, J. P., y Mullen, A. M. (2010). High pressure induced changes on sarcoplasmic protein fraction and quality indicators. *Meat Science*, 85(1), 115–120.

- ❖ Martens, H. y Vold, E. (1976). DSC studies of muscle protein denaturation. En: *Proceedings of the 22nd European meeting of meat research workers*, Malmö, Sweden (p. J 9.3).

- ❖ Martínez M.A., Velazquez G., Cando D., Núñez-Flores R., Borderías A.J. y Moreno H.M. (2017). Effects of high-pressure processing on protein fractions of blue crab (*Callinectes sapidus*) meat.

Bibliografía

Innovative Food Science and Emerging Technologies. 41 (2017) 323–329.

- ❖ Marzocca, M., Marucci, P., Sica, M., Alvarez, E. (2004). Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras de ambientes de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 36: 179-181.
- ❖ Miller, M. F., L. C. Hoover, K. D. Cook, A. L. Guerra, K. L. Huffman, K. S. Tinney, C. B. Ramsey, H. C. Brittin y L. M. Huffman. (1995). Consumer acceptability of beef steak tenderness in the home and restaurant. *Journal of Food Science*. 60(5):964.
- ❖ Morita, H., Yoshikawa, H., Suzuki, T., Hisamatsu, S., Kato, Y., Sakata, R., et al. (2004). Antimicrobial action against verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 of nitric oxide derived from sodium nitrite. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68, 1027–1034.
- ❖ Mossel D.A.A., Moreno B., Struijk C.B. (2003). *Microbiología de los Alimentos*. 2ª ed, Acribia, Zaragoza, p 493, 510, 636.
- ❖ Mundo lácteo y cárnico. Julio /Agosto 2004. Aditivos para Jamón cocido. Revista (on line). <http://mundolacteoycarnico.com>.
- ❖ Muthukumarappan, K., Halaweish, F., Naidu, A.S. (2000). Ozone. In: Naidu, A.S. (Ed.), *Natural Food Anti-Microbial Systems*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 783e800.
- ❖ Myers R.H., Montgomery D. C., Anderson-Cook C. (2009). *Response Surface Methodology. Process and Product Optimization using Designed Experiments*. Third Edition, 13-135. New York City. John Wiley and Sons, Inc. ISBN: 978-0-470-17446-3.
- ❖ Myers, K., Cannon, J., Montoya, D., Dickson, J., Lonergan, S. y Sebranek, J. (2013). Effects of high hydrostatic pressure and varying concentrations of sodium nitrite from traditional and vegetable based sources on the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) sliced ham. *Meat Science*, 94, 69–76

Bibliografía

- ❖ Nacameh, (2008). Difusión vía Red de Computo semestral sobre Avances de ciencia y tecnología en carnes.

- ❖ O'Donnell, C., Tiwari, B.K., Cullen, P.J., Rice, R., (2012). Ozone in Food Processing. Wiley Blackwell Co., UK. avances en Ciencia y Tecnología de la Carne. Vol 2, N° 2. ISSN: 2007-0878.

- ❖ Ohshima, H. y Bartsch, H. (1981). Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine. Cancer Res, 41, 3658-3662.

- ❖ Olson, D. G. (1987). Basic chemistry of meat en Proceedings Annual Sausage and Processed meats short course. Iowa State University. Editado por Rust R. E.

- ❖ OMS - Organización Mundial de la Salud. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series no. 916. Geneva: WHO.

- ❖ OPS - Organización Panamericana de la Salud (2011). Informe final del grupo de expertos de la oms/ops sobre la prevención de las enfermedades cardiovasculares mediante la reducción de la ingesta de sal alimentaria de toda la población. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=21559&Itemid=.pp. 1-54. Acceso: 13-01-2014.

- ❖ Pagán, R., y Mackey, B. (2000). Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: Differences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains. Applied and Environmental Microbiology, 66, 2829-2834.

- ❖ Pascual, A., Llorca, I., Canut, A. (2007). Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. Trends in Food Science and Technology 18, S29-S35.

Bibliografía

- ❖ Patil, S., Bourke, P., Frias, J.M., Tiwari, B.K. y Cullen, P.J., (2009a). Inactivation of *Escherichia coli* in orange juice using ozone. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 551-557.
- ❖ Patil, S., Cullen, P.J., Kelly, B., Frias, J.M. y Bourke, P. (2009b) Extrinsic control parameters for ozone inactivation of *Escherichia coli* using a bubble column. *Journal of Applied Microbiology*, 7. 830-837.
- ❖ Pearson, A.M. (1966). Desirability of beef - its characteristics and their measurement. *Journal of Animal Science*. 25: 843-851.
- ❖ Pearson, A. M. y F. W. Tauber. (1984). *Processed meats*. 2nd edition. AVI Publishing Company, Westport Connecticut, 29.
- ❖ Pearson, A.M. y T. R. Dutson. (1994). *Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products*, 1st edition. Blackie Academic y Professional, New York, 18-19, 48-50, 79, 289-331, 480, 486, 489.
- ❖ Pearson, A. y Gilett, T. (1996). *Curing en Processed Meats*. Tercera edición. New York. Editorial Chapman y Hall.
- ❖ Pérez-Alvarez, J. A., Sánchez, E., Fernández-López, J., Gago, M. A., Ruiz-Peluffo, C., Rosmini, M.R., Pagán, M. J., López-santoveña, F. y Aranda, V. (1997). Lomo embuchado: evolution of the physicochemical and colour parameters during the salting seasoning stage. *Journal of Muscle Food*, 8(4), 395- 411.
- ❖ Pérez, D. y Andújar, G., (2008). Cambios de coloración de los productos cárnicos. *Mundo Lácteo y Cárnico*, nº Enero-Feb. 2008, págs. 7-13.
- ❖ Pierson, M. D., Collins Thompson, D. L. y Ordal, Z. J. (1970). Microbiological, sensory and pigment changes of aerobically and anaerobically packaged beef. *Food Technology*, 24, 171 - 175.
- ❖ Podpecan B., Pengov A. y Vадnjal S. (2007). The source of

Bibliografía

contamination of ground meat for production of meat products with bacteria *Staphylococcus aureus*. *Slovenian Veterinary Research*, 44: 24-30.

❖ Price, J. y Schweigert, B. (1976). *Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos*. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.

❖ Quinn, J. R., Raymond, D. P. y Harwalkar, V. R. (1980). Differential scanning calorimetry of meat proteins as affected by processing treatment. *Journal Food Science*, 45, 1146-1149.

❖ Rasanayagam, V. (2006). Optimization ozone application to increase the selective reactivity. Division 15c Bioengineering poster session, IFT annual meeting.

❖ Reagan, J., Acuff, G., Buege, D., Buyck, M. R., Dickson, J., Kastner, C. L., et al. (1996). Trimming and washing of beef carcasses as a method of improving the microbiological quality of meat. *Journal of Food Protection*, 59, 751-756.

❖ Raso, J. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3), 265-285.

❖ Restaino, L., Erampton, E. W. y Hemphill, J. B. (1995). Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3471-3475.

❖ Realini, C.E., Guàrdia, M. D., Garriga, M., Pérez-Juan, M. y Arnau, J. (2011). High pressure and freezing temperature effect on quality and microbial inactivation of cured pork Carpaccio. *Meat Science*, 88, 542-547.

❖ Renerre, M. (1981). La couleur de la viande et sa mesure. *Viandes et Produits Carnés*, Vol. 2, págs. 10-16.

❖ Renerre, M. y Mazuel, J.P. (1985). Relations entre méthodes de mesures instrumentales et sensorielles de la couleur de la viande. *Science des Aliments* n°5, pág. 541.

Bibliografía

- ❖ Renerre, M. y Bonhomme, J. (1991). Effects of electrical stimulation, boning-temperature and conditioning mode on display colour of beef meat. *Meat Science*, nº 29, págs. 191-202.
- ❖ Rendueles, E., Omer, M.K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., y Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1251-1260.
- ❖ Revista Alimentos argentinos. Edición junio 2012. N° 54. www.alimentosargentinos.gob.ar
- ❖ Rice, R.G. y Bollyky, L.J. (1981). Fundamental aspects of ozone technology. In: Rice, R.G. (Ed.), *Ozone Treatment of Water for Cooling Applications*. The International Ozone Association, Vienna, VA, pp. 1-19.
- ❖ Rivalain, N., Roquain, J. y Demazeau, G. (2010). Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnology Advances*, 28, 659–672.
- ❖ Roberts. (1976). Citado en Girard, J. P. (1991). *Tecnología de la Carne y de los Productos Cárnicos*. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.
- ❖ Rodríguez, F.J. (2003). “Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización”, Ediciones Díaz de Santos, S.A., p.14, Madrid (España).
- ❖ Rubio, B., Martinez, B., Garcia-Cachan, M. D., Rovira, J. y Jaime, I. (2007). Effect of high pressure preservation on the quality of dry cured beef “Cecina de Leon”. *Innovation Food Science and Emerging Technologies*, 8(7), 102-110.
- ❖ Satterlee, L. D. y Hansmeyer, W. (1974). The role of light and surface bacteria in the color stability of pre-packaged beef. *Journal of Food Science*, 39, 305-308.

Bibliografía

- ❖ Seydim, G.Z.B., Bever, P.I. y Greene, A. K. (2004) Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. Short communication. *Food Microbiology*, 21, 475–479.
- ❖ Seydim, G. Z. B., Greene, A. K. y Seydim, A. C., (2004). Use of ozone the in food industry. *LWT e Food Science Technology*, 37, 453e460.
- ❖ Schöbitz, R., Ciampi L. y Nahuelquin Y. (2009). *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur* 37(1): 1-8 DOI:10.4206/agrosur.2009.v37n1-0.1.
- ❖ Shahidi F. (1992). Current and novel methods for stability testing of canola oil. *Inform*, 3, 543-544.
- ❖ Shibamoto, T. y Bjeldanes, L. (1996). Introducción a la toxicología de alimentos. Capítulo 9. Aditivos alimentarios. Editorial Acribia, S.A: Zaragoza España.
- ❖ Simon-Sarkadi, L., Pásztor-Huszár, K., Dalmadi, I. y Kiskó, G. (2011). Effect of high hydrostatic pressure processing on biogenic amine content of sausage during store. *Food Research International* .1-5.
- ❖ Snyder H.E. (1965). Analysis of pigments at the surface of fresh beef with reflectance spectrophotometry. *Journal of Food Science* (30:457)
- ❖ Snyder H.E., Skrdlant H.B. (1966). The infuence of metallic ions on the autoxidation of oxymyoglobin. *Journal of Food Science* (31:1966)
- ❖ Snyder, H. E. and Armstrong, J. (1967). Analysis of reflectance spectrophotometry as applied to meat and model systems. *Journal of Food Science*. **32**, 241.
- ❖ Stewart, M. R., Zipser, M. W. y Watts, B. M. (1965). The use of reflectance spectrophotometry for the assay of raw meat pigments. *Journal of Food Science*. 30, 464-469.
- ❖ Smelt, J. P. P. M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food. Science y Technology*. Vol 9,

152-158.

- ❖ Steenstrup, L. D. y Floros, J. D., (2004). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in apple cider by ozone at various temperatures and concentrations. *Journal of Food Processing and Preservation*, 28, 103-116.
- ❖ Stewart, M. R., Zipser, M. W. y Watts, B. M. (1965). The use of reflectance spectrophotometry for the assay of raw meat pigments. *Journal of Food Science*, 30, 464-469.
- ❖ Stich, H. F., Hornby, A. P. y Dunn, B. P. (1984). The effect of dietary factors on nitrosoproline levels in human urine. *International Journal of Cancer*, 33, 625-628
- ❖ Stivarius, M. R., Pohlman, F., McElyea, K. y Apple, J. K. (2001). Microbial, instrumental and sensory color and odour characteristics of ground beef produced from beef trimmings atreated with ozone or chlorine dioxide. *Meat Science*, 60, 299-305.
- ❖ Stone, H. y J. L. Sidel. (1993). Sensory Evaluation Practices, 2da Ed. Academic. E.E.U.U.
- ❖ Strange, E. D., Benedict, R. C., Ggugger, R. E., Metzger, Y. G. y Swift, C. E. (1974). Simplified methodology for measuring meat colour. *Journal of Food Science.*, 39, p. 988-992.
- ❖ Strazzullo, P., D'Elia, L., Kandala, N. B. y Cappuccio, F. P. (2009). Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *British Medical Journal*, 339-4567.
- ❖ Sun, X. D. y Holley, R. A. (2010). High hydrostatic pressure effects on the texture of meat and meat products. *Journal of Food Science*, 75, 17-23.
- ❖ Suriñach, S., Baro, M. D., Bordas, S. N., Clavaguera, M. T. y Clavaguera- Mora. (1992). Física de Materials, Departament de Física, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193-Bellaterra. Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr, 31,

11-17.

❖ Suzuki, A., Kim, K., Tangi, H., Nishiumi, T. y Ikeuchi, Y. (2006). Application of high hydrostatic pressure to meat and meat processing. In I. M. Nollery F. Toldra (Eds.) *Advanced Technologies for Meat Processing*, 193- 217.

❖ Szerman, N., Barriob, Y., Schroeder, B., Martínez, P., Sancho, A.M., Sanow, C. y Vaudagna, S. R. (2011). Effect of high hydrostatic pressure treatments on physicochemical properties, microbial quality and sensory attributes of beef carpaccio. *Procedia Food Science*, 1, 854-861.

❖ Szerman N., Denoya G. I., Sanow L. C., Ormando P., Vranic M. L., Vaudagna S. R. y Barrio Y. X. (2012). Aplicación de la tecnología de altas presiones hidrostáticas en el procesamiento de alimentos. I Congreso de valor agregado en origen; Manfredi, Córdoba; 18 al 20 de julio de 2012. <http://inta.gob.ar/documentos/aplicacion-de-la-tecnologia-de-altas-presiones-hidrostaticas-en-el-procesamiento-de-alimentos/>. Accedida el 12/11/2017.

❖ Tao, Y., Sun, D.W., Hogan, E. y Kelly, A. L. (2014). Chapter 1 – High pressure processing of foods: an overview. *Emerging Technologies for Food Processing* (Second Edition), Pages 3–24.

❖ Taylor, R. S., Ashton, K. E., Moxham, T., Hooper, L. y Ebrahim, S. (2011). Reduced dietary salt for the prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 7, CD009217.

❖ Tironi, V. A., Tomas, M. C. y Añon M. C. (2007). Lípid and protein deterioration during the chilled storage of minced sea salmon (*Pseudopercis Semisdasciata*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(12): 2239- 2246.

❖ Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70, 493–508.

Bibliografía

- ❖ Ulu, H. (2004). Evaluation of three 2-thiobarbituric acid methods for the measurement of lipid oxidation in various meats and meat products. *Meat Science*, 67, 683–687.
- ❖ USDA-FSIS (1999). Food Ingredients and Sources of Radiation Listed or Approved for Use in the Production of Meat and Poultry Products; Final Rule. Subpart C – 424.21. Use of Food Ingredients and Sources of Radiation. Code of Federal Regulations, title 9, vol. 64, part 424. Office of Federal Register, National Archives and Records, GSA, Washington, DC,. 72185– 72186
- ❖ Van den Oord, A. H. A. y Wesdorp, J. J. (1971a). Analysis of pigments in intact beef samples. *Journal of Food Technology*, 6, 1-13. (Chapter III).
- ❖ Varnam, A. y Sutherland, J. P. (1995). Cured meat in: Meat and meat products. Technology, Chemistry and Microbiology. Primera Edición Ed. Chapman and Hall. Vol 3. Capítulo 4.
- ❖ Vaughn, J.M., Chem, Y.S., Lindburg, K. y Morales, D. (1987). Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2218e2221.
- ❖ Von Gunten, U. (2003). Ozonation of drinking water. Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research* 37, 1443e1467.
- ❖ Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V. y Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science*, 86, 196–213
- ❖ Wen-Ching, K., Wen-Chian, L., Yu-Ting, T. y Chang-Wei, H., (2007). Kinetics of winter mushrooms (*Flammulina velutipes*) microstructure and quality changes during thermal processing. *Journal of Food Engineering*, 81, 587–598.
- ❖ Whiting, R. (1995). Microbial Modelling in Foods. Critical Reviews in *Food Science and Nutrition* 35, 6, 467-494.

Bibliografía

- ❖ Woods, L. F. J., Wood, J. M., & Gibbs, P. A. (1981). The involvement of nitric oxide in the inhibition of the phosphoroclastic system in *Clostridium sporogenes* by sodium nitrite. *Journal of General Microbiology*, 125, 399–406.
- ❖ Wickramanayake, G. B. (1991). Disinfection and sterilization by ozone. In: Seymour, S. B. (Ed.), *Disinfection, Sterilization and Preservation*, fourth ed. Lea and Febiger, Malvern, PA, pp. 182e190.
- ❖ Wright, D. J., Leach, I. B. y Wilding, P. (1977). Differential scanning calorimetric studies of muscle and its constituent proteins. *J. Sci, Food Amic* 28.557-564.
- ❖ Xiong, Y. L. (1997). Structure-function relationships of muscle proteins en *Food proteins nad their applications*. Editado por Sirinivasan Damodaran, Alain Paraf, Marcel Dekker. New York- Hon Kong.
- ❖ Yang, A., Lanari, M. C, Brewster, M. y Tume, R. K. (2002). Lipid stability and meat colour of beef from pasture and grain fed cattle with or without vitamin E supplement. *Meat Science*, 60, 41–50.
- ❖ Zamora, M. C., y Zaritzky, N. E. (1987). Potassium sorbate inhibition of microorganisms owin in refrigerated beef. *Journal of Food Science*, 52, 257.
- ❖ Zuma, F., Lin, J. y Jonnalagadda, S.B. (2009). Ozone initiated disinfection kinetics of *Escherichia coli* in water. *Journal of Environmental Science and Health. Part A* 44, 48-56.
- ❖ Zwietering, M. H., Jongenburger, 1., Rombouts, F. M. y Van't Rict, K (1990). Modelling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 56,1875.