



Universitat de Girona

# EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN UN PRODUCTO DE ORIGEN ANIMAL, EL JAMÓN CURADO Y EN UN PRODUCTO VEGETAL, EL NABO

**Maria CLARIANA ORDUÑA**

**Dipòsit legal: GI-I43-2012**

<http://hdl.handle.net/10803/53634>

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei [TDX](#) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio [TDR](#) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the [TDX](#) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



*TESIS DOCTORAL*

*EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ALTAS  
PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN UN PRODUCTO  
DE ORIGEN ANIMAL, EL JAMÓN CURADO Y EN  
UN PRODUCTO VEGETAL, EL NABO.*

*MARIA CLARIANA ORDUÑA  
2011*

**TESIS DOCTORAL**

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ALTAS  
PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN UN PRODUCTO  
DE ORIGEN ANIMAL, EL JAMÓN CURADO Y EN  
UN PRODUCTO VEGETAL, EL NABO.**

**MARIA CLARIANA ORDUÑA  
2011**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN TECNOLOGÍA  
(TECNOLOGÍA ALIMENTARIA/IRTA)**

**DIRECTOR: Dr. JOSÉ ANTONIO GARCÍA  
REGUEIRO**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
DOCTORA POR LA UNIVERSITAT DE GIRONA**

**LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO HA SIDO POSIBLE  
GRACIAS A LA FINANCIACIÓN DEL MINISTERIO DE  
EDUCACIÓN Y CIENCIA A TRAVÉS DEL PROYECTO RTA 04-026,  
DE LOS FONDOS FEDER (UE) Y DE LA BECA PREDOCTORAL INIA  
nº 94 DEL AÑO 2006.**



*"La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante".*

*Miguel de Unamuno (1864-1936)*



Esta tesis doctoral se ha realizado en la Unidad de Funcionalidad y Nutrición del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, IRTA, de Monells.

La realización del siguiente trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA, a través del proyecto INIA RTA04-26 y de la beca predoctoral nº 94 del año 2006. También han contribuido al presente trabajo el Ministerio de Educación y Ciencia con el programa CONSOLIDER y la Comisión Europea mediante los fondos FEDER.







— *A* veces es difícil poner orden de importancia en la gente que te apoya y que te quiere, así que trazar una cronología de afectos parece lo más adecuado para este apartado.

Primeramente, gracias Santiago, M<sup>a</sup> Carmen y Jacobo por hacerme entender que el estudio no hace al hombre, pero el mundo es mucho más entretenido si pierdes un poco de tiempo buscando el por qué de las cosas. Gracias también a Rosa, Ester y a Maika por confiar y parar los golpes.

Siguiendo el orden cronológico, esta tesis no habría sido posible si Tony Fernández no se hubiera cruzado en mi camino y en mi vida una calurosa noche de verano. Tu variada gama de grises me empujó hasta aquí. También gracias a Dolors por tus comidas y tu cariño y a Antonio, Raquel y Jordi por haberme acogido en vuestra familia.

Tampoco habría llegado hasta aquí si Isabel Díaz no hubiera confiado, incluso más que yo misma, en mis capacidades. Gracias por haberme dejado acosar a José Antonio García Regueiro durante estos cinco años. Y José Antonio, gracias por haberme dejado ser y expresarme, equivocarme reiteradamente y enseñarme que la ciencia también puede ser especulativa y creativa. Gracias por ser mi libro gordo de Petete particular, el que todo lo sabe.

M<sup>a</sup> José Bautista gracias por esos 70 minutos diarios de confidencias y por tu sinceridad, aunque a veces duela.

No puedo dejar de agradecerle a Máximo Castellari su paciencia y tenacidad para corregir mi visión dispersa de las cosas, y ayudarme a ser coherente, concisa y realista.

También hubo gente como Beatriz Sánchez, Carla Comas o Rodrigo Morales que volaron a otros lares pero que su amistad hizo que no desfalleciera en los momentos menos buenos.

De mi paso por Irlanda quisiera agradecer a Begonya Marcos su confianza en mí, aunque los aparatos y la lengua se pusiesen en contra.

A Marta Gratacós, compañera de fatigas e imperecedera creyente en el trabajo bien hecho, gracias por estar ahí.

A Luís Guerrero, mi gurú de la estadística, gracias por abrirme los ojos y hacerme discernir entre lo correcto y lo incorrecto.

No puedo olvidarme de los miembros de mi unidad, la unidad 42. Narcís Sais, sólo en ti se podían combinar una enorme fuerza bruta y un gran corazón, gracias por tu paciencia y conocimientos. María Hortós, antes y ahora, eres un modelo inalcanzable a seguir, así que seguiremos esforzándonos. Eugeni Anselmet, ahora con cariño puedo llamarte “abuelo cebolleta”. Carmen Sárraga, tus sarcásticos comentarios encierran una cabeza llena de sorpresas. Dolors Roca y Elena Viñas, gracias por soportar el frío y el tedio conmigo. Al resto de los integrantes de esta variopinta unidad: Albert Ribas, Tiago Cardoso, Amanda Núñez, Carmen Rabaneda, Eva Roldós, Ángel Valero y Mariano Bellini, gracias por compartir el camino.

Gracias también a Nuria Panella, Joel González, Pedro Rodríguez, Katy, Fabiana y Ana Masdeu por ser compañeros de fatigas, despacho y largas horas de trabajo. También quiero agradecerle a Yolanda Beltrán su fraternal camaradería.

Por último, gracias a todas aquellas personas que han colaborado o apoyado a esta persona y a este proyecto. Gracias IRTA.



— Esta tesis se presenta como un compendio de las siguientes publicaciones:

### Publicación 1:

Clariana, M., Gratacós–Cubarsí, M., Hortós, M., García–Regueiro, J. A., & Castellari, M. (2010). Analysis of seven purines and pyrimidines in pork meat products by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(26), 4294–4299.

*Journal of Chromatography A* tiene un factor de impacto de 4,101 y está situada en el primer cuartil (4/69) de la categoría Analytical Chemistry (2009, Journal Citation Reports®, Thomson Reuters).

### Publicación 2:

Clariana, M., Díaz, I., Sárraga, C., & García–Regueiro, J. A. *In press*. Comparison of the Determination of Eight Cholesterol Oxides in Dry–Cured Shoulder by GC–FID, GC–MS, and GC Tandem Mass

Spectrometry. Food Analytical Methods, doi: 10.1007/s12161-010-9190-0.

Food Analytical Methods tiene un factor de impacto de 1,400 y está situada en el segundo cuartil (37/118) de la categoría Food Science and Technology (2009, Journal Citation Reports®, Thomson Reuters).

### Publicación 3:

Clariana, M., Guerrero, L., Sárraga, C., Díaz, I., Valero, A., & García-Regueiro, J. A. *In press*. Influence of high pressure application on the nutritional, sensory and microbiological characteristics of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. Effects along the storage period. Innovative Food Science and Emerging Technologies, doi: 10.1016/j.ifset.2010.12.008.

Innovative Food Science and Emerging Technologies tiene un factor de impacto de 2,174 y está situada en el primer cuartil (20/118) de la categoría Food Science and Technology (2009, Journal Citation Reports®, Thomson Reuters).

### Publicación 4:

Clariana, M., Guerrero, L., Sárraga, C., & García-Regueiro, J. A.. Effects of high pressure application (400 and 900 MPa) and refrigerated storage time on the oxidative stability of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. Meat Science, doi: 10.1016/j.meatsci.2011.07.18.

Meat Science tiene un factor de impacto de 1,954 y está situada en el primer cuartil (26/118) de la categoría Food Science and Technology (2009, Journal Citation Reports®, Thomson Reuters).

**Publicación 5:**

Clariana, M., Valverde, J., Wijngaard, H., Mullen, A. M., & Marcos, M. (2011). High pressure processing of swede (*Brassica napus*): Impact on quality properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 85–92.

*Innovative Food Science and Emerging Technologies* tiene un factor de impacto de 2,174 y está situada en el primer cuartil (20/118) de la categoría Food Science and Technology (2009, Journal Citation Reports®, Thomson Reuters).

**Publicación 6 (short communication):**

Clariana, M., Hortós, M., García–Regueiro, J. A., & Castellari, M. *In press*. Effect of High Pressure Processing on the level of some purines and pyrimidines nucleosides and bases in dry cured and cooked ham. *Meat Science*, doi: 10.1016/j.meatsci.2011.01.031.

*Meat Science* tiene un factor de impacto de 1,954 y está situada en el primer cuartil (26/118) de la categoría Food Science and Technology (2009, Journal Citation Reports®, Thomson Reuters).

**Publicación 7 (short/brief communication):**

Clariana, M., & García–Regueiro, J. A. (2011). Effect of High Pressure Processing on cholesterol oxidation products in vacuum packaged sliced dry–cured ham. *Food and Chemical Toxicology*. 49, 1468–1471.

*Food and Chemical Toxicology* tiene un factor de impacto de 2,114 y está situada en el primer cuartil (13/118) de la categoría Food

Science and Technology (2009, Journal Citation Reports®, Thomson Reuters).









RESUMEN	1
SUMMARY	5
ANTECEDENTES	9
INTRODUCCIÓN	17
<b>1. Conservación mediante la aplicación de altas presiones hidrostáticas</b>	<b>17</b>
1.1. Requerimientos técnicos	21
1.2. Efecto de la presurización en los diferentes componentes de los alimentos	24
1.2.1. Agua	24
1.2.2. Proteínas	25
1.2.3. Enzimas	28
1.2.4. Hidratos de carbono	30
1.2.5. Lípidos	31
1.2.6. Vitaminas	33
1.2.7. Antioxidantes	35
1.3. Efecto de la alta presión en los microorganismos	36
1.4. Efecto de las altas presiones en la calidad sensorial de los alimentos	38
1.5. Aplicaciones de la AAPH	40
<b>2. Purinas y pirimidinas</b>	<b>42</b>
2.1. Descripción general	42
2.2. Propiedades de las purinas y pirimidinas	45

2.3. Técnicas analíticas empleadas en la determinación	47
2.4. Efecto de las altas presiones	49
<b>3. Óxidos de colesterol</b>	<b>51</b>
3.1. El colesterol	51
3.2. Oxidación del colesterol	53
3.3. Factores que afectan a la oxidación del colesterol	55
3.4. Efectos nocivos de los óxidos de colesterol	57
3.5. Determinación de óxidos de colesterol en alimentos	58
3.6. Efecto de las altas presiones en la oxidación del colesterol	61
<b>4. Jamón curado</b>	<b>64</b>
4.1. Aplicabilidad de las altas presiones en el jamón curado	66
<b>5. El nabo</b>	<b>69</b>
5.1 Aplicabilidad de las altas presiones en el nabo	71
<b>OBJETIVOS</b>	<b>75</b>
<b>PLAN DE TRABAJO</b>	<b>77</b>
<b>PUBLICACIÓN 1</b>	<b>83</b>
Analysis of seven purines and pyrimidines in pork meat products by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry.	
<b>PUBLICACIÓN 2</b>	<b>91</b>
Comparison of the Determination of Eight Cholesterol Oxides in Dry–Cured Shoulder by GC–FID, GC–MS, and GC Tandem Mass Spectrometry.	
<b>PUBLICACIÓN 3</b>	<b>103</b>
Influence of high pressure application on the nutritional, sensory and microbiological characteristics of sliced skin vacuum packed dry–cured ham. Effects along the storage period.	
<b>PUBLICACIÓN 4</b>	<b>115</b>
Effects of high pressure application (400 and 900 MPa) and refrigerated storage time on the oxidative stability of sliced skin vacuum packed dry–cured ham.	
<b>PUBLICACIÓN 5</b>	<b>125</b>
High pressure processing of swede (Brassica napus): Impact on quality properties.	
<b>PUBLICACIÓN 6</b>	<b>135</b>
Effect of High Pressure Processing on the level of some purines and pyrimidines nucleosides and bases in dry cured and cooked ham.	

<b>PUBLICACIÓN 7</b>	<b>141</b>
Effect of High Pressure Processing on cholesterol oxidation products in vacuum packaged sliced dry-cured ham.	
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>149</b>
<b>1. Desarrollo de nuevos métodos de análisis</b>	<b>150</b>
1.1. Análisis de purinas y pirimidinas	150
1.2. Análisis de óxidos de colesterol	155
<b>2. Aplicación de altas presiones en alimentos</b>	<b>158</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>175</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>179</b>

<b>Tabla 1. Efecto de la presurización en diferentes enzimas</b>	<b>29</b>
--	-----------

**Publicación 1**

Table 1. MRM conditions for PPs analysis	88
Table 2. Calibration curve and validation parameters	89
Table 3. PPs levels in commercial samples	89

**Publicación 2**

Table 1. MS conditions for COPs analysis	96
Table 2. Calibration curve and validation parameters for COPs analysis by GC–FID	98
Table 3. COPs levels in dry–cured shoulder analyzed by GC–FID and GC–MS and MS/MS	98
Table 4. Calibration curve and validation parameters for COPs analysis by GC–MS and GC–MS/MS	100

**Publicación 3**

Table 1. Table of significances for the different parameters studied in function of the model applied and the fixed effect evaluated	108
Table 2. Effect of light storage time, different light conditions after 50 days of refrigerated storage and HPP at 600 MPa on diverse parameters measured on sliced skin vacuum packed dry–cured ham	109
Table 3. Parameters measured on sliced skin vacuum packed dry–cured ham that showed interaction between light storage time and treatment at 600 MPa or between light conditions after 50 days of refrigerated storage and treatment at 600 MPa	110
Table 4. Effect of light storage time and light conditions after 50 days of refrigerated storage in representative fatty acid contents corresponding to total fatty acid fraction	110
Table 5. Effect of light storage time and different light conditions after 50 days of refrigerated storage in representative fatty acid contents corresponding to phospholipids fatty acid fraction	110
Table 6. Effect of light storage time and light conditions after 50 days of refrigerated storage on fatty acid contents corresponding to free fatty acid fraction	111
Table 7. Effect of light storage time, different light conditions after 50 days of refrigerated storage and HPP at 600 MPa on sensory attributes of sliced skin vacuum packed dry–cured ham	113

**Publicación 4**

Table 1. Effect of the different light conditions after 50 days of refrigerated storage and HPP at 400 MPa on diverse parameters measured on sliced skin vacuum packed dry–cured ham	119
Table 2. Effect of storage time in retailer conditions and HPP at 400 MPa on diverse parameters measured on sliced skin vacuum packed dry–cured ham	120

Table 3. Effect of storage time in retailer conditions after 50 days of refrigerated storage and HPP at 900 MPa on diverse parameters measured on sliced skin vacuum packed dry-cured ham	121
Table 4. Parameters measured on sliced skin vacuum packed dry-cured ham that showed interaction between treatment and level of pressure assayed during storage time in retailer conditions and after 50 days of refrigerated storage with different light conditions	121
Table 5. Effect of storage time in retailer conditions after 50 days of refrigerated storage and HPP at 400 MPa on sensory attributes of sliced skin vacuum packed dry-cured ham	122
<b>Publicación 5</b>	
Table 1. Instrumental colour parameters of non-treated and processed (blanching and high pressure processing) swede roots	130
Table 2. Effect of the pressure level applied during HPP on the quality parameters of pressurised swede roots	130
Table 3. Antioxidant indices and glucosinolates content of non-treated and processed (blanching and high pressure processing) swede roots	130
<b>Publicación 6</b>	
Table 1. PPs contents in dry-cured ham as function of treatments	138
Table 2. PPs contents in cooked ham as function of treatments	138
<b>Publicación 7</b>	
Table 1. COP contents in dry-cured ham analysed by GC-MS and MS/MS	144
<b>Tabla 2.</b> Propiedades de algunas purinas y pirimidinas	152
<b>Tabla 3.</b> Concentraciones de purinas y pirimidinas en muestras comerciales	153
<b>Tabla 4.</b> Efecto de los diferentes valores de presión en la textura instrumental del nabo y en la textura sensorial del jamón curado loncheado	159
<b>Tabla 5.</b> Efecto de los diferentes valores de presión en el color instrumental (CIELAB L*, a* y b*) del nabo y del jamón curado loncheado	162
<b>Tabla 6.</b> Efecto de los diferentes valores de presión en los compuestos con actividad antioxidante en el nabo y en el jamón curado loncheado	165
<b>Tabla 7.</b> Efecto de los diferentes valores de presión en el contenido de glucosinolatos en el nabo y de purinas y pirimidinas en el jamón curado loncheado	168

**Tabla 8.** Comparación del efecto de la presurización a 400 y 600 MPa  
en los atributos sensoriales del jamón curado loncheado 169

<b>Figura 1.</b> Maquina industrial de altas presiones hidrostáticas _____	21
<b>Figura 2.</b> Esquema de funcionamiento de la maquina de altas presiones hidrostáticas en discontinuo _____	22
<b>Figura 3.</b> Diagrama de fases del agua _____	40
<b>Figura 4.</b> Estructura molecular de algunas purinas y pirimidinas _____	42
<b>Figura 5.</b> Ruta de degradación de los nucleótidos purínicos _____	43
<b>Figura 6.</b> Ruta de degradación de los nucleótidos pirimidínicos _____	44
<b>Figura 7.</b> Molécula de colesterol _____	51
<b>Figura 8.</b> Estructura molecular de los óxidos de colesterol más comunes en alimentos _____	54
<b>Publicación 1</b>	
Figure 1. Molecular structures of purines and pyrimidines _____	86
Figure 2. Chromatographic profile obtained by UV detection ( $\lambda = 254$ nm) corresponding to an extract of dry-cured ham _____	87
Figure 3. MRM profile corresponding to the quantifier transitions of a cooked ham extract _____	88
<b>Publicación 2</b>	
Figure 1. Chromatographic profile obtained by GC-FID corresponding to an extract of dry-cured shoulder _____	97
Figure 2. MS profile corresponding to SIM and SCAN mode of a dry-cured shoulder extract _____	99
<b>Publicación 3</b>	
Figure 1. Observations with optical microscopy _____	112
<b>Publicación 5</b>	
Figure 1. Compression force of non-treated and processed (blanching and high pressure processing) swede roots _____	131
Figure 2. Cutting force and displacement at maximum cutting force of non-treated and processed (blanching and high pressure processing) swede roots _____	131
Figure 3. Expressible moisture of non-treated and processed (blanching and high pressure processing) swede roots _____	131







La aplicación de altas presiones hidrostáticas es un proceso físico que se realiza tanto a temperatura ambiente como con temperaturas inferiores a ésta, y que se puede utilizar para desactivar ciertos microorganismos presentes en los alimentos. Para ello se utilizan habitualmente presiones comprendidas entre 300 y 700 MPa. La presurización es una tecnología que data de finales del siglo XIX, aunque desde un punto de vista comercial se puede considerar que su estudio, desarrollo y aplicación en los alimentos comenzó hace unos cuatro lustros, existiendo en la actualidad una abundante bibliografía acerca del efecto de las altas presiones en la viabilidad microbiana y en las propiedades funcionales de los alimentos. Esta técnica de higienización de alimentos es ya una realidad comercial, y entre sus ventajas destacan el mantenimiento de la seguridad alimentaria y de las propiedades nutricionales con una mínima modificación del flavor y del sabor de los alimentos (Cheftel, 1995).

Si bien el efecto sobre los microorganismos ha sido muy estudiado, en otros aspectos importantes para la vida útil, seguridad abiótica y calidad sensorial, como son los procesos oxidativos, la información disponible en carnes es escasa. En productos vegetales, cuyo consumo se relaciona con un alto aporte de

compuestos con acción antioxidante, la bibliografía disponible es más extensa. Sin embargo, el efecto de la presurización es muy diferente en función del producto vegetal en estudio, ya que la estructura física del alimento tiene una gran influencia en la acción de las altas presiones.

El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar en dos tipos de alimentos, el nabo y el jamón curado, el efecto de la alta presión (200–900 MPa) en los compuestos con actividad antioxidante y en los procesos oxidativos, así como en los atributos sensoriales que podrían verse afectados por la oxidación de modo directo o indirecto. Además, se estudió el efecto de la presión en otros componentes como los glucosinolatos, las purinas y pirimidinas, que pueden tener relevancia en la salubridad y en la calidad sensorial de los alimentos estudiados. Para ello se plantearon y desarrollaron siete etapas de investigación. En la primera se desarrolló un método analítico que permitiera cuantificar el contenido de purinas y pirimidinas en matrices cárnicas. En la segunda etapa se optimizó un método analítico para determinar el contenido de óxidos de colesterol en estas matrices. Una vez validados estos métodos analíticos se inició el proceso de presurización de los alimentos. En la tercera y cuarta etapas se presurizó jamón curado loncheado empaquetado a 400, 600 y 900 MPa y se evaluó su efecto en la estabilidad oxidativa durante 50 días de almacenamiento en refrigeración en presencia o ausencia de luz. En estas etapas se determinó la actividad de los enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa), los índices de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), el contenido de vitamina E, los parámetros fisicoquímicos, el color instrumental, el recuento microbiano y los atributos sensoriales. En el estudio de 600 MPa además se cuantificaron los ácidos grasos de las fracciones correspondientes a los ácidos grasos totales, libres y fosfolípidos. En la quinta etapa se aplicó el método desarrollado para el análisis de purinas y pirimidinas a muestras de jamón curado

presurizado a 600 y 900 MPa. En la sexta fase se evaluó el efecto de la aplicación de altas presiones, 600 y 900 MPa, en el contenido de óxidos de colesterol del jamón curado loncheado. Por último, en la séptima etapa se evaluó el efecto de diferentes combinaciones de presión y temperatura, 200, 400 y 600 MPa, a 20 y 40 °C, en el contenido de compuestos con actividad antioxidante del nabo. En este estudio también se evaluaron otros parámetros como el contenido en glucosinolatos y el color y la textura instrumentales, que tienen relevancia para la calidad sensorial del nabo.

Los principales resultados obtenidos en el presente trabajo fueron: Primero, un nuevo método fiable y rápido para la determinación de las purinas inosina, adenosina, guanosina, hipoxantina, xantina y ácido úrico; y la pirimidina uridina, en matrices cárnicas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección por espectrometría de masas. Segundo, la optimización del método para el análisis de óxidos de colesterol permitió determinar por primera vez en paletilla curada simultáneamente el 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol,  $\beta$ -epoxicolesterol,  $\alpha$ -epoxicolesterol, 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol, colestanoetriol, 25-hidroxicolesterol y 7-cetocolesterol. Tercero, la presurización del jamón curado loncheado empaquetado a 600 MPa no produjo cambios en la estabilidad oxidativa, ya que no se observaron diferencias tras 50 días de almacenamiento en refrigeración en el contenido de ácidos grasos de las diferentes fracciones estudiadas, en los índices de TBARS ni en la actividad de los enzimas antioxidantes. Sin embargo esta presión produjo el emblanquecimiento del jamón, así como un incremento en la dureza y en la percepción de salado. Cuarto, la presurización a 400 MPa modificó en menor medida la percepción de salado y la dureza tras 50 días de almacenamiento, aunque la pérdida en la intensidad de color fue similar a la encontrada a 600 MPa. El tratamiento a 400 MPa produjo una ligera disminución en la estabilidad oxidativa medida como un

incremento en la actividad del enzima superóxido dismutasa. La presurización a 900 MPa produjo en el jamón curado loncheado una disminución de la actividad del enzima superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa a la vez que un incremento en el contenido de vitamina E asociado potencialmente a la rotura de las membranas celulares y la parcial desactivación de los enzimas. Por último, la combinación de presión y temperatura que mantuvo mejor la textura, el color y el contenido de compuestos con acción antioxidante en el nabo fueron 600 MPa a 20°C.



---

The application of high hydrostatic pressure is a physical process that is performed either at room temperature or at colder temperature, and it can be employed to deactivate microorganisms in food. For this purpose, pressures between 300 and 700 MPa are commonly used. Pressurization is a technology that dates from the late nineteenth century, although from a commercial point of view the study, development and application to food of this technology began about two decades ago, nowadays, there is a substantial literature concerning to the effect of high pressure on both microbial viability and functional properties of food. This food sanitation technique is already a commercial fact, and its advantages include the maintenance of food security and nutrition with minimal modification of the flavor and taste of foods (Cheftel, 1995).

While the effect on microorganisms has been extensively studied, the oxidative processes, which are relevant to the shelf-life, abiotic safety and sensory quality of food, have been little studied. In vegetable products, whose consumption is associated with a high intake of antioxidant compounds, the literature is more extensive. However, the effect of pressurization depends largely on the plant

product investigated, since its physical structure influences the action of high pressure.

The aim of the present study has been to evaluate two types of foods, turnips and dry-cured ham, the effect of high pressure (200–900 MPa) on compounds with antioxidant activity and on oxidative processes, as well as on sensory attributes that could be affected directly or indirectly by oxidation. In addition, we studied the effect of pressure on other components such as glucosinolates, purines and pyrimidines, which may be relevant to the wholesomeness and sensory quality of food. For this purpose, seven stages of research were considered and developed. The first stage developed an analytical method that allows quantifying the content of purines and pyrimidines in meat samples. In the second stage an analytical method for determining the content of cholesterol oxides in these samples was optimized. Once validated these analytical methods, the process of pressurization of food was initiated. In the third and fourth stages the pressurization of vacuum packaged dry-cured ham at 400, 600 and 900 MPa was carried out, and its effect on the oxidative stability during 50 days of refrigerated storage in the presence or absence of light was evaluated. In these stages, antioxidant enzymes activity (catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase), TBARS levels (thiobarbituric acid reactive substances), vitamin E content, physicochemical parameters, instrumental color, microbial counts and sensory attributes were determined. In the study at 600 MPa fatty acids fractions corresponding to total fatty acids, free and phospholipids were also quantified. In the fifth stage, the method developed for the analysis of purines and pyrimidines was employed for dry-cured ham pressurized at 600 and 900 MPa. In the sixth stage, the effect of applying high pressure, 600 and 900 MPa, on the cholesterol oxide content was evaluated in dry-cured ham. Finally, in the seventh stage, the effect of different combinations of pressure and temperature, 200, 400 and 600

MPa, 20 and 40 ° C, on the content of compounds with antioxidant activity was evaluated in turnip. This study also evaluated other parameters such as glucosinolate content and instrumental color and texture, which are relevant to the sensory quality of turnip.

The main results obtained in this study were: First, a new fast and reliable method for the determination of purines inosine, adenosine, guanosine, hypoxanthine, xanthine and uric acid, and the pyrimidine uridine, in meat samples by high resolution liquid chromatography with detection by mass spectrometry. Second, the optimization of a method for the analysis of cholesterol oxides allowed determining for the first time simultaneously in dry-cured shoulder 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol,  $\beta$ -epoxycholesterol,  $\alpha$ -epoxycholesterol, 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol, cholestanetriol, 25-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol. Third, the pressurization at 600 MPa of vacuum packaged sliced dry-cured ham did not produce change in the oxidative stability, as no differences were observed after 50 days of refrigerated storage on the fatty acid content of the different fractions studied, neither in the TBARS level, nor in antioxidant enzymes activity. However, this pressure level produced the whitening of dry-cured ham and an increase in both the hardness and the saltiness perception. Fourth, the hardness and saltiness perception after 50 days of storage were modified to a lesser extent by pressurization at 400 MPa, although the loss in color intensity was similar to that found pressurizing at 600 MPa. Treatment at 400 MPa produced a slight decrease in the oxidative stability measured as an increase in superoxide dismutase activity. Pressurization of dry-cured ham at 900 MPa produced a decrease in superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, while increased vitamin E content, all this was potentially associated with both membranes rupture and the partial deactivation of enzymes. Fifth, the

combination of pressure and temperature that preserved texture, color and antioxidant compounds content of turnip to higher extension was 600 MPa at 20 °C.





---

El tratamiento mediante altas presiones es una tecnología que permite una reducción del consumo de energía, un aumento de la vida útil de los alimentos y puede evitar los efectos negativos del tratamiento térmico. La aplicación de altas presiones para la conservación de los alimentos es reciente, pero se dispone de una extensa información sobre su efecto en la viabilidad de los microorganismos, la resistencia de éstos a la presión elevada, así como la eficacia de la aplicación de las altas presiones para ampliar la vida media de un alimento o mejorar su seguridad microbiológica. La presión produce alteraciones muy importantes en biomoléculas como proteínas, polisacáridos y lípidos. Las proteínas modifican su estructura tridimensional, lo cual tiene efectos importantes en su funcionalidad. Los enzimas pueden perder su actividad o aumentarla según el efecto sobre el centro activo o la parte alostérica. Esto es importante para mejorar la calidad sensorial si los enzimas, que se desactivan o activan, producen o favorecen la aparición de defectos: exceso de proteólisis, mayor oxidación y alteraciones de la textura y el color. En otros casos puede no interesar mantener la funcionalidad de un enzima, y debemos encontrar las condiciones de presión y temperatura en las que se desactiva este enzima (Homma, Ikeuchi y Suzuki, 1994; Kurth, 1986; Northrop, 2002; Smeller, 2002).

El aumento de la temperatura favorece la formación de radicales, si en el medio de reacción existen catalizadores que puedan favorecer este tipo de reacciones. En el caso de la carne, que contiene metales como Fe, Cu, Zn o Mn en diferentes estados de oxidación ligados a proteínas, la presurización puede producir una mayor o menor liberación de los mismos pudiendo facilitar el inicio de reacciones de oxidación. Por otra parte, si bien la estructura de los lípidos de depósito no se ve muy afectada por la presión, ocurre lo contrario con los lípidos y proteínas de membrana, debido a que la membrana puede sufrir procesos de rotura o cambios espaciales o estructurales que modifican de modo considerable la exposición de los componentes lipídicos a la oxidación. Además, debido a la reducción de volumen inducido por la presurización, y quizás también a cambios osmóticos y de solvatación, puede producirse el efecto contrario, que las proteínas de membrana ejerzan algún efecto protector. Por otra parte, la alteración de la membrana puede producir una liberación de enzimas presentes en diferentes orgánulos de la célula, los cuales pueden mostrar una mayor o menor actividad según las condiciones de solvatación, pH, fuerza iónica y desnaturalización por la presión y la temperatura.

La oxidación inducida por la presurización puede provocar cambios en varias biomoléculas: oxidación del colesterol, cambios en el contenido de ácidos grasos de las diferentes fracciones y en otros compuestos con actividad antioxidante. Todo esto se ha estudiado escasamente en productos cárnicos y más ampliamente en vegetales (Oey, Van der Plancken, Van Loey y Hendrickx, 2008a; Severini, Baiano, Rovere, Dall'Aglio y Massini, 2002). Además, estos procesos pueden dar lugar a modificaciones en micronutrientes, alteraciones en el contenido de vitaminas y de otros compuestos como los glucosinolatos, las xantinas y alterar la biodisponibilidad de metales (Cheah y Ledward, 1997; Oey *y col.*, 2008a).

El efecto de la presión en los procesos oxidativos ha sido estudiado en menor grado que la desactivación microbiana, que es lo determina en primer lugar la seguridad y vida útil del producto (Arroyo, Sanz y Préstamo, 1997; Barbosa-Cánovas, Pothakamury, Palou y Swanson, 1998; Garriga, Grèbol, Aymerich, Monfort y Hugas, 2004). Una vez obtenido el objetivo de la seguridad microbiológica, la posibilidad de un aumento o reducción de la oxidación o de los compuestos antioxidantes es importante dado que también afecta a la vida útil del producto, a su seguridad abiótica y a su calidad sensorial (Orlien, Hansen y Skibsted, 2000; Tuboly, Lebovics, Gaál, Mészáros y Farkas, 2003). Por ello, obtener datos sobre el efecto de la presión en estos compuestos y procesos puede permitir definir condiciones de presión, temperatura y tiempo de tratamiento óptimas para reducir los posibles efectos negativos o, de modo alternativo, buscar estrategias para reducir estos efectos.

Se sabe que el efecto de la alta presión en la actividad enzimática depende de muchos factores como la presión aplicada, temperatura y tiempo de tratamiento, concentración de enzimas, alimento de estudio o pH entre otros (Eisenmenger y Reyes-De-Corcuera, 2009; Hendrickx, Ludikhuyze, Van den Broeck y Weemaes, 1998; Homma *y col.*, 1994). En los enzimas que catalizan las reacciones de degradación de los compuestos purínicos, los cuales pueden tener relevancia tanto en el sabor de los alimentos (Cambero, Pereira-Lima, Ordoñez y de Fernando, 2000), como en su salubridad, ya que pueden aumentar el poder uricogénico de los alimentos (Clifford, Riumallo, Young y Scrimshaw, 1976), el efecto de la presión ha sido poco estudiado (Martin, Lorenzen y Schrader, 2008; Mori *y col.*, 2007). El efecto de la presión en el enzima mirosinasa, que cataliza la conversión de glucosinolatos a compuestos que pueden ser beneficiosos o alterar las propiedades organolépticas de los vegetales, se ha estudiado en brócoli (Van Eylen *y col.*, 2009), resultando en un aumento en la hidrólisis de los

glucosinolatos. El estudio de los enzimas antioxidantes es importante, sobre todo si se produce una activación en determinadas condiciones. La activación o no de un enzima con la alta presión, como ya se ha comentado, está influenciada por muchos factores. Ello hace necesario que se estudie su comportamiento en las condiciones específicas de producción y composición de un alimento, ya que es difícil trasladar los resultados efectuados en modelos o en otros alimentos.

Durante los últimos años ha aumentado la demanda por parte de los consumidores de alimentos minimamente procesados, con mayor similitud a los “frescos” y sin presencia de aditivos. A la vez, y debido a los nuevos hábitos de consumo, existe un aumento en la demanda de productos listos para tomar. La presurización es una alternativa viable a los tratamientos térmicos convencionales, capaz de ofrecer una solución para esta creciente demanda. Su aplicación en vegetales puede ofrecer productos preparados listos para tomar saludables, como ensaladas frescas que de otro modo tendrían una vida útil muy corta. En anteriores trabajos se ha descrito que la presurización retiene un alto porcentaje de compuestos con actividad antioxidante (Patras, Brunton, Da Pieve y Butler, 2009a; Quaglia, Gravina, Paperi y Paoletti, 1996). Sin embargo, cabe destacar que la textura y color original puede alterarse en ocasiones por la presencia de enzimas (Oey, Lille, Van Loey y Hendrickx, 2008b). El nabo es un vegetal que puede consumirse tanto en forma cocida como cruda, y se ha estudiado previamente como ingrediente en ensaladas envasadas listas para consumir. En la industria, el escaldado es una técnica ampliamente empleada para la desactivación de enzimas en vegetales, aunque puede producir pérdidas en compuestos con propiedades antioxidantes. La presurización puede considerarse una técnica de conservación alternativa al escaldado, ofreciendo una mayor o similar retención de compuestos antioxidantes que la obtenida mediante el tratamiento térmico (Oey *y col.*, 2008a). Sin embargo, la posibilidad de activar

o desactivar enzimas mediante la presión puede provocar cambios en el color y textura que reducirían la aceptación por parte de los consumidores (Oey *y col.*, 2008b). El nabo contiene un porcentaje elevado de agua y una gran cantidad de compuestos beneficiosos para la salud, como compuestos fenólicos, glucosinolatos o vitamina C. El efecto de la presión en este vegetal, a parte de presentar interés por su posible aplicación en la conservación de alimentos listos para consumir, podría contribuir en cierta manera a aumentar el conocimiento sobre el efecto de la presurización en los vegetales.

Otro tipo de producto listo para tomar de creciente demanda es el jamón curado loncheado. En el proceso de deshuesado, loncheado y envasado se puede producir contaminación microbiológica. Esto hace necesario el estudio de técnicas de conservación que permitan el aumento de su vida útil. La aplicación de altas presiones es una alternativa viable para aquellos productos, que como las carnes curadas, no pueden ser sometidos a tratamientos térmicos. Varios trabajos han mostrado la mejora de la seguridad microbiológica del jamón curado presurizado (Garriga *y col.*, 2004; Minerich y Krug, 2003; Morales, Calzada y Nuñez, 2006), así como su bioequivalencia con el producto no presurizado (García-Regueiro, Sárraga, Hortós, Díaz, Valero y Rius, 2002). La oxidación puede dar lugar a la formación de compuestos que posean propiedades negativas para la salud humana: posibilidad de aumentar la formación de radicales (aldehídos, oxidación lipídica), o incidencia en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (óxidos de colesterol). También puede afectar a la calidad tecnológica y sensorial: cambios en el color, desarrollo de olores desagradables y reducción de la vida útil. La información bibliográfica sobre el efecto de la presurización en la oxidación es escasa. Su estudio en productos curados puede ser de interés para un mayor conocimiento sobre el efecto de la presión en este

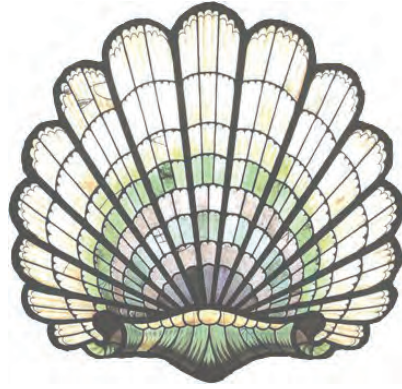
tipo de productos y buscar posibles modificaciones al tratamiento para reducir su incidencia.

El estudio de dos alimentos tan diferentes como el nabo y el jamón curado puede ofrecernos además una visión global del efecto de la presurización en función de la composición de los alimentos.









## 1. Conservación mediante la aplicación de altas presiones hidrostáticas

Una de las técnicas más empleadas para la conservación de alimentos ha sido el procesado por calor. El tratamiento térmico permite un aumento de la vida útil de los alimentos procesados, aunque puede modificar en gran medida las propiedades nutricionales y los atributos sensoriales del producto. Estas limitaciones se han intentado superar con aditivos químicos y con el procesado higiénico en la preparación y acabado de los productos alimentarios. El procesado ideal sería aquel que inactivara los microorganismos, ralentizando el deterioro causado por los enzimas, sin alterar de manera negativa los atributos de calidad de los alimentos.

El desarrollo tecnológico, junto a la creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos más seguros y mínimamente procesados, ha

estimulado el interés por la utilización de métodos no térmicos, o combinados con tratamientos post-térmicos para la conservación de alimentos.

En el último siglo se desarrollaron diversas alternativas o tecnologías complementarias para el tratamiento térmico. Muchas de estas nuevas tecnologías de conservación, en apariencia menos agresivas con los alimentos, tienen también como objetivo el ahorro de energía y el respeto por el medio ambiente, aunque a nivel experimental o de desarrollo no se estén produciendo significativas mejoras en estos puntos. Entre ellas podemos destacar las radiaciones ionizantes, que son efectivas para la descontaminación de alimentos, aunque gozan de poca aceptabilidad por parte de los consumidores. También se encuentran la descompresión instantánea, los campos magnéticos oscilantes (calentamiento óhmico, calentamiento dieléctrico, microondas), pulsos lumínicos de alta intensidad, haces de electrones y alta presión hidrostática. Todas estas nuevas tecnologías de conservación se consideran poco agresivas con los alimentos, pero aun se encuentran en estudio sus efectos en los distintos microorganismos y en la calidad sensorial. Su uso garantiza la apariencia natural de los alimentos, pero no así una seguridad microbiológica total (Hugas, Garriga y Monfort, 2002).

La aplicación de altas presiones hidrostáticas (AAPH) para la conservación de alimentos se conoce desde principios del siglo XX. Hite *y col.* (1899) fueron los primeros investigadores que estudiaron el efecto de la AAPH presurizando leche a 650 MPa y obteniendo una reducción en el número de microorganismos viables. Pero por problemas tecnológicos, no se pudo seguir desarrollando esta nueva tecnología (Yaldagard, Mortazavi y Tabatabaie, 2008). El desarrollo producido en el campo de la ciencia de los materiales (producción de cerámicas, aleaciones metálicas, creación de materiales sintéticos, etc.), donde se combinan presiones de más de 100 MPa con temperaturas de aproximadamente 1000 °C,

permitió superar los impedimentos tecnológicos para la AAPH en el procesado de alimentos (Hoover, Metrick, Papineau, Farkas y Knorr, 1989).

Durante la década de los ochenta se reemprendió la investigación sobre el uso de la AAPH en la conservación de alimentos. Por un lado, en EEUU se comenzó a estudiar su efecto en matrices alimentarias (Hoover *y col.*, 1989). Por otro lado, Japón fue pionera en la producción y comercialización de alimentos presurizados. Los primeros alimentos tratados con altas presiones fueron zumos y mermeladas (Téllez-Luis, Ramírez, Pérez-Lamela, Vázquez y Simal-Gándara, 2001). En la actualidad en Japón se comercializan preparados de frutas, zumos, pasteles de arroz y calamar crudo presurizados; en Francia y Portugal la AAPH se emplea mayoritariamente en zumos, especialmente el de manzana. En EEUU esta tecnología se utiliza para conservar guacamole y ostras. En España empresas como Esteban España (Olot, Girona) y Campofrio (Burgos) comercializan jamón cocido y curado loncheado tratado con altas presiones (Hugas *y col.*, 2002).

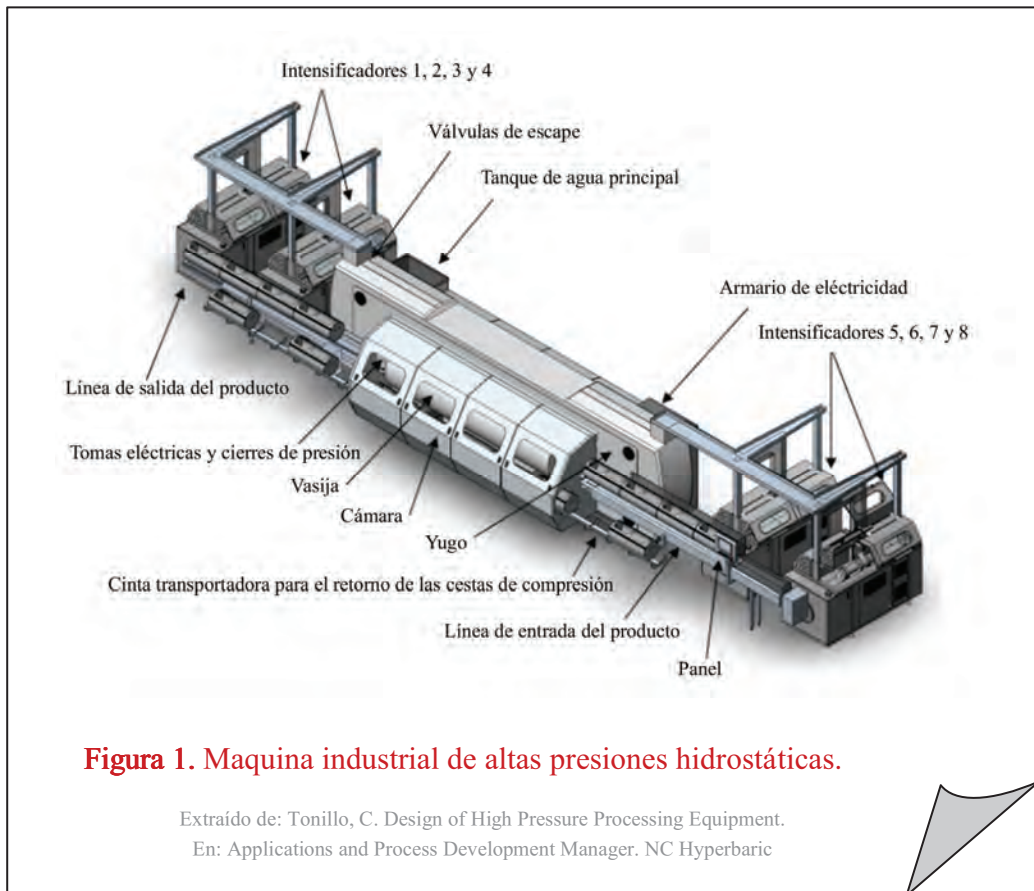
A diferencia de otras técnicas de conservación estudiadas como la modificación genética o la irradiación, la AAPH puede generar una percepción positiva por parte del consumidor (Cardello, Schutz y Leshner, 2007). Esta percepción positiva de la AAPH se debe a que el empleo de presión para la conservación de alimentos no es una tecnología del todo desconocida para los consumidores (Cardello *y col.*, 2007). Mientras que la modificación genética, por el desconocimiento que se tiene de esta tecnología, se considera poco natural e insana (Cardello *y col.*, 2007).

Se entiende por altas presiones aquellas comprendidas entre 100 y 1.000 MPa, siendo una presión de 1.000 MPa igual a la presión creada por 10.000 kg en 1 cm<sup>2</sup>. En la industria alimentaria actualmente se emplean tratamientos de 400–600 MPa a 5–90 °C durante 10–30 min (Garriga, Aymerich y Hugas, 2002).

Las posibilidades que ofrece la AAPH no sólo se circunscriben al aumento de la vida útil de los alimentos, sino que pueden generar nuevas texturas (Yaldagard y *col.*, 2008) o mejorar la tenderización de la carne por diferentes mecanismos a como se produce durante la maduración (Ichinoseki, Nishiumi y Suzuki, 2006). Todo ello ha generado un interés creciente en la investigación de sus efectos sobre la estructura de los alimentos, la calidad sensorial y nutricional.

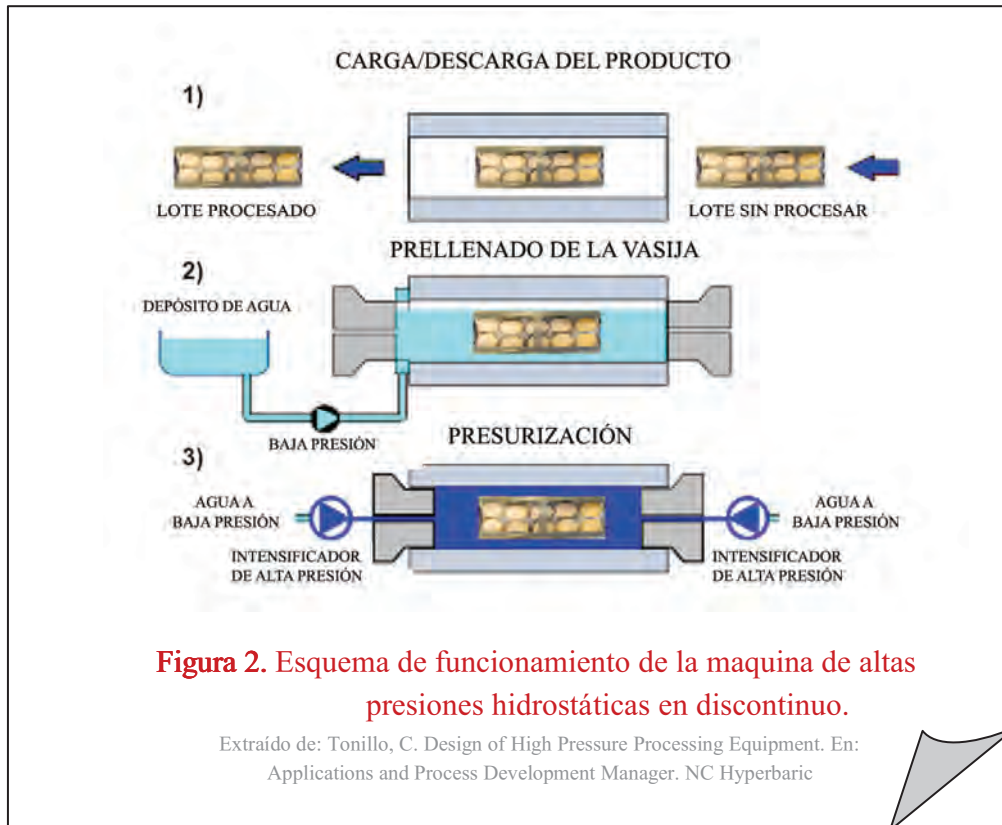
### 1.1. Requerimientos técnicos

Los componentes principales de un sistema de presurización son: un recipiente para presurizar de diseño cilíndrico con un sistema de cierre capaz de soportar la presión, un fluido para transmitir la presión, un sistema generador de presión que normalmente incluye una o más bombas, un dispositivo de control de la temperatura y un sistema de entrada de productos (Mertens, 1995).



La alta presión se puede producir por distintos métodos, la compresión directa y la compresión indirecta. En la compresión directa la alta presión es generada por la presurización del medio a través del extremo del pistón de diámetro pequeño. Este método permite compresiones muy rápidas, aunque su uso normalmente se limita a plantas piloto por la dificultad del sellado entre el pistón y la vasija. En la compresión indirecta se usa un intensificador de alta presión para bombear el

fluido presurizante desde un depósito hacia el recipiente de presurización que debe estar exento de aire. Este es el método más empleado en la industria.



Existen dos modelos para el procesamiento de los alimentos con altas presiones. El modelo semicontinuo y el discontinuo. El modelo semicontinuo se emplea con alimentos que sean bombeables, es decir líquidos sin empaquetar. El recipiente se llena del líquido a presurizar y él mismo es el transmisor de la presión. Tras la presurización el alimento puede ser bombeado a una línea de llenado aséptica como la que se usa en el proceso de ultra calentamiento de la leche (UHT) (Téllez-Luis *y col.*, 2001). Los alimentos sólidos se tratan en modelo discontinuo o de cargas (Fig. 1 y 2). En este modelo los alimentos empaquetados se cargan en el recipiente de presurización, se cierra el recipiente y el fluido transmisor de la presión se bombea hacia el recipiente donde están contenidos los alimentos. Tras la presurización los alimentos se descargan del recipiente de

presurización y el sistema vuelve a cargarse para empezar otro ciclo (Indrawati, Van Loey, Smout y Hendrickx, 2003).

Durante la presurización se produce una disminución del volumen de los envases que se traduce en una compresión de los envases. Al despresurizar los envases vuelven al volumen inicial. Esto puede dar lugar a la deformación de los envases, por ello se deben emplear envases flexibles y resistentes. Además, la presión también puede provocar transferencias del envase al alimento, alterando el sabor y el olor del alimento empaquetado (Hugas *y col.*, 2002).

Uno de los aspectos negativos del uso de la AAPH es el elevado coste que supone, 0,1 €/L de producto tratado; muy por encima del tratamiento térmico, a partir de 0,02 €/L de producto procesado (Yaldagard *y col.*, 2008). Sin embargo debe tenerse en cuenta que es una tecnología relativamente reciente y seguramente su coste se reduciría al extenderse su aplicación.

## *1.2. Efecto de la presurización en los diferentes componentes de los alimentos*

El efecto de la AAPH en los alimentos se basa en los principios de Le Chatelier y de la isostaticidad. El principio de Le Chatelier expone que cualquier fenómeno en el que se dé una disminución del volumen de un gas, se ve incrementado por un aumento de la presión y viceversa. El principio de isostaticidad hace referencia a que la presión se transmite de manera uniforme e instantánea a través de todo el sistema físico tratado, independientemente del tamaño y la geometría del sistema.

### **1.2.1. Agua**

\*



El agua es el componente mayoritario en muchos alimentos, así, una modificación de sus propiedades fisicoquímicas tendrá repercusión en la calidad de los alimentos. Un aumento de presión siempre va acompañado de una disminución de volumen, que es alrededor del 4% a 100 MPa y llega al 15 % a 600 MPa (22 °C). Así, los alimentos que presentan un gran contenido en agua y poco gas tienen una compresibilidad similar a la del agua. La disminución del volumen también implica un aumento en la densidad, como consecuencia, los coeficientes de difusión de los solutos disminuyen. Además, la compresión producida por la presurización en un medio adiabático produce un aumento de la temperatura. La compresión adiabática del agua causa un aumento de temperatura de 2–3 °C por cada 100 MPa, aunque durante la descompresión la temperatura se reduce (Cheftel y Culioli, 1997).

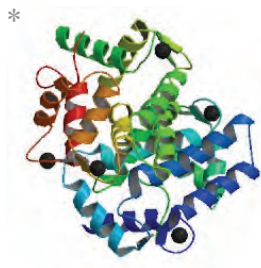
\* Extraído de: <http://www.astrociencia.com/2008/05/28/la-naturaleza-del-agua/>



Otro de los fenómenos favorecidos con la presión es la disociación iónica del agua, que se conoce como el fenómeno de ‘electrostriction’ del agua. La presión hace que las moléculas de agua se reagrupen de una manera más compacta alrededor de las cargas eléctricas, dando lugar a la separación de las cargas que favorece las interacciones dipolo–dipolo y los puentes de hidrógeno. Por tanto, la presión aumenta los productos iónicos  $H^+$  y  $OH^-$  del agua, entre 10–100 veces a 100 MPa (dependiendo de la temperatura). Esta separación de cargas se traduce en una disminución del pH del agua, que es de 0,2–0,5 unidades por cada 100 MPa (en el agua). Algunos de los cambios de pH son reversibles, pero pueden contribuir a los cambios observados en las proteínas con la presurización (Cheftel y Culioli, 1997).

La presión también tiene un efecto importante sobre las fases de transición del agua, disminuyendo tanto su punto de fusión como su punto de congelación. Esto se debe a que el aumento de presión se opone al aumento de volumen, y tanto el paso de fase líquida a fase gas o a fase sólida suponen un incremento de volumen. Esto tiene diversas aplicaciones en los alimentos congelados y en la descongelación de muestras biológicas (Cheftel y Culioli, 1997).

### 1.2.2. Proteínas



\* La estructura nativa de las proteínas, la conformación que tiene actividad biológica, es el resultado de un “delicado” balance entre las interacciones estabilizadoras y las inestabilizadoras, entre las cadenas polipeptídicas y el solvente que las envuelve, que suele ser agua. Las proteínas “nativas” son estables en un estrecho margen dependiendo de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica...). La presión actúa como un

\* Extraído de: [http://chsfpc5.chem.ncsu.edu/~franzen/Poland/Poznan05/lec2\\_files/frame.htm#slide0150.htm](http://chsfpc5.chem.ncsu.edu/~franzen/Poland/Poznan05/lec2_files/frame.htm#slide0150.htm)

parámetro fisicoquímico que desequilibra el balance de las interacciones intramoleculares y las interacciones entre solvente y proteína (Heremans, 2002). Así, la AAPH puede provocar el desdoblamiento o desnaturalización de la cadena polipeptídica.

La disminución del volumen que causa la AAPH afecta a las distancias de las interacciones intra e intermoleculares débiles, incluidas las interacciones proteína-agua. Además, la separación de cargas inducida por la presurización puede afectar a los puentes salinos y a las interacciones hidrofóbicas. Todo esto puede dar lugar a cambios conformacionales y estructurales (Cheftel y Culioli, 1997). Las transiciones estructurales suelen ir acompañadas de grandes cambios de hidratación. Así, al desdoblarse o disociarse la proteína se produce una disminución de volumen. La nueva estructura formada se encontrará estabilizada por puentes de hidrógeno, uniones favorecidas con la AAPH, que pueden suponer una disminución en el volumen de las moléculas (Barbosa-Cánovas *y col.*, 1998).

El efecto de la AAPH se centra sobre todo en las estructuras cuaternaria y terciaria de las proteínas, que están estabilizadas por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. La estructura secundaria está poco afectada por la presión, aunque la desestabilización de las anteriores estructuras puede dar lugar a un pequeño desplegamiento, exponiendo las regiones hidrofóbicas de la proteína al solvente que la envuelve. La estructura primaria, estabilizada mayoritariamente por enlaces covalentes, poco sensibles a la presión, permanece inalterada durante la presurización (Hendrickx *y col.*, 1998).

La desnaturalización de la proteína es un proceso complejo que comprende diversos estadios. El empleo de presiones moderadas, menores de 150 MPa, favorecen la disociación de las proteínas oligoméricas, fenómeno favorecido por la reducción de volumen que supone. La disociación puede ir seguida de la

agregación de las subunidades o de la precipitación, esto normalmente ocurre a presiones entre 150–200 MPa. En este intervalo de presiones la proteína se despliega y las subunidades de la proteína oligomérica disociada se reasocian. Entre 400 y 800 MPa puede darse tanto un desplegamiento reversible como uno irreversible de la proteína, dependiendo del grado de compresión y de la afectación de la estructura secundaria (Lullien–Pellerin y Balny, 2002).

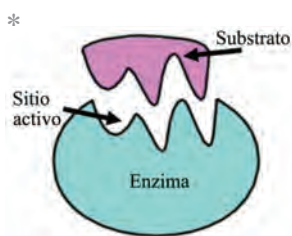
El efecto de la AAPH sobre una solución de proteínas depende de la concentración de proteína, el pH, la fuerza iónica, la presión, la temperatura aplicada y la duración del tratamiento; dando lugar a diferentes estados de agregación, gelificación o precipitación (Galazka, Dickinson y Ledward, 2000). Además, este efecto también depende de la configuración estructural de la proteína. Las proteínas del tejido conectivo, como el colágeno, son poco sensibles a la presión (Ma y Ledward, 2004). Sin embargo, las proteínas estructurales del músculo, actina y miosina, pueden despolimerizarse y solubilizarse con la presión (Cheftel y Culioli, 1997). En las proteínas miofibrilares se ha visto que la AAPH producía una disminución de su solubilidad en soluciones salinas (Souza *y col.*, 2011).

El aumento de la hidrofobicidad superficial con la AAPH se ha descrito para varias proteínas (Zhang, Li, Tatsumi y Isobe, 2005). Este aumento puede originar la agregación de proteínas cuando se encuentren cerca del punto isoeléctrico y no existan repulsiones electrostáticas. Sin embargo, al alejarse del punto isoeléctrico, el aumento de la hidrofobicidad puede dar lugar a una mayor repulsión, reduciendo la solubilidad de la proteína (Toldrà *y col.*, 2008). Los puentes bisulfuro juegan un papel importante en la agregación inducida por la presión. En proteína de huevo se ha observado que a partir de 500 MPa se produce un aumento de la exposición de los grupos sulfhidrilo, resultando más disponibles para la creación de puentes bisulfuro entre diferentes proteínas (Der

Plancken, Van Loey y Hendrickx, 2005). Los puentes de hidrógeno también tienen un papel estabilizador en las agregaciones promovidas con la presurización (Cheftel, 1995).

La AAPH, como el tratamiento térmico, puede inducir a la desnaturalización de las proteínas, aunque su efecto es menos agresivo (Duranton, Marée, Simonin, Chéret y de Lamballerie, 2010). En proteína gelificada por la presión se observó que su espectro de infrarrojo presentaba un mayor parecido con el espectro infrarrojo de la proteína nativa que con la desnaturalizada por tratamiento térmico. Así, el desplegamiento inducido en la proteína con la presión transcurriría de manera diferente al que se obtiene mediante calor (Heremans, 2002).

### 1.2.3. Enzimas



Las altas presiones modifican la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, pudiendo alterar así la actividad enzimática. Este efecto se debe a la modificación de las estructuras intermoleculares y a

cambios de conformación en el sitio activo del enzima. Los cambios catalíticos en el enzima se traducen en cambios en la interacción enzima–sustrato, en el mecanismo de reacción o en una etapa limitante de la reacción (Cheftel, 1992). Se han observado diferentes sensibilidades de los enzimas a la AAPH, pudiendo algunos activarse mientras otros se desactivan (Téllez–Luis *y col.*, 2001). La sensibilidad es dependiente del cambio de volumen asociado a la reacción enzimática. Otros factores que afectan a la actividad del enzima y que pueden variar con la presión son el pH, la concentración del sustrato, la estructura de la subunidad del enzima o la temperatura.

\* Extraído de: <http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/HIV/DrugStrategies.html>

De acuerdo con Hendrickx *y col.* (1998), los efectos de la AAPH sobre los enzimas pueden agruparse en dos. Presiones relativamente bajas, del orden de 100 MPa, pueden activar algunos enzimas, fundamentalmente de tipo monomérico, que son más resistentes a la presión (Masson, 1992). Presiones superiores provocan la inactivación enzimática.

**Tabla 1.** Efecto de la presurización en diferentes enzimas.

	Efecto de la presurización	Medio	Fuente
Lipasa	Puede comenzar su inactivación a 600 MPa	Buffer	(Seyderhelm, Boguslawski, Michaelis, y Knorr, 1996)
Catepsinas B, D y L	Aumentan su actividad hasta 400 MPa por la liberación de enzimas de los lisosomas, a 500 MPa empiezan a inactivarse	Extracto de carne	(Homma <i>y col.</i> , 1994)
Pepsina	Incrementan su actividad a 300 MPa, siendo la presión optima a 200 MPa	Buffer	(Dufour, Hervé, y Haertle, 1995)
Peroxidasa	Estable entre 400-600 MPa durante 15 min	Frambuesa	(Garcia-Palazon <i>y col.</i> , 2004)
	Se inactiva en un 50% a 400 MPa durante 15 min	Puré de fresas	(Cano <i>y col.</i> , 1997)
Mirosinasa	Estable entre 100-400 MPa	Brócoli	(Van Eylen, Oey, Hendrickx, y Van Loey, 2008)
Pectina	Entre 200-400 MPa aumenta su actividad	Zumo de naranja fresco	(Cano <i>y col.</i> , 1997)
metilesterasa	Estable hasta 600 MPa a 20°C, mostrando un efecto antagonista con el incremento de temperatura	Zanahoria	(Sila, Smout, Satara, Truong, Van Loey, y Hendrickx, 2007)

Como ejemplo de la diferente sensibilidad de los enzimas a la presión en función del alimento en el que se encuentren están los enzimas peroxidasas. Las peroxidasas constituyen un grupo de proteínas termoestables que oxidan substratos, entre ellos monofenólicos o difenólicos, utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Eisenmenger y Reyes-De-Corcuera, 2009). En frambuesa se encontró que presurizando entre 400 y 600 MPa durante 15 min no se producía la inactivación del enzima(Garcia-Palazon, Suthanthangjai, Kajda y Zabetakis, 2004). Además,

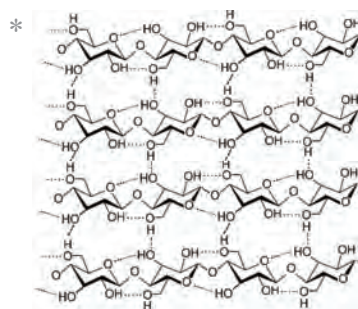
en zanahoria y manzana las peroxidases mostraron resistencia a presiones inferiores a 900 MPa durante 1 min (Eisenmenger y Reyes–De–Corcuera, 2009). Sin embargo, en puré de fresa tratado a 400 MPa a 32 °C durante 15 min, este enzima perdió el 50 % de su actividad (Cano, Hernandez y Ancos, 1997).

La presurización también puede producir variaciones en la concentración del sustrato en los alimentos. El enzima mirosinasa, que cataliza la conversión de los glucosinolatos a compuestos bioactivos que pueden ser beneficiosos para la salud, presenta una cierta resistencia a la presión (100–400 MPa). Al aumentar la presión, se ha sugerido que se produce un aumento en la permeabilización de las células, permitiendo el contacto entre glucosinolatos y enzima (Van Eylen *y col.*, 2009). De acuerdo con esto, en un estudio previo se ha observado un incremento en la hidrólisis de los glucosinolatos con la presión (Van Eylen *y col.*, 2009).

En enzimas de una misma familia, como es el caso de las nucleotidasas, la sensibilidad del enzima a la presión puede variar entre ellas. Así, el enzima adenosina monofosfato nucleotidasa, que cataliza la conversión de adenosina monofosfato a adenosina, disminuyó su actividad a partir de 200 MPa. Sin embargo, el enzima inosina monofosfato nucleotidasa, que cataliza la conversión de inosina monofosfato a inosina, mantuvo su actividad a esta presión (Mori, Yokoyama *y col.*, 2007).

#### 1.2.4. Hidratos de carbono

Existen pocos trabajos acerca del efecto de la AAPH sobre los hidratos de carbono, aunque se afirma que los azúcares simples no resultan afectados por el tratamiento (Cheftel, 1992). Sin

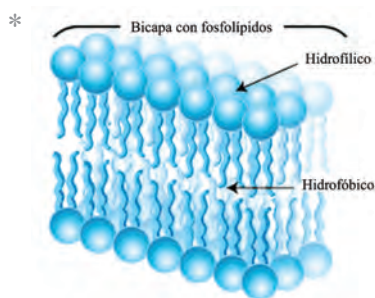


\* Extraído de: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c3/Cellulose\\_strand.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c3/Cellulose_strand.jpg)

embargo, las reacciones de condensación de Maillard son inhibidas con presiones entre 50 y 200 MPa, inhibiendo así el desarrollo del sabor y color que producen (Sangronis, Pothakamury, Ramos, Ibarz, Barbosa-Cánovas y Swanson, 1997).

El efecto de la presión se ha estudiado en la transición sol-gel de los polisacáridos. Del mismo modo que la presión forma agregados de proteínas diferentes a los producidos por el tratamiento térmico, los geles formados por los polisacáridos con la presión también son diferentes. La gelatinización por presión del almidón requiere temperaturas inferiores a las empleadas normalmente. Para el almidón proveniente del arroz se requiere una temperatura de gelatinización de 60 °, mientras que con el empleo de AAPH a 500 MPa la gelatinización se da a 10 ° (Oh, Hemar, Anema, Wong y Pinder, 2008); además, la presurización hace que los granos de almidón se hinchen modificando su estructura en menor grado que con el empleo de temperatura (Rubens, Snauwaert, Heremans y Stute, 1999).

### 1.2.5. Lípidos



La temperatura de fusión de los lípidos aumenta de manera reversible, más de 10 °C cada 100 MPa (Cheftel, 1995). El aumento de la temperatura de fusión de los lípidos produce un mayor ordenamiento de la bicapa lipídica, esto

se traduce en una disminución de la fluidez de la biomembrana, induciendo a la rotura de la membrana y a la destrucción de la bicapa (Kato y Hayashi, 1999). Además, el componente lipídico principal de las membranas son los fosfolípidos, que contienen un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados. De acuerdo con la mayor oxidación encontrada en el ácido linoleico que en el oleico

\* Extraído de: <http://www.bioteach.ubc.ca/Bio-industry/Inex/>

presurizando a 600 MPa a 4 °C (Ludwig y Macdonald, 2005), los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles a la oxidación con la AAPH. La ruptura de la membrana también puede contribuir a esta mayor susceptibilidad, ya que puede dejar a los ácidos grasos poliinsaturados expuestos a los catalizadores endógenos y al oxígeno activado, incrementando su oxidación (Beltran, Pla, Yuste y Mor–Mur, 2003; Orlie y *col.*, 2000).

Estudios en carne de pavo o de cerdo picada han demostrado que la presurización puede disminuir la estabilidad oxidativa (Cheah y Ledward, 1996; Dissing, Bruun–Jensen y Skibsted, 1997; Orlie y *col.*, 2000). La iniciación de la oxidación lipídica inducida por la presión en carnes se ha relacionado con diversos factores como la liberación de hierro de las hemoproteínas o el daño en la membrana celular (Cheah y Ledward, 1996). Sin embargo Orlie y *col.* (2000) no detectaron un aumento en la liberación de iones de hierro tras presurizar pechuga de pollo entre 500 y 800 MPa, indicando que la liberación de hierro no era responsable de la oxidación lipídica inducida por la presión. Así, la oxidación lipídica podría estar causada por la destrucción de la membrana. El mecanismo de acción se cree que transcurre vía formación de radicales libres, a raíz de la destrucción de la membrana. Esta rotura facilita el contacto tanto de los enzimas responsables de la oxidación de los ácidos grasos como de otras especies oxidantes con su substrato (Mariutti, Orlie, Bragagnolo y Skibsted, 2008). Bragagnolo y *col.* (2006) presurizaron pechuga de pollo entre 200 y 1000 MPa, y midieron los radicales libres mediante la espectroscopía de resonancia del spin electrónico (ESR). Estos autores observaron que la señal correspondiente a la formación de radicales aumentaba tanto con la presión como con el tiempo de tratamiento. Igualmente, Andrés y *col.* (2004a) midieron la formación de radicales libres tras presurizar jamón curado entre 200 y 800 MPa, encontrando que el tratamiento a 200 MPa aumentaba la formación de radicales, pero



presiones entre 400 y 600 MPa no los incrementaron. Andrés *y col.* (2004a) sugirieron que esta pérdida de radicales libres era debida a la destrucción de los componentes primarios de la oxidación por su intervención en otras reacciones.

La oxidación lipídica promovida por la presurización también se ha relacionado con el oxígeno disuelto y con la desnaturalización de las proteínas (Cheah y Ledward, 1996), aunque los resultados hasta ahora no han sido concluyentes.

### 1.2.6. Vitaminas



La alta presión afecta a enlaces no covalentes, siendo algunos muy sensibles. Esto sugiere que componentes con un bajo peso molecular, como las vitaminas, no están muy afectados por la AAPH (Tewari, Jayas y Holley, 1999).

En un estudio sobre la bioequivalencia entre productos cárnicos tratados o no tratados con altas presiones (600 MPa), se observó que la presurización no causaba diferencias en los contenidos de vitaminas del grupo B (Hugas *y col.*, 2002). De manera similar, en frutas y vegetales se ha observado que la AAPH no afecta a las vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> ni a la niacina (Oey *y col.*, 2008a). Sin embargo los folatos (vitamina B<sub>9</sub>) pueden oxidarse o verse transformados por la AAPH, sufriendo conversiones hacia estructuras que tengan un menor volumen molar y sean más estables a la presión (Oey *y col.*, 2008a).

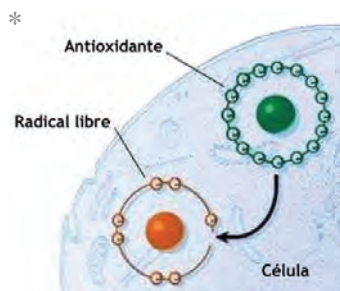
La sensibilidad a la presión de la vitamina C depende de la relación molar de la vitamina y de la concentración de oxígeno disuelto. Así, cuando se elimina la mayor parte del oxígeno, la presurización tiene poco o nulo efecto sobre la

\* Extraído de: [http://zulliesikawati.files.wordpress.com/2008/11/ist2\\_6475935-vitamin-s-table-with-food-icons.jpg](http://zulliesikawati.files.wordpress.com/2008/11/ist2_6475935-vitamin-s-table-with-food-icons.jpg)

concentración de vitamina C. La matriz alimentaria también juega un papel importante en la estabilización de la vitamina C frente a la presión (Oey *y col.*, 2008a). En diversos estudios se comprobó que esta estabilidad era mayor en frutas que en hortalizas (Oey *y col.*, 2008a). En puré de tomate se redujo en un 40 % la concentración de ácido ascórbico tras presurizar a 400 MPa a 25 °C durante 15 min (Sanchez–Moreno, Plaza, de Ancos y Cano, 2006). Mientras que en zumo de naranja la AAPH a 400 MPa a 40 °C durante 1 min supuso una reducción del 9 % (Sanchez–Moreno *y col.*, 2006). De manera similar, en puré de guayaba presiones entre 400 y 600 MPa durante 15 min no modificaron las concentraciones iniciales de ácido ascórbico (Yen y Lin, 1996).

El efecto de la presión en la vitamina E, componente integrante de las membranas celulares con propiedades estabilizadoras y con un gran poder antioxidante, se ha estudiado en jamón ibérico. En esta matriz se observó que la presurización a 400 MPa producía una disminución en la concentración de la vitamina E a la par que aumentaba la oxidación lipídica (Andrés, Adamsen, Möller, Ruiz y Skibsted, 2006). Se ha encontrado poca bibliografía al respecto de otras vitaminas liposolubles. Tauscher (1999) presurizó una disolución de vitamina K<sub>1</sub> a 650 MPa a 70 °C durante 3 horas y observó que una pequeña parte de la vitamina se isomerizaba. Los autores también presurizaron entre 400 y 600 MPa una disolución de vitamina A en etanol, obteniendo una reducción significativa en la concentración de esta vitamina. Aunque es necesario realizar más estudios sobre el efecto de la presión en estas vitaminas, de acuerdo con el efecto en la vitamina E, las demás vitaminas liposolubles también podrían verse afectadas por la presión.

### 1.2.7. Antioxidantes



Las plantas y los animales mantienen complejos sistemas de múltiples tipos de antioxidantes, tales como glutatión, vitamina C y vitamina E. Además, pueden presentar enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión

deshidrogenasa y varias peroxidasas. También se encuentran, sobre todo en el mundo vegetal, especies antioxidantes, entre ellas los polifenoles, o los flavonoides.

De manera similar a las vitaminas, las especies antioxidantes son compuestos de bajo peso molecular, que pueden presentar cierta barorresistencia. Anteriores estudios han demostrado que la AAPH a presiones medias (200–600 MPa), a temperatura ambiente y durante cortos periodos de tiempo, tiene poco efecto en el poder antioxidante de los alimentos (Andrés *y col.*, 2006; Oey *y col.*, 2008a; Serra *y col.*, 2007a). Aunque la matriz de estudio puede tener un papel clave en el mantenimiento del poder antioxidante (Oey *y col.*, 2008a).

\* Extraído de: <http://www.healthfruit.com/images/antioxidant02.jpg>

### *1.3. Efecto de la alta presión en los microorganismos*

La inactivación microbiana es el objetivo prioritario de la AAPH. La extensión de esta inactivación depende de ciertas variables como la presión, el tiempo y la temperatura del tratamiento, la composición del alimento y el tipo de microorganismo involucrado (Sangronis, Pothakamury, Ramos, Ibarz, Barbosa-Cánovas y Swanson, 1997).

Desde el punto de vista microbiológico, la membrana celular está considerada la más afectada por la presurización. Se acepta de manera general que la pérdida de constituyentes intracelulares a través de la permeabilización de la membrana celular es la primera razón para la inactivación microbiana inducida por la alta presión (Pothakamury, Barbosa-Cánovas, Swanson y Meyer, 1995). Aunque esta inactivación es probablemente consecuencia de daños múltiples o acumulativos en el interior de la célula (Simpson y Gilmour, 1997). Entre estos factores se encuentran la inhibición de las reacciones productoras de energía y la desnaturalización de los enzimas clave para la supervivencia de los microorganismos (Pothakamury *y col.*, 1995).

El efecto de la AAPH en la inactivación de microorganismos depende del microorganismo en estudio. Así, la efectividad de la AAPH es: mohos y levaduras > bacterias Gram negativo > virus con envoltura > bacterias Gram positivo > virus sin envoltura > esporas. La sensibilidad a la presión también depende de la fase vegetativa en la que se encuentren los microorganismos. En general, las células en fase de crecimiento exponencial son más sensibles a las altas presiones que las que se encuentran en fase estacionaria (Smelt, Hellemons y Patterson, 2002).

Otro factor que influye en la inactivación microbiana es la composición de los alimentos. De acuerdo con anteriores estudios, la baja actividad de agua protege

a las células de la alta presión (Cheftel y Culioli, 1997; Garriga *y col.*, 2004), aunque una vez dañado el microorganismo por la AAPH, éste se torna más sensible a las bajas actividades de agua (Rubio, Martínez, González–Fernández, García–Cachán, Rovira y Jaime, 2006). El pH del medio, que puede variar con la presión, también influye, ya que los microorganismos son más sensibles a la presión a pH bajo (Linton, McClements y Patterson, 1999).

La AAPH no es efectiva eliminando las esporas. Además, puede producir daños subletales en las células, pudiendo crecer los microorganismos durante el almacenamiento. Así, es necesario el almacenamiento en refrigeración de los alimentos presurizados (Garriga *y col.*, 2004; Ruiz–Capillas, Carballo y Jiménez Colmenero, 2007).

#### *1.4. Efecto de las altas presiones en la calidad sensorial de los alimentos*

Los compuestos relacionados con el gusto y el aroma, o los compuestos responsables del color suelen tener un bajo peso molecular, mostrándose poco sensibles a la AAPH (Téllez-Luis *y col.*, 2001).

En frutas y hortalizas con altos contenidos en pigmentos como la clorofila, los carotenoides o las antocianinas, la presurización no produce modificaciones del color (Oey *y col.*, 2008b). Sin embargo, en vegetales con baja concertación de pigmentos la presurización puede desencadenar reacciones que produzcan variaciones en el color (Oey *y col.*, 2008b). Así, en champiñones la presurización produce un cambio de color del blanco al marrón (Matser, Knott, Teunissen y Bartels, 2000), y en peras la presión produce un oscurecimiento (Asaka y Hayaszhi, 1991); todo ello causado por la acción de los enzimas polifenoloxidasas.

En la carne cruda se ha observado que la presurización causa decoloración (Carlez, Veciana-Nogues y Cheftel, 1995; Cheftel y Culioli, 1997). Esto ocurre porque la oximioglobina, responsable del color rojo brillante en la superficie de la carne, se oxida a metamioglobina, que posee color marrón; además, la extractabilidad de la mioglobina se reduce, provocando todo ello la decoloración en la carne presurizada (Carlez *y col.*, 1995). Esta decoloración puede disminuirse o suprimirse con el uso de nitritos, cocinando previamente la carne o usando carnes blancas (Campus, 2010; Cheftel y Culioli, 1997).

El efecto de la presión en la textura ha sido muy diverso. Por un lado, este efecto es dependiente de la presión aplicada. Al presurizar pechuga de pavo a 150 MPa durante 0,1 seg se observó una disminución de la dureza y gomosidad de la carne (Villacís, Rastogi y Balasubramaniam, 2008). Los autores sugirieron que podría

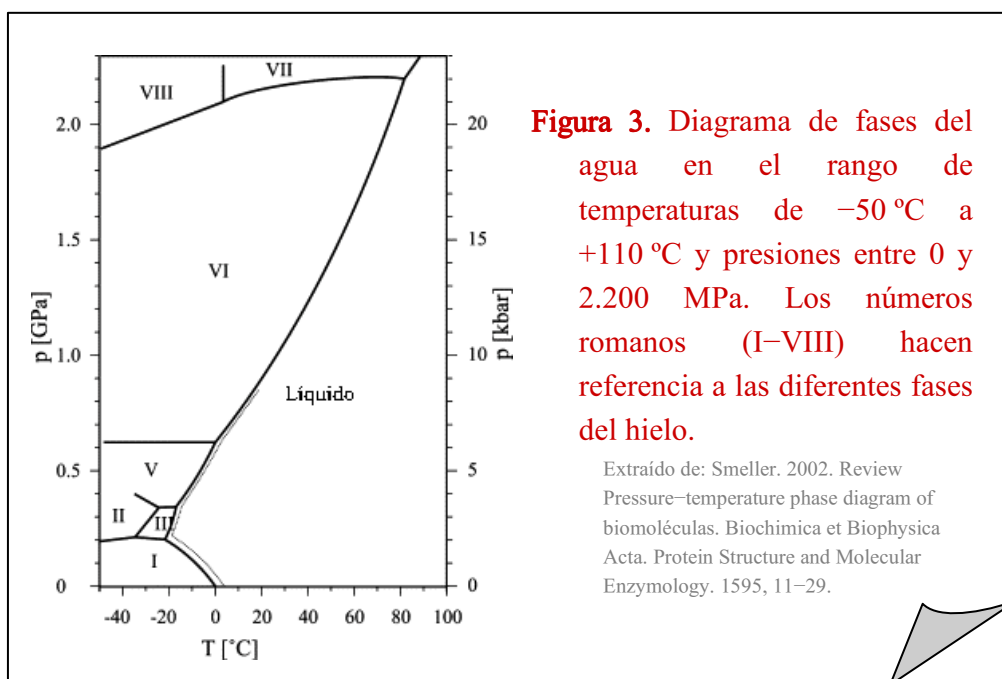
deberse a la pérdida de estructura de la miosina a presiones inferiores a 200 MPa. Sin embargo, al aplicar presiones superiores a 150 MPa se obtuvo un aumento en la dureza y gomosidad de la pechuga de pavo (Villacís *y col.*, 2008). Los autores lo relacionaron con un aumento en la estabilidad de la estructura mediante puentes de hidrógeno, que produciría una mayor cohesión y por ello un aumento en la dureza. Este aumento en la dureza tras la AAPH también se ha relacionado con una disminución en la capacidad de retención de agua (Angsupanich y Ledward, 1998). Aunque la acción de enzimas, como lisosomales o calpaínas, junto a un aumento de sustratos en el medio por la destrucción de las membranas, también pueden influir en los cambios de textura inducidos por la presión (Campus, 2010; Homma *y col.*, 1994). Por otro lado, la composición de los alimentos también puede influir en la modificación de la textura causada por la AAPH. Así, presurizando embutidos con poca grasa a 300 MPa se observó una tendencia hacia el incremento de la dureza; sin embargo en los embutidos que contenían mucha grasa disminuyó la dureza (Jiménez-Colmenero, Carballo, Fernández, Barreto y Solas, 1997).

Las modificaciones de textura en hortalizas y frutas se relacionan en su mayoría con transformaciones en los polímeros de la pared celular por reacciones enzimáticas o no enzimáticas (Sila *y col.*, 2008). Las modificaciones celulares causadas por la AAPH facilitan las reacciones enzimáticas y no enzimáticas, favoreciendo el contacto entre los sustratos, iones y enzimas (Oey *y col.*, 2008b). Aparte de esto, la presurización también puede modificar la actividad de los enzimas, haciéndolos más o menos activos. Así, los enzimas pectinmetilesterasa o poligalacturonasa, responsables en gran medida de los cambios de textura en frutas y hortalizas, presentan una diferente actividad en función de su naturaleza y la intensidad del tratamiento (Oey *y col.*, 2008b).

### 1.5. Aplicaciones de la AAPH

El uso más extendido de la presurización es la inactivación microbiana, aunque dada la transformación que produce en los diferentes componentes de los alimentos su aplicabilidad se ha extendido a otros ámbitos. A continuación comentamos otras aplicaciones:

- **Congelado y descongelado:** la AAPH puede alterar en menor medida la calidad de los alimentos durante estos procesos ya que produce la disminución del punto de fusión del agua (Fig. 3), permitiendo una nucleación rápida y uniforme al descomprimir (Indrawati *y col.*, 2003).



- **Tenderización de la carne:** la presurización causa la liberación de enzimas lisosomales (Cheftel y Culioli, 1997) y puede activar enzimas como las catepsinas o las calpaínas (Homma *y col.*, 1994), provocando el ablandamiento de las carnes. Diversos estudios se han realizado en referencia a este efecto de la AAPH, pero todavía no se han obtenido resultados concluyentes (Homma *y col.*, 1994; Ichinoseki *y col.*, 2006;



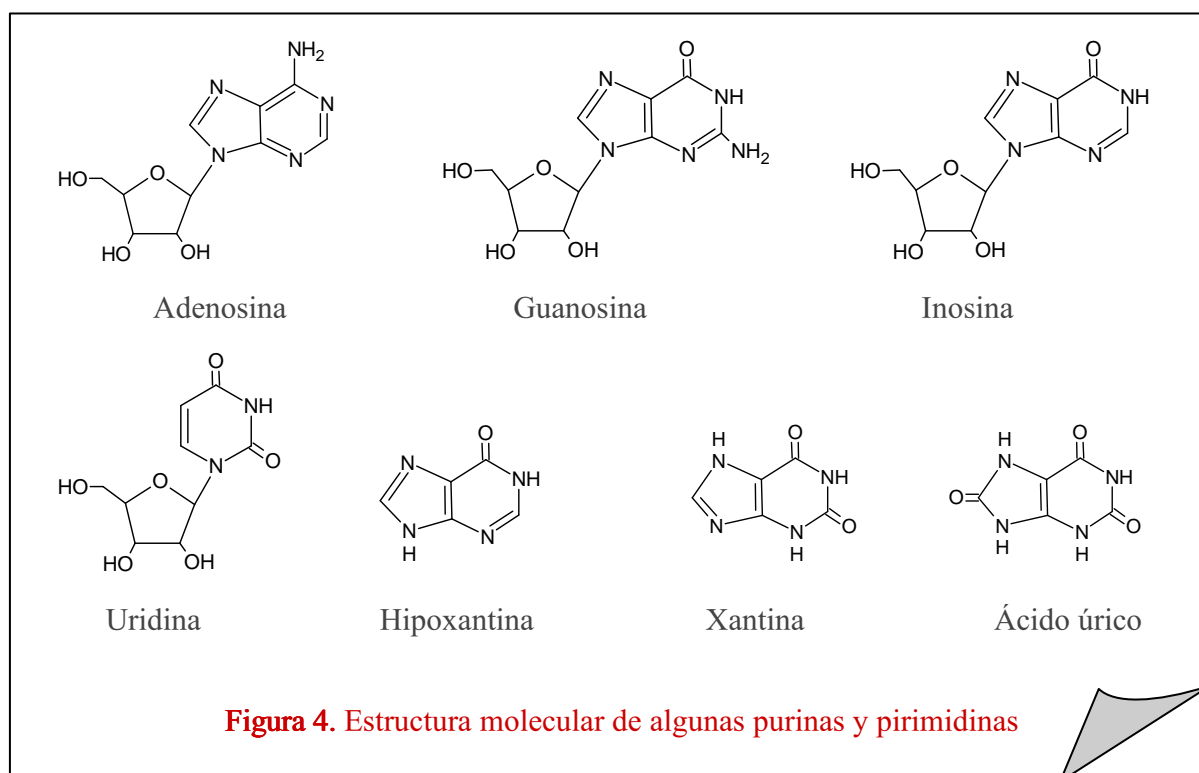
Jung, Ghoul y de Lamballerie–Anton, 2000; Y. Ueno, Ikeuchi y Suzuki, 1999).

- **Gelificación:** con la alta presión se pueden obtener geles a partir de carne picada (Yoshioka, Kage y Omura, 1992) y se puede mejorar la coagulación de homogeneizados de carne (Shigehisa, Ohmori, Saito, Taji y Hayashi, 1991). En proteínas de pescado la presurización ha producido geles de surimi con cualidades diferentes a las obtenidas mediante procesos térmicos (Gilleland, Lanier y Hamann, 1997), ya que los geles formados mediante la AAPH son menos firmes, más elásticos, extensibles, lisos y brillantes (Denda y Hayashi, 1992).
- **Gelatinización del almidón:** el uso del almidón en los productos alimentarios está muy extendido por sus propiedades gelificantes. La presurización puede producir una gelatinización y dar productos con características diferentes a los obtenidos por tratamientos térmicos (Stute, Heilbronn, Klingler, Boguslawski, Eshtiaghi y Knorr, 1996).
- **Homogeneización de la leche:** la presurización en la leche produce la desintegración de las micelas de caseína en partículas de menor diámetro, disminuyendo la turbidez y aumentando la viscosidad (Johnston, Austin y Murphy, 1992). Además, induce la disociación del fosfato cálcico coloidal y la desnaturalización de las proteínas del suero de la leche, produciendo cambios en sus propiedades tecnológicas (López–Fandiño, Carrascosa y Olano, 1996). Todo ello tiene aplicación en la manufacturación de quesos, ya que reduce las propiedades de coagulación del cuajo de la leche y disminuye su tiempo de curado (Huppertz, Kelly y Fox, 2002). También mejora la textura de los yogures procedentes de leches tratadas con alta presión (Huppertz *y col.*, 2002).

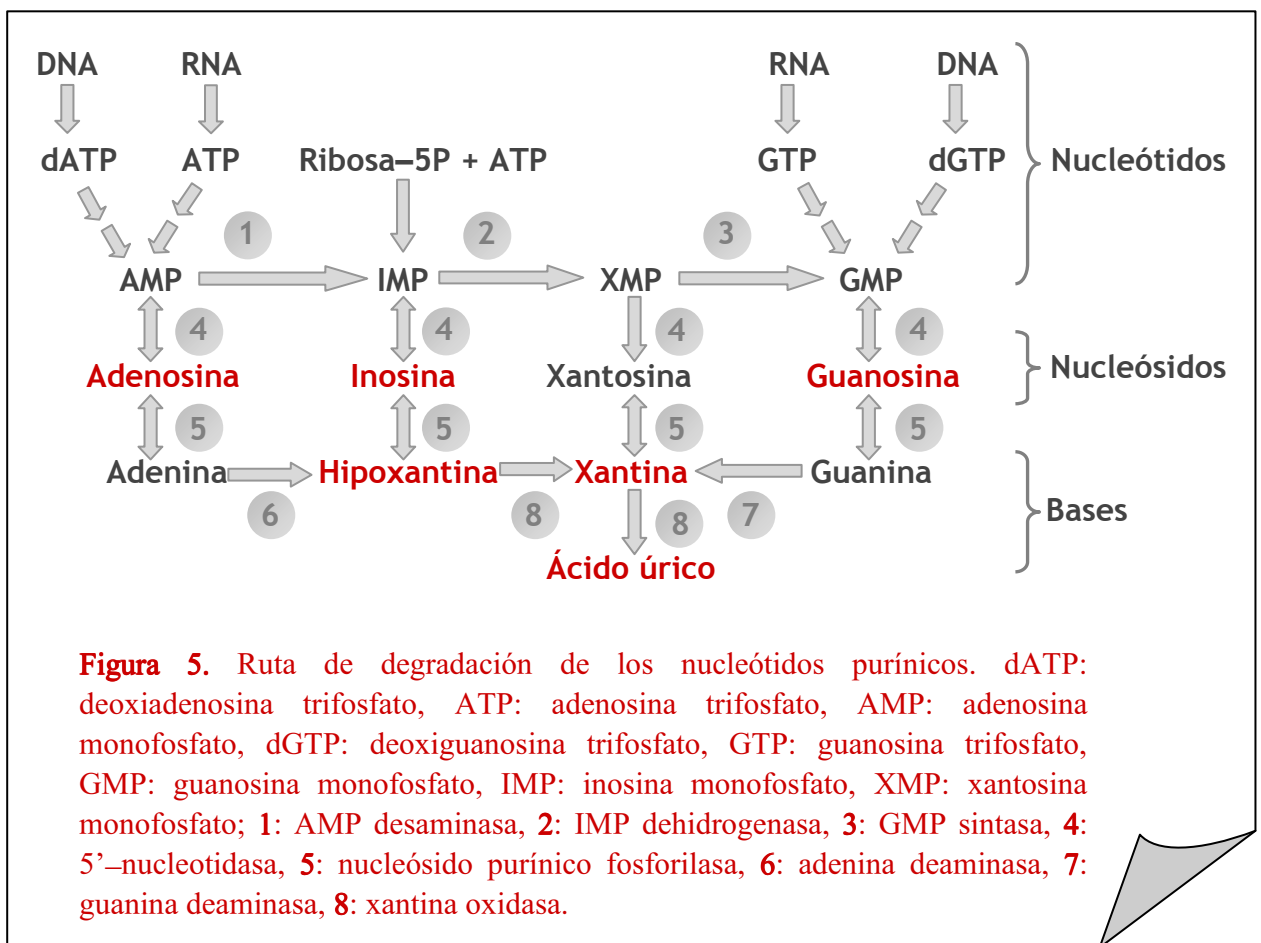
## 2. Purinas y pirimidinas

### 2.1. Descripción general

Los nucleótidos, monómeros de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), tienen un papel destacado en el metabolismo, sirviendo de fuente de energía para las reacciones químicas, participando en las señales de las células o incorporados como cofactores en las reacciones enzimáticas (Carver y Walker, 1995).



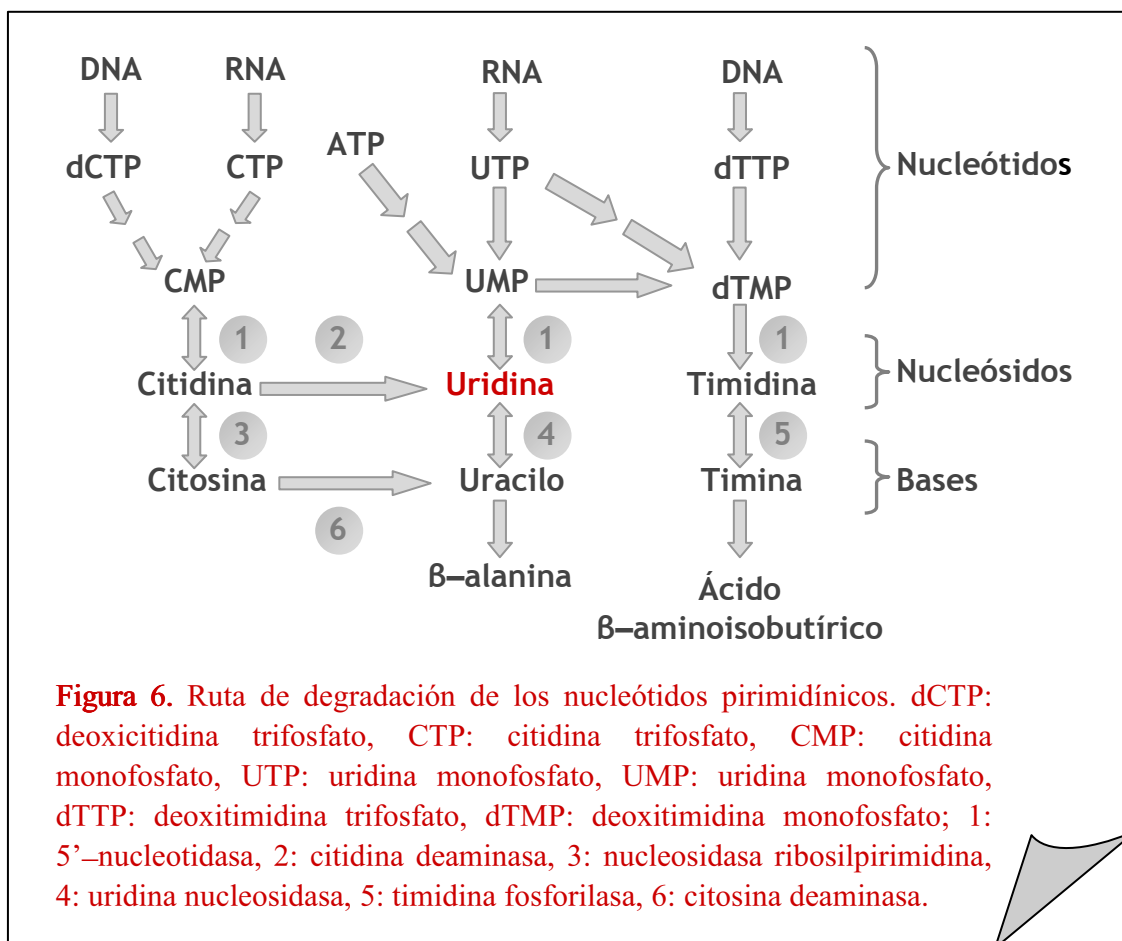
A partir de los nucleótidos se forman las purinas y pirimidinas, que engloban tanto los nucleósidos como las bases purínicas y pirimidínicas. La Figura 5 muestra la ruta de degradación de los nucleótidos purínicos en la célula. A partir de los nucleótidos se forman los nucleósidos, y a partir de éstos, las bases purínicas. El producto final de degradación es el ácido úrico en humanos y grandes primates; en otros animales como el cerdo el ácido úrico puede degradarse a alantoína (Greife, 1984).



La ruta de degradación de los nucleótidos pirimidínicos se muestra en la Figura 6. A partir de los nucleótidos pirimidínicos citidina monofosfato, timidina monofosfato y uridina monofosfato se forman los nucleósidos pirimidínicos citidina, timidina y uridina, respectivamente (Fig. 6). En el metabolismo de las

pirimidinas los productos finales son el aminoácido  $\beta$ -alanina y el ácido  $\beta$ -amino isobutírico (Greife, 1984).

Como puede verse en la Figura 4, los nucleósidos (adenosina, guanosina, inosina o uridina) son compuestos orgánicos formados por una base heterocíclica unida a una ribosa. Los nucleósidos pirimidínicos tienen un heterociclo aromático, mientras los purínicos tienen un anillo imidazol unido al heterociclo aromático. Las purinas (hipoxantina, xantina y ácido úrico) están compuestas por el heterociclo aromático y el anillo imidazol, diferenciándose entre si por los diferentes sustituyentes en la base heterocíclica.



**Figura 6.** Ruta de degradación de los nucleótidos pirimidínicos. dCTP: deoxicitidina trifosfato, CTP: citidina trifosfato, CMP: citidina monofosfato, UTP: uridina monofosfato, UMP: uridina monofosfato, dTTP: deoxitimidina trifosfato, dTMP: deoxitimidina monofosfato; 1: 5'-nucleotidasa, 2: citidina deaminasa, 3: nucleosidasa ribosilpirimidina, 4: uridina nucleosidasa, 5: timidina fosforilasa, 6: citosina deaminasa.

## 2.2. Propiedades de las purinas y pirimidinas

Las purinas y las pirimidinas no son compuestos esenciales, pero se encuentran implicados en diferentes rutas metabólicas. Carver y Walter (1995) encontraron indicios sobre el efecto de los nucleótidos de la dieta en el mantenimiento del sistema inmune. El nucleósido inosina y sus metabolitos (hipoxantina, xantina y ácido úrico) pueden producir un aumento en la absorción de hierro en ratas (Faelli y Esposito, 1970); mientras el nucleósido adenosina posee propiedades como vasodilatador (Berne, Knabb, Ely y Rubio, 1983). Por el contrario, el nucleósido pirimidínico uridina ha mostrado efecto vasoconstrictor en ratas (Macdonald, Assef, Guiffre y Lo, 1984). El producto final de degradación de las purinas en humanos, el ácido úrico, es poco soluble y puede formar cristales de urato sódico, que al acumularse en las articulaciones producen una parte de los síntomas de la enfermedad de la gota (Carver y Walker, 1995). Por otro lado, el ácido úrico posee actividad antioxidante, eliminando radicales “*in vitro*” (Aruoma y Halliwell, 1989), y puede prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad en el plasma, y de ácidos grasos poliinsaturados “*in vitro*” (Schlotte, Sevanian, Hochstein y Weithmann, 1998).

Uno de los aspectos más relevantes en el estudio de purinas y pirimidinas, tanto en su vertiente clínica como en la referente a la composición de los alimentos es su relación con la enfermedad de la gota. En los países desarrollados cerca del 20 % de la población adulta sufre hiperurcemia, convirtiéndose en gota en un 5 ó 10 % de los casos (Jonas *y col.*, 2001). El nivel sérico del ácido úrico está relacionado con un alto consumo de ácidos nucleicos en la dieta (Carver y Walker, 1995). Se ha observado que el consumo de ARN es más uricogénico que el consumo de ADN (Zöllner, 1982). Además, la administración oral de hipoxantina o adenina producen un incremento mayor del ácido úrico sérico que

el consumo de xantina o guanina (Clifford *y col.*, 1976). En vista del diferente efecto de las purinas en el organismo, la cuantificación detallada de cada uno de estos compuestos puede proporcionar una información adicional sobre el efecto uricogénico de los alimentos. Por otro lado, todavía no se sabe cómo influye el incremento de los niveles séricos de uridina en el organismo, aunque su determinación en los alimentos puede contribuir a un mayor conocimiento en este campo.

El estudio de las purinas y pirimidinas también ha tenido relevancia en los análisis clínicos (Safranow y Machoy, 2005) o en la composición de alimentos (Lou, 1998). Las purinas y pirimidinas se han utilizado como índice de frescura en pescado (Veciana–Nogues, Izquierdo–Pulido y Vidal–Carou, 1997). En carne se han relacionado con el desarrollo de sabores (Cambero *y col.*, 2000), o como índices de maduración (Tikk *y col.*, 2006; Yano, Kataho, Watanabe, Nakamura y Asano, 1995). En harina se han empleado como evidencia del deterioro microbiológico (Ghaedian y Wehling, 1996). Clínicamente, las purinas y pirimidinas se han estudiado en fluidos biológicos humanos como plasma u orina como biomarcadores de algunas enfermedades o desórdenes metabólicos como el síndrome de Lesch–Nyhan o la xantinuria (Seegmiller, Laster y Howell, 1963).

### *2.3. Técnicas analíticas empleadas en la determinación*

El proceso de extracción de las purinas y pirimidinas puede ser poco eficiente dependiendo del pH de la solución extractante (Safranow y Machoy, 2005). Aunque la extracción con soluciones ácidas ha sido ampliamente empleada en estudios previos (Cheng, Lee y Chen, 2004; Clifford y Story, 1976; Terzuoli *y col.*, 1999), la degradación de los nucleósidos inosina, adenosina y guanosina en sus bases se puede producir a pH entre 1 y 4; también en esas condiciones se puede producir la degradación de las bases purínicas adenina y guanina a hipoxantina y xantina (Fan, Yang y Li, 2007; Lim, Huang, Jenner, Wang, Tang y Halliwell, 2006).

Diversos métodos se han empleado para la detección de purinas y pirimidinas. Los métodos enzimáticos se han usado para cuantificar xantina, hipoxantina y ácido úrico; pero como la xantina oxidasa puede oxidar tanto a la xantina como a la hipoxantina (Fig. 5), no era posible una determinación específica (Zen, Lai, Yang y Kumar, 2002). La determinación de ácido úrico por métodos colorimétricos ha sido poco sensible y el efecto de la matriz ha sido muy importante, de modo que la repetibilidad era un punto crítico (George, Dipu, Mehra, Singh, Verma y Ramgaokar, 2006). La espectroscopía infrarroja o la difracción de los rayos X se han empleado para la determinación de purinas, pero estas técnicas no se pueden emplear en los análisis de rutina (Safranow, Machoy y Ciechanowski, 2000). Algunas purinas (adenina, guanina, hipoxantina, xantina y ácido úrico) también se han determinado por electroforesis capilar con detección electroquímica (Chen, Chu, Zhang y Ye, 2002), sin embargo esta técnica es poco reproducible. Zen, Lai y Senthil Kumar (2002) determinaron simultáneamente hipoxantina, xantina y ácido úrico mediante un sensor multianalito basado en un electrodo de carbono recubierto con nontronita

serigrafada, pero sólo era útil para bajas concentraciones en matriz, ya que los electrodos se podían saturar.

En la actualidad, la cromatografía líquida (HPLC) con detección ultravioleta UV-DAD es la metodología más empleada (Lou, Chen, Hsu y Chang, 2005; Safranow *y col.*, 2000; Terzuoli *y col.*, 1999). La HPLC permite realizar análisis relativamente rápidos, consiguiendo resolución y sensibilidad. Además, la HPLC permite obtener una buena reproducibilidad y una identificación de los compuestos basada en los espectros y en los tiempos de retención de los compuestos.

Las columnas de intercambio iónico se han empleado para la determinación de las purinas y pirimidinas (Clifford y Story, 1976). Estas columnas tienen la desventaja de tener una velocidad de transferencia de masa y una resistencia mecánica bajas, un elevado coste y la posibilidad de presentar problemas de eficiencia y estabilidad química (Gomis, 1992). Por ello, la cromatografía en fase reversa con columnas C18 se ha empleado a menudo para el análisis de purinas y pirimidinas (Lou *y col.*, 2005; Safranow *y col.*, 2000; Terzuoli *y col.*, 1999). Además, el uso de espectrometría de masas (MS) junto con la detección UV ha permitido aumentar la sensibilidad y la selectividad mediante la extracción de cromatogramas para valores de  $m/z$  definidos, siendo la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) una de las técnicas más útiles para este fin (Catinella, Rovatti, Hamdan, Porcelli, Frosi y Marinello, 1997). Sin embargo, la diferente proporción que se puede encontrar en alimentos de cada purina y pirimidina (entre 2 y 3 órdenes de magnitud), junto con la presencia de interferentes provenientes de la matriz, pueden dificultar la cuantificación simultánea de las diferentes purinas y pirimidinas (Frycak, Huskova, Adam y Lemr, 2002).



## 2.4. Efecto de las altas presiones

El efecto de la alta presión en referencia a los contenidos de purinas y pirimidinas se ha estudiado en varios alimentos. En la leche presurizada se han utilizado como indicadores del proceso tecnológico (Martin *y col.*, 2008). En carne tratada con altas presiones se han estudiado por su relevancia en el desarrollo de sabores (Mori *y col.*, 2007). En pescado presurizado se han determinado en base a su utilización como índice de frescura (Ortea, Rodríguez, Tabilo–Munizaga, Pérez–Won y Aubourg, 2010). De acuerdo con estos estudios previos, la AAPH puede producir variaciones en el contenido de purinas y pirimidinas de los alimentos. Bien sea por una diferente extractabilidad de las purinas y pirimidinas, o por su efecto en los enzimas implicados en su metabolismo (Martin *y col.*, 2008; Mori, Yokoyama *y col.*, 2007; Ortea *y col.*, 2010).

De acuerdo con Martin, Lorenzen, Buchheim y Schilmme (2001), la AAPH no produjo la desfosforilación espontánea de los nucleótidos en disolución. Sin embargo, en leche precalentada a 50 °C el tratamiento a 500 MPa durante 20 min produjo tanto un incremento de citidina, uridina y adenosina, como una disminución de inosina (Martin *y col.*, 2008). Cabe destacar que en leche precalentada a 80 °C durante 5 min, el mismo tratamiento de presurización no produjo diferencias en los contenidos de uridina, citidina, adenosina ni inosina (Martin *y col.*, 2008). De manera similar, la grasa contenida en la leche produjo un efecto protector en la variación de los contenidos de purinas y pirimidinas con la presión (Martin *y col.*, 2008).

En músculo de conejo se ha descrito que presiones entre 100 y 250 MPa no produjeron diferencias en el contenido del nucleótido inosina monofosfato (Mori *y col.*, 2007). Sin embargo, presiones superiores a 300 MPa dieron lugar a la

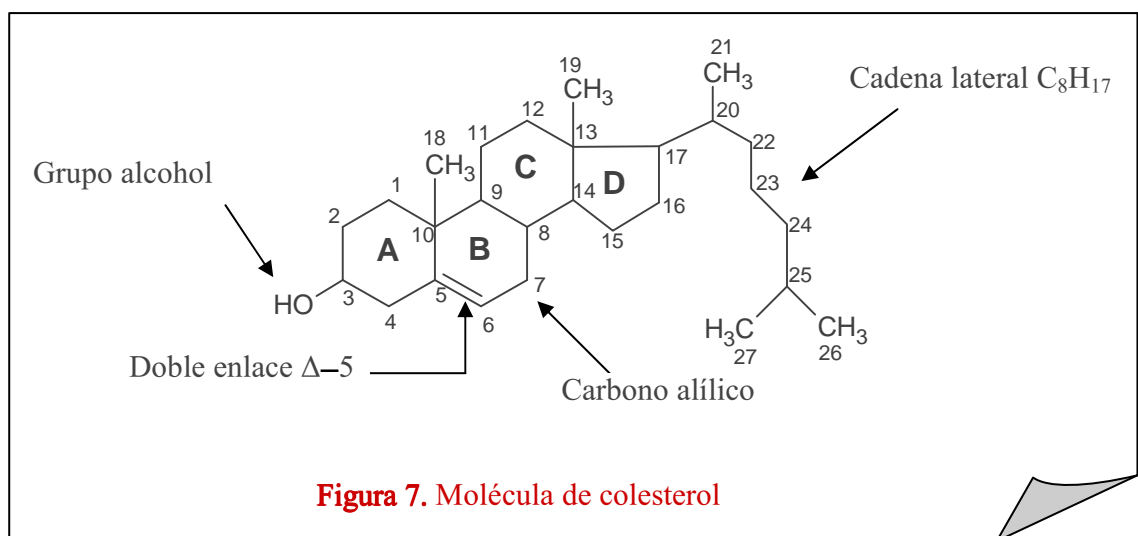
desnaturalización de los enzimas implicados en el metabolismo de purinas (Mori, Yokoyama *y col.*, 2007). Entre los enzimas implicados, tanto la inosina monofosfato nucleotidasa como la adenosina monofosfato nucleotidasa perdieron gran parte de su actividad a partir de 300 MPa (Mori, Yokoyama *y col.*, 2007). Por otro lado, el enzima adenosina desaminasa se desnaturalizó a partir de 300 MPa (Mori, Yokoyama *y col.*, 2007).

En músculo de carpa presurizado entre 300 y 500 MPa se observó un aumento en el contenido de inosina monofosfato (Shoji y Saeki, 1989). Por ello los autores (Shoji y Saeki, 1989) sugirieron que a estos valores de presión los enzimas involucrados en la descomposición de la inosina monofosfato estarían desactivados. De acuerdo con los estudios previos en pescado o carne, la AAPH puede producir variaciones en las concentraciones de purinas. Tanto a valores bajos de presión (100–200 MPa) por su efecto acelerador en el metabolismo purínico (Mori *y col.*, 2007; Ortea *y col.*, 2010); como a valores mayores de presión (300–500 MPa) por la posible desnaturalización de los enzimas (Mori, Yokoyama *y col.*, 2007; Ohshima, Ushio y Koizumi, 1993; Ortea *y col.*, 2010).

## 3. Óxidos de colesterol

### 3.1. El colesterol

El colesterol (colest-5-en-3 $\beta$ -ol) (Fig. 7) es un esteroide de gran importancia, ya que es necesario para la síntesis de hormonas sexuales, ácidos biliares y vitamina D; también es un importante componente de las membranas biológicas, influyendo en su fluidez. El colesterol se encuentra en los organismos vivos libre o esterificado con ácidos grasos saturados e insaturados en la fracción lipídica. La biosíntesis endógena y la dieta son los dos métodos por los cuales el organismo obtiene el colesterol.



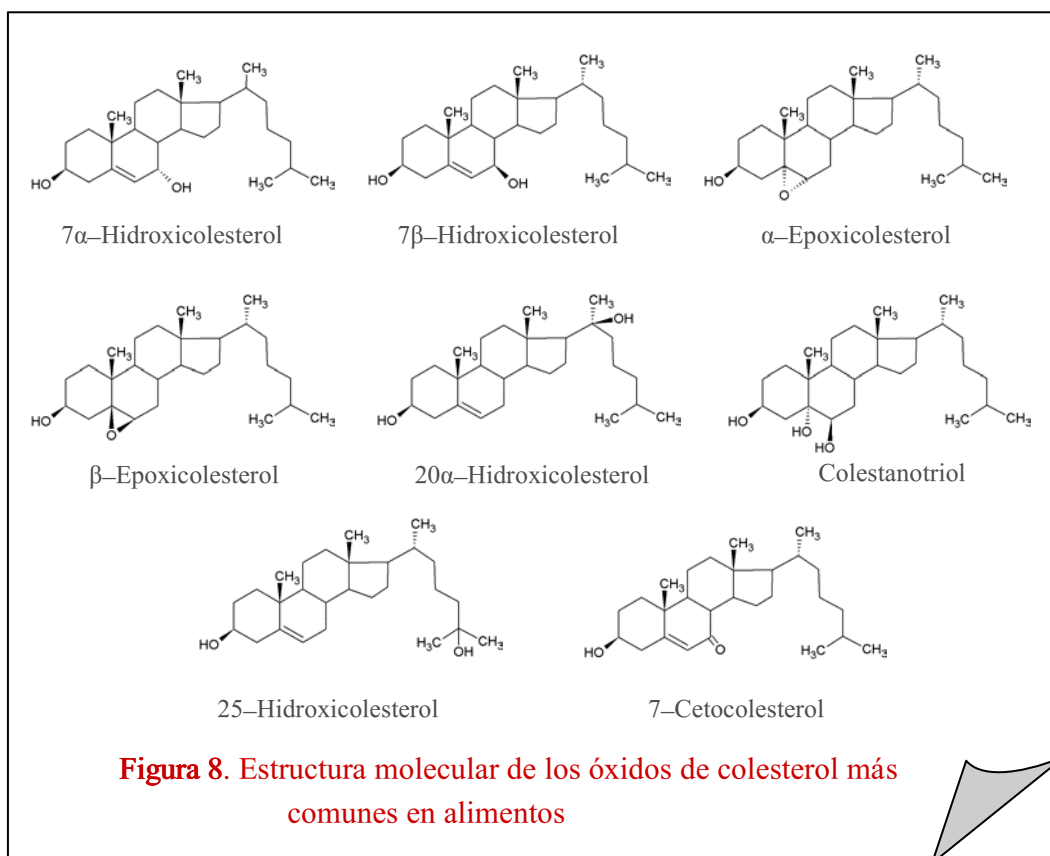
El colesterol, al igual que los triglicéridos, es transportado por la sangre formando parte de lipoproteínas, las cuales además están constituidas por fosfolípidos, colesterol, proteínas y apolipoproteínas; los quilomicrones pueden contener también triglicéridos. Aunque todos los tipos de lipoproteínas transportan colesterol, las lipoproteínas de baja densidad, LDL, transportan dos terceras partes del colesterol plasmático total en forma libre o esterificada desde el hígado a los tejidos. El nivel de LDL en sangre se considera un indicador de la cantidad de colesterol que se puede depositar en las paredes arteriales (U.S. Department of Health and Human Services, 1998). El colesterol en exceso se acumula en depósitos de grasa insolubles, llamados placas aterogénicas, a lo largo de las paredes de las arterias, estrechándolas y pudiendo obturarlas, restringiendo así el flujo de sangre, lo que es una característica de las enfermedades vasculares, en particular de las cardiovasculares (Valenzuela, Sanhueza y Nieto, 2003).

### 3.2. Oxidación del colesterol

El colesterol es una molécula estable, sin embargo puede sufrir un proceso autooxidativo debido a la presencia de un doble enlace en la posición 5 ( $\Delta-5$ ) que posibilita la abstracción del hidrógeno del carbono alílico (Fig. 7). Actualmente aun no se ha establecido cómo se inicia la oxidación del colesterol. Smith (1981) sugirió que debería proceder de manera análoga a la oxidación de los ácidos grasos, pudiendo ser a nivel intermolecular o a nivel intramolecular. A nivel intermolecular, el hidrógeno del colesterol es captado por los radicales peroxi u oxi de los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en los fosfolípidos de membranas vecinas. Los hidroperóxidos juegan un papel importante facilitando la oxidación del colesterol en el doble enlace  $\Delta-5$  (Lercker y Rodríguez-Estrada, 2002). A nivel intramolecular, en la molécula de éster de colesterol, la fracción proveniente del ácido graso atacaría a la fracción colesteril en el carbono alílico de la misma molécula, iniciándose así la autooxidación. En pruebas experimentales realizadas por Smith (1981) se observó que la autooxidación intramolecular del colesterol se producía más rápidamente en una solución con  $\text{pH} > 7$ . Pero la autooxidación intermolecular ocurría más rápidamente con temperatura, en presencia de aire o en medio acuoso. Los productos de la autooxidación intermolecular son los óxidos de colesterol  $7\alpha$ -hidroxicolesterol,  $7\beta$ -hidroxicolesterol,  $\beta$ -epoxicolesterol,  $\alpha$ -epoxicolesterol,  $7$ -cetocolesterol y colestanol.

Se han identificado más de 70 productos de oxidación del colesterol, en función de los diferentes procesos de oxidación se producen diferentes productos (Smith, 1981). De todos modos, los óxidos de colesterol más estudiados y mayoritarios en los alimentos son:  $7\alpha$ -hidroxicolesterol ( $5$ -colestene- $3\beta$ ,  $7\alpha$ -diol),  $7\beta$ -hidroxicolesterol ( $5$ -colestene- $3\beta$ ,  $7\beta$ -diol),  $\beta$ -epoxicolesterol

(5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxi-5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ -ol),  $\alpha$ -epoxicolesterol (5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxi-5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ -ol), 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol (5-colesteno-3 $\beta$ , 20 $\alpha$ -diol), colestanoetriol (5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ , 5, 6 $\beta$ -triol), 25-hidroxicolesterol (5-colesteno-3 $\beta$ , 25 $\alpha$ -diol) y 7-cetocolesterol (5-colesteno-3 $\beta$ -ol-7-ona) (Fig. 8).



Dentro de los productos de oxidación del colesterol, el 7-cetocolesterol ha sido utilizado como indicador del nivel de oxidación del colesterol por ser producido en mayor cantidad en los estadios iniciales del proceso oxidativo (Penazzi *et al.*, 1995; Rodríguez-Estrada, Penazzi, Caboni, Bertacco y Lercker, 1997; Zunin, Evangelisti, Caboni, Penazzi, Lercker y Tiscornia, 1995).

### 3.3. Factores que afectan a la oxidación del colesterol

La oxidación del colesterol está considerada como un sistema dependiente por la cantidad de óxidos de colesterol que se forman y por el hecho de que sus cantidades relativas varían según la temperatura, el tiempo de oxidación, la presencia de agua, el pH y la estructura del sustrato (Kim y Nawar, 1993).

Los factores más importantes son:

- **Calor:** El tratamiento con calor provoca modificaciones en la estructura celular, inactiva enzimas y libera el oxígeno de la oxihemoglobina, facilitando las condiciones adecuadas para la producción de peróxido de hidrógeno y para otras reacciones. El cocinado a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo puede producir la liberación de iones de hierro de los grupos hemo, provocando un gran aumento en el nivel de óxidos de colesterol (Park y Addis, 1986). Por otro lado, el empleo de altas temperaturas produce una intensa degradación del colesterol sin un aumento en la producción de óxidos de colesterol (Park y Addis, 1986).
- **Procesado:** El cortado, picado y mezclado de la carne y de los productos cárnicos rompe la estructura muscular y aumenta la superficie expuesta al oxígeno y a otros oxidantes (Novelli *y col.*, 1998).
- **Sustancias prooxidantes:** El cloruro de sodio puede tener actividad prooxidante (Kanner, 1994) con un mecanismo no aclarado todavía.
- **Irradiación:** Todos los óxidos de colesterol aumentan con la irradiación, excepto el colestanoetriol, que se forma al abrirse el anillo epoxi de los isómeros de  $\alpha$  y  $\beta$  epoxicolesterol por un proceso cinéticamente más lento (Boselli, Caboni, Rodríguez-Estrada, Toschi, Daniel y Lercker, 2005).

- **Contenido de ácidos grasos:** Un aumento de ácidos grasos poliinsaturados puede afectar a la oxidación del colesterol, al favorecer la formación de radicales (Osada, Kodama, Yamada y Sugano, 1993).
- **Condiciones de almacenamiento:** El grado de oxidación del colesterol también puede depender de las condiciones de almacenamiento (Pie, Spahis y Seillan, 1990), tales como la temperatura, la luz y el tiempo.



### 3.4. Efectos nocivos de los óxidos de colesterol

Los óxidos de colesterol están directamente relacionados con el desarrollo de placas arterioscleróticas y con otros efectos biológicos no deseables como la citotoxicidad, la carcinogénesis y la mutagénesis (Guardiola, Codony, Addis, Rafecas y Boatella, 1996). La absorción de los óxidos de colesterol en animales se produce en el intestino (Fornas, Martínez-Sales, Camañas y Báguena, 1984; Osada, Sasaki y Sugano, 1994). Una vez en el organismo pueden metabolizarse rápidamente, excretándose por las heces; o distribuirse por el organismo transportados por las lipoproteínas (Krut, Yang, Schonfeld y Ostlund, 1997), principalmente por las de baja densidad (Sevanian *y col.*, 1997). Se cree que las lipoproteínas que transportan óxidos de colesterol pueden pasar al interior de las arterias utilizando los mismos receptores que el colesterol, contribuyendo a la formación de las placas ateroscleróticas (Grundy, 1986; 1990).

Staprans, Pan, Rapp y Feingold (1998) observaron que la arteriosclerosis en ratones alimentados diariamente con 25 mg de óxidos de colesterol durante dos semanas era el doble que en ratones con una dieta normal, sin adición de óxidos de colesterol. Los óxidos de colesterol 25-hidroxicolesterol y colestanoetriol serían los principales causantes de estos efectos negativos (Addis, 1986; Kubow, 1990; Kumar y Singhal, 1991).

También se ha demostrado que el  $\alpha$ -epoxicolesterol y el  $\beta$ -epoxicolesterol pueden ser carcinogénicos, enlazándose al DNA e induciendo su reparación (Blackburn, Kellard, Rashid y Thompson, 1983; Morin, Hu, Peng y Sevanian, 1991).

El 7-cetocolesterol ha mostrado efectos citotóxicos, pudiendo inducir la muerte por apoptosis de las células endoteliales y de las del músculo liso fragmentando su DNA (Lizard *y col.*, 1999; Yin *y col.*, 2000).

### *3.5. Determinación de óxidos de colesterol en alimentos*

En los últimos años se han publicado numerosos estudios que hacen referencia a la determinación de óxidos de colesterol en productos alimentarios. Se han utilizado para ello una gran variedad de metodologías, con discrepancias en la determinación cualitativa y cuantitativa. Por ello, el desarrollo de métodos que permitan una cuantificación óptima de los óxidos de colesterol continúa siendo un trabajo pendiente, especialmente en alimentos con concentraciones bajas de estos compuestos (Guardiola, Codony, Rafecas y Boatella, 1995; McCluskey y Devery, 1993). De acuerdo con Schmarr, Gross y Shibamoto (1996), para obtener una metodología útil para la cuantificación de los óxidos de colesterol en alimentos se deben considerar ciertos aspectos problemáticos, como la concentración en la muestra y su polaridad.

Los óxidos de colesterol y el colesterol están presentes conjuntamente en los alimentos, pero así como el colesterol presenta concentraciones de 50–200 mg/100 g o incluso superiores, los óxidos de colesterol se encuentran en el intervalo 10–0,1 mg/kg o en menor cantidad. Esto hace necesaria una etapa de purificación previa a la determinación para eliminar la mayor cantidad posible de colesterol y evitar su interferencia (Ulberth y Buchgraber, 2002). La saponificación y/o el fraccionamiento por extracción en fase sólida, SPE, de los extractos lipídicos han sido empleados previamente con este fin (García-Regueiro y Maraschiello, 1997; Novelli *y col.*, 1998; Petron, García-Regueiro, Martín, Muriel y Antequera, 2003; Ulberth y Buchgraber, 2002; Zanardi, Novelli, Ghiretti y Chizzolini, 2000). Este es el paso crítico para las metodologías analíticas dada la complejidad del fraccionamiento lipídico en muchos alimentos (Guardiola *y col.*, 1995). Además, la diferente polaridad de los óxidos de colesterol puede influir en su recuperación y análisis (Guardiola *y col.*,

1996). Así, el colestanoetriol, una molécula muy polar, no se recupera en la mayoría de procedimientos (Park y Addis, 1986; Rodríguez-Estrada *y col.*, 1997).

Los óxidos de colesterol pueden oxidarse o descomponerse durante la preparación de la muestra. El 7-cetocolesterol y el  $\alpha$ -epoxicolesterol son sensibles al pH básico y a las temperaturas elevadas. Así, algunos tratamientos, como la saponificación, pueden conducir a la formación de artefactos o a la descomposición de los óxidos de colesterol (Kim y Nawar, 1993; Park y Addis, 1991; Park, Guardiola, Park y Addis, 1996). La formación de óxidos de colesterol por autooxidación del colesterol se debe evitar en el proceso analítico, lo que requiere un control exhaustivo de las condiciones operativas. La presencia de aire, luz, peróxidos en los disolventes o tratamientos con calor durante la purificación pueden promover la formación de artefactos (Rose-Sallin, Huggett, Bosset, Tabacchi y Fay, 1995). La actividad de algunos agentes de adsorción, como la sílica, también puede influir en la formación de artefactos (Claude y Beaumont, 1966), debido a la interacción del colesterol con el ácido silícico en presencia de aire.

Los óxidos de colesterol se pueden presentar en forma libre o esterificada. En alimentos que contienen colesterol esterificado, para estimar la concentración de óxidos de colesterol es necesario hidrolizar los esteroides esterificados durante la preparación de la muestra (Bodin y Diczfalusy, 2002). Sin embargo, en alimentos donde la cantidad de colesterol esterificado no es muy elevada, se suele prescindir de la etapa de hidrólisis (Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1987; Sallin, Baumann, Bütikofer, Sieber y Bosset, 1993; Zubillaga y Maerker, 1984).

Para la correcta cuantificación de los óxidos de colesterol se requiere un patrón interno. En la mayoría de estudios con productos cárnicos se ha utilizado el 19-hidroxicolesterol, que es un derivado diol del colesterol, tiene muchas

características similares a los óxidos de colesterol y no se encuentra en los productos cárnicos (Boselli, Caboni, Rodríguez-Estrada, Toschi, Daniel y Lercker, 2005; García-Regueiro y Maraschiello, 1997; Petron *y col.*, 2003). Su uso es útil para corregir las posibles pérdidas durante el tratamiento de la muestra (Pie *y col.*, 1990; Rose-Sallin *y col.*, 1995).

La detección de los óxidos de colesterol puede llevarse a cabo por cromatografía de gases (GC) (Ahn, Nam, Du y Jo, 2001; García-Regueiro y Maraschiello, 1997; Park y Addis, 1987; Saldanha, Sawaya, Eberlin y Bragagnolo, 2006; Schmarr *y col.*, 1996; Vestergaard y Parolari, 1999) o cromatografía líquida (HPLC) (Baggio y Bragagnolo, 2006; Sampaio, Bastos, Soares, Queiroz y Torres, 2006). Sin embargo, la identificación requiere el uso de un espectrómetro de masas (MS). Dada la posible formación de artefactos originados durante la etapa de purificación y los interferentes derivados de la matriz, la identificación mediante MS evita errores que se pueden producir con otras técnicas (FID o UV). El acoplamiento de un detector selectivo, que suministre información de la estructura molecular, es necesario para una correcta determinación.

### *3.6. Efecto de las altas presiones en la oxidación del colesterol*

El efecto de la AAPH en la oxidación del colesterol ha sido poco estudiado (García-Regueiro, Sárraga, Hortós, Díaz, Valero y Rius, 2002). Aunque dado el posible daño en la membrana celular con la presión (Kato y Hayashi, 1999), esto podría promover la oxidación del colesterol. De acuerdo con Andrés, Möller, Adamsen y Skibsted (2004a), la oxidación en comidas basadas en carne se inicia con la formación de radicales libres, y la tendencia a la formación de radicales libres en relación con los parámetros de procesado deben considerarse para la predicción de la estabilidad oxidativa de los productos. La formación de radicales libres durante la presurización podría afectar al colesterol, más expuesto por la rotura de la membrana. Además, Bragagnolo, Danielsen y Skibsted (2006) observaron que el uso de sal tenía un efecto prooxidante en carne de pollo presurizada. Sugiriendo esto último que el jamón, con una gran cantidad de sal en su composición, podría ser más susceptible a la oxidación.

Andrés, Möller, Adamsen y Skibsted (2004a) midieron la formación de radicales en jamón ibérico curado tras presurizar entre 200 y 800 MPa. Los autores encontraron que presiones bajas (200 MPa) iniciaban la formación de radicales libres, pudiendo promover la peroxidación lipídica. Aunque presiones entre 400 y 600 MPa producían una disminución en el contenido de radicales libres; sugiriendo los autores que estos valores de presión promovían reacciones entre los radicales libres. Sin embargo, a una presión mayor (800 MPa) se produjo un aumento en el contenido de radicales libres, siendo mayor la oxidación que la degradación de los productos de oxidación secundaria (Andrés *y col.*, 2004a).

Como ya se ha comentado anteriormente, la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados también puede promover la oxidación del colesterol. Existe poca

información disponible sobre el efecto de la AAPH en los ácidos grasos de la carne, aunque si se han realizado estudios en pescado, ostras y leche. En ostras la presurización a 500 y 800 MPa no produjo diferencias en la composición de ácidos grasos (Cruz–Romero, Kerry y Kelly, 2008). De manera similar, en leche de cabra, vaca y oveja presiones entre 50 y 350 MPa tampoco produjeron variaciones en la composición de ácidos grasos (Rodríguez–Alcalá, Harte y Fontecha, 2009). En carne de ternera la presurización entre 200 y 400 MPa durante 20 min a 20 y 40 °C tampoco produjo diferencias en la composición de ácidos grasos (McArdle, Marcos, Kerry y Mullen, 2010). La oxidación de los lípidos produce un aumento en la concentración de ácidos grasos libres. Sin embargo, tanto en queso de cabra como en bacalao, presiones del orden de 400 MPa durante 5 o 15 min no produjeron un aumento en ácidos grasos libres, sino que redujeron su concentración, sugiriendo que la AAPH decelera la lipólisis (Ohshima *y col.*, 1993; Saldo, Fernández, Sendra, Butz, Tauscher y Guamis, 2003).

La AAPH puede producir pérdida de la estabilidad oxidativa medida con los índices de TBARS (Beltran *y col.*, 2003; Bragagnolo, Danielsen y Skibsted, 2005; Cheah y Ledward, 1996; Cheah y Ledward, 1997; Dissing *y col.*, 1997; McArdle, Marcos, Ferry y Mullen, 2011; Orliey *y col.*, 2000). Sin embargo, la estabilidad oxidativa medida mediante la concentración de radicales libres o la composición de ácidos grasos hacen suponer que presiones medias, entre 200 y 600 MPa, no suponen un aumento de la oxidación lipídica y por lo tanto tampoco un aumento en la oxidación del colesterol.

En un estudio previo se midieron los óxidos de colesterol tras presurizar jamón curado a 600 MPa durante 10 min a 30 °C (García–Regueiro, Sárraga, Hortós, Díaz, Valero y Rius, 2002). Los autores encontraron que la presión producía una

disminución de óxidos de colesterol, sugiriendo que la extracción de los óxidos de colesterol podía estar influenciada por la presurización.

## 4. Jamón curado



El jamón curado es un producto tradicional español, que por sus singulares cualidades organolépticas y sensoriales es apreciado en todo el mundo. El jamón curado es un alimento obtenido a partir de la salazón y secado al aire de las patas traseras del cerdo blanco. Este mismo producto recibe el nombre de paleta o paletilla cuando se obtiene de las patas delanteras.

El procesado del jamón curado comprende diversas etapas. En la etapa de salado se cubre de sal el jamón, la duración típica es de un día por kg de peso, permaneciendo a una temperatura de entre 1 y 5 °C y humedades relativas en torno al 80–90 %. En esta etapa también se añaden otros aditivos como nitratos y nitritos. En la etapa de post salado, la temperatura se mantiene por debajo de 5 °C durante 1–2 meses, hasta que la actividad de agua se reduce por debajo de 0,96 para prevenir el crecimiento de microorganismos indeseables. Transcurrido este tiempo, normalmente se eleva la temperatura hasta un máximo de 25 °C; esta es la etapa de secado o deshidratación, que dura como mínimo 2 meses, y se desarrolla el flavor típico de este producto. Durante la etapa de maduración, que se realiza con temperaturas entre 12 y 20 °C durante 4–6 meses, tienen lugar las reacciones de proteólisis, lipólisis, oxidación lipídica, reacciones de Maillard y



degradación de Strecker, que juegan un papel muy importante en el desarrollo del color, sabor y olor típicos de este producto (García, Berdagué, Antequera, López-Bote, Córdoba y Ventanas, 1991; Toldrá y Flores, 1998).

España es el primer productor de jamón curado del mundo, con más de 40 millones de jamones por año (2008) (Jimenez-Colmenero, Ventanas y Toldrá, 2010). Otros productores son Italia y Estados Unidos. Se estima que en actualidad el consumo de este producto en nuestro país roza los 3 kg por habitante y año (Gutierrez, 2008).

Los cambios en los hábitos de los consumidores han hecho que la comercialización de jamón curado loncheado y envasado al vacío en el año 2004 representara el 7 % del total de ventas de jamón curado en España (Frigola y Ayuso, 2003). El jamón curado es un alimento de baja acidez, que por su baja actividad de agua, concentración de sal y humedad, puede permanecer largos periodos de tiempo sin ningún tipo de tratamiento. Sin embargo, las operaciones de deshuesado, loncheado y envasado, necesarias para producir jamón curado envasado loncheado, pueden dar lugar a contaminaciones desde la superficie del jamón y del entorno (Garriga *y col.*, 2004). Por ello se torna necesaria la aplicación de tecnologías de conservación para evitar que durante el almacenamiento en refrigeración proliferen los microorganismos.

#### *4.1. Aplicabilidad de las altas presiones en el jamón curado*

El jamón curado no puede tratarse con tratamiento térmico, ya que alteraría tanto sus cualidades organolépticas como su estructura. El jamón curado envasado loncheado es un alimento preparado para tomar. En este ámbito de productos la AAPH ofrece grandes posibilidades como instrumento de descontaminación, ya que altera el sabor y el olor de los alimentos en menor medida que los tratamientos térmicos. Así, la AAPH se perfila como una tecnología capaz de ofrecer alimentos listos para tomar con unas características sensoriales similares a las de los productos frescos. En la actualidad se comercializa jamón curado loncheado empaquetado al vacío, sobre todo en el mercado exterior (Campus, 2010).

Con anterioridad se han realizado diversos estudios sobre la AAPH en jamón curado. Garriga, Grèbol, Aymerich, Monfort y Hugas (2004) observaron que tratando a 600 MPa, 31 °C y durante 6 min jamón curado envasado en lonchas se conseguían disminuir las poblaciones de bacterias totales en al menos 2 Log; manteniendo las poblaciones de microorganismos en valores bajos, alrededor de 3 Log de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de producto, durante el almacenamiento en refrigeración (120 días). Los autores concluyeron que la AAPH en las condiciones estudiadas era un método efectivo para retrasar el crecimiento de microorganismos en este producto.

La presurización (400–600 MPa) durante el procesado del jamón o en el producto final ha dado pocas diferencias en las características de flavor del producto final, con pequeñas variaciones en la textura y en el color (Serra *y col.*, 2007b). En este mismo estudio (Serra *y col.*, 2007a) se observó que la actividad de los enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa) estaba ligeramente disminuida por la AAPH, sugiriendo que la

presurización producía un aumento en la estabilidad oxidativa. El color del jamón curado, un factor importante en la aceptabilidad de los consumidores, de acuerdo con Cheftel y Culioli (1997) es altamente resistente a la decoloración inducida por la presión en carnes. Andrés, Möller, Adamsen y Skibsted (2004a) encontraron que tras presurizar jamón ibérico curado entre 200 y 800 MPa se producía una decoloración. Esta decoloración también se encontró en otros estudios tras presurizar jamón curado entre 400 y 600 MPa, relacionándose el aumento de luminosidad y la disminución del color rojo con las modificaciones de las proteínas inducidas por la presión (Andrés *y col.*, 2006; Saccani, Parolari, Tanzi y Rabbuti, 2004). Sin embargo, en otro estudio presurizando jamón curado envasado loncheado, Cava, Ladero, González, Carrasco y Ramírez (2009) no encontraron pérdidas de color al presurizar entre 200 y 300 MPa durante 15 y 30 min. Serra *y col.* (2007b) achacaron los diferentes efectos de la AAPH en el color del jamón curado a diferencias en la composición inicial de pigmentos del jamón.

El efecto de la presión en la oxidación lipídica ha sido muy variable. Este es un punto de gran importancia ya que esta oxidación contribuye al desarrollo de las características de flavor del jamón curado (Toldrá y Flores, 2006). Andrés, Adamsen, Möller, Ruiz y Skibsted (2006) no observaron ningún aumento en la oxidación lipídica, medida mediante índices de TBARS, tras presurizar jamón ibérico a 400 MPa; sin embargo, tras 40 días de almacenamiento en refrigeración con luz, las muestras tratadas presentaron un mayor nivel de oxidación. Por otra parte, al presurizar entre 200 y 300 MPa durante 15 o 30 min jamón ibérico envasado loncheado se observó un aumento en la oxidación lipídica, pero tras 90 días de almacenamiento en refrigeración no hubo diferencias entre muestras tratadas y no tratadas (Cava *y col.*, 2009). De manera similar, la presurización de jamón envasado loncheado a 400 MPa durante 10 min a 12 °C produjo un ligero

incremento en la fracción volátil derivada de la lipólisis, sugiriendo este resultado que la AAPH tenía poco efecto en la oxidación lipídica (Rivas–Cañedo, Fernández–García y Nuñez, 2009).

La aplicación de altas presiones en el jamón no solo se ha estudiado por su papel descontaminante, sino también como una alternativa para conseguir productos más saludables. Fulladosa, Serra, Gou y Arnau (2009) presurizaron a 600 MPa lonchas de jamón curado procedentes de jamones reestructurados con poco contenido en sal. La presurización provocó un aumento en la percepción de salado, dureza, gomosidad, fibrosidad, luminosidad y de los colores rojo y marrón. A la par que produjo una disminución en la adhesividad, elasticidad y capacidad de retención de agua. A la vista de estos resultados la presurización tiene una influencia en la calidad sensorial del jamón, sin embargo más estudios son necesarios para confirmar el efecto de la AAPH en la modificación de las propiedades sensoriales y en las causas que provocan este efecto.

El efecto de la AAPH en otros productos curados ha sido muy positivo. En cecina, un producto curado proveniente de la ternera, la presurización a 500 MPa durante 5 min no produjo diferencias en los parámetros físico–químicos ni en los sensoriales (Rubio, Martínez, González–Fernández, García–Cachán, Rovira y Jaime, 2006). En lomo ibérico curado, presiones entre 200 y 300 MPa durante 15 o 30 min produjeron una ligera disminución del color rojo, pero tras 90 días de almacenamiento en refrigeración no hubo ningún efecto de la presión en el color; además, la oxidación lipídica, medida con índices de TBARS, se redujo tras la presurización (Cava *y col.*, 2009). En este mismo producto, presiones alrededor de 300 MPa produjeron un ligero aumento en la luminosidad y una pérdida de rojo, pero la estabilidad oxidativa no se vio afectada (Campus, Flores, Martínez y Toldrá, 2008).

## 5. El nabo



El nabo (*Brassica napus* var. *napobrassica*) es una hortaliza perteneciente a la familia de las Crucíferas, que engloba 380 géneros y unas 3.000 especies, son propias de regiones templadas o frías del hemisferio norte (Grubben y Denton, 2004). El nabo es un cruce entre las especies *Brassica oleracea* (calabaza) y *Brassica rapa* (similar al nabo) originarias de la zona este del Mediterráneo y del oeste asiático. Las primeras informaciones de este vegetal datan del siglo XVII, aunque fue durante el siglo XVIII cuando se introdujo en Europa (Grubben y Denton, 2004). La versatilidad del nabo hace que se puedan emplear tanto las raíces, como las semillas o las hojas. De sus semillas se extrae el aceite de colza; en Europa tuvo cierta repercusión como aceite de uso industrial y para iluminación (Grubben y Denton, 2004). Tanto las raíces como las hojas del nabo tienen usos culinarios. En algunas zonas de Europa las raíces del nabo se emplean como acompañamiento en los asados, o como ingrediente en ensaladas en forma asada o cocida. En España las raíces del nabo se emplean como ingrediente para las sopas y sus hojas, conocidas como grelos, son ampliamente consumidas en el noroeste de la península.

\* Extraído de: <http://www.heirloom-organics.com/images/polaroid/nonhybrid-turnip.gif>

El nabo es una hortaliza de escaso aporte calórico, con una abundante cantidad de agua y un bajo contenido de hidratos de carbono. Además, es fuente de vitamina C y folatos, conteniendo cantidades discretas de vitaminas del grupo B (B<sub>6</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>). Es un vegetal rico en potasio, que también contiene calcio, fósforo y yodo (Shibutani y Kinoshita, 1969). El nabo está considerado como una fuente de compuestos que presentan beneficios para la salud, entre ellos los compuestos fenólicos o los glucosinolatos (Paul y Southgate, 1978; Podsedek, 2007).

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios de las plantas, contienen azufre y se biosintetizan a partir de diversos aminoácidos (metionina, alanina, triptófano o tirosina entre otros). Los glucosinolatos forman parte del sistema de protección de las plantas, generando su consumo en el ganado gastroenteritis aguda, salivación e irritación de la boca (Harborne, 1993). Estos compuestos son además responsables del sabor amargo o ácido de la mostaza, de las coles de Bruselas o del brócoli. La hidrólisis de los glucosinolatos por el enzima mirosinasa produce isotiocianatos, nitrilos, epitionitrilos y oxazolidinetionas. Tanto los glucosinolatos como sus productos de hidrólisis poseen actividad biológica (Mithen, 2001). Alguno de estos compuestos pueden tener efecto quimioprotectivo, relacionado con la reducción de la incidencia de ciertos tipos de cáncer en humanos (Fahey, Zalcmann y Talalay, 2001). Sin embargo, otros glucosinolatos como la progoitrina han presentado actividad goitrogénica en animales, aunque no hay evidencias de este efecto en humanos (Mithen, 2001).

Por otro lado, los vegetales de la familia *Brassica* poseen propiedades antioxidantes (Podsedek, 2007). En el nabo se encuentran diversos antioxidantes, como la vitamina C o los compuestos fenólicos; entre estos últimos podemos destacar el ácido sinápico y el ácido vanílico, que son los ácidos fenólicos mayoritarios en el nabo (Mattila, Hellström y Törrönen, 2006).

### 5.1 Aplicabilidad de las altas presiones en el nabo

Una de las posibles aplicaciones de las altas presiones hidrostáticas, como ya se ha visto en el jamón loncheado, se encuentra en la conservación de comida preparada. La aplicación de esta tecnología ha permitido obtener ensaladas de fruta cortada, sin necesidad de añadir conservantes u otras sustancias químicas, y variando la textura, el sabor y el olor en menor medida que con los tratamientos térmicos (Torres y Velazquez, 2005).

El efecto de las altas presiones, por la menor merma que produce en compuestos beneficiosos, como vitaminas y antioxidantes, así como por su mínima modificación de la textura y del flavor, se ha estudiado previamente en hortalizas y frutas (Oey *y col.*, 2008a; Oey *y col.*, 2008b). No se ha podido encontrar bibliografía previa del efecto de la AAPH en nabo, pero sí que hay estudios sobre su aplicación en otros vegetales de la familia de las *Brassica*, como brócoli o *Brassica rapa*. En zumo de brócoli se observó que la AAPH a 500 MPa durante 10 min causaba una pequeña disminución de vitamina C en función de la presión aplicada, sin embargo el contenido en sulfaranos, derivados de los glucosinolatos con actividad antimutagénica, no se veía afectado por la presión, tampoco las cualidades sensoriales del zumo (Houška *y col.*, 2006). En otro estudio se encontró que la presurización de cabezas de brócoli entre 100 y 500 MPa favorecía la puesta en contacto entre los glucosinolatos y el enzima mirosinasa, favoreciendo la producción de isotiocianatos, con propiedades beneficiosas para la salud; además, la presurización limitaba la pérdida que se da en estos compuestos con el tratamiento térmico (Van Eylen, Oey, Hendrickx y Van Loey, 2008). La presurización entre 200 y 600 MPa de *Brassica rapa* produjo el ennegrecimiento del vegetal durante el almacenamiento en refrigeración (una semana) (S. Ueno, Hayashi, Shigematsu, y Fujii, 2009). El efecto de la AAPH en

otro tipo de vegetales ha sido muy diverso, dependiendo mayoritariamente de la matriz de estudio (Oey *y col.*, 2008a; Oey *y col.*, 2008b).









El objetivo general del presente trabajo ha sido investigar el efecto de la presurización como método de conservación en dos alimentos, el jamón y el nabo, focalizando este estudio en su incidencia en los procesos oxidativos y en los compuestos antioxidantes.

### Objetivos específicos.

Para alcanzar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- I. El desarrollo de una metodología para la determinación de purinas y pirimidinas en matrices cárnicas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección por espectrometría de masas.
- II. La optimización de un método para el análisis de los óxidos de colesterol que permitiera una mejor cuantificación de estos compuestos, en especial de los epóxidos y el colestanoetriol, en el jamón curado loncheado.
- III. Investigar el efecto de diferentes presiones (400, 600 y 900 MPa) y condiciones de almacenamiento en la incidencia de procesos oxidativos en el jamón curado loncheado, focalizados sobre todo en la oxidación lipídica.

Estudiar las modificaciones inducidas por la presurización durante las diferentes condiciones de almacenamiento en la calidad sensorial del producto.

- IV. Investigar en el nabo el efecto de diferentes valores de presión/temperatura en el mantenimiento de sus cualidades, aporte de sustancias antioxidantes y de otros compuestos beneficiosos, comparando este efecto con el obtenido mediante el escaldado.

1

## Desarrollo u optimización de metodologías

## ❖ Purinas y pirimidinas:

- 1) Extracción con baño de agua a 100 °C.
- 2) Lavado con disolventes.
- 3) Determinación mediante HPLC–MS.

## ❖ Óxidos de colesterol

- 1) Extracción por Blight and Dyer (1959).
- 2) Purificación con columnas de silica y aminopropil.
- 3) Derivatización.
- 4) Determinación por GC–FID y GC–MS/MS..

2

## Tratamientos, almacenamiento y análisis

## JAMÓN CURADO

Muestras empaquetadas comerciales de jamón curado loncheado (*Biceps femoris*).

Las diferentes presurizaciones se realizaron en diferentes fechas por problemas técnicos. Por ello, para cada nivel de presión se necesitaron diferentes muestras no tratadas o control.

600 MPa  
6 min

- ❖ Tiempo inicial
- ❖ 25 días con luz a 4°C
- ❖ 50 días con luz a 4°C
- ❖ 50 días sin luz a 4°C

- ❖ Color instrumental (CIELAB  $L^*, a^*, b^*$ ). Minolta.
- ❖ Análisis fisicoquímicos: nitritos, nitratos, cloruro sódico, grasa, proteínas y humedad. NIT y otros métodos.
- ❖ Estabilidad oxidativa:
  - **Enzimas antioxidantes:** catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa.
  - **Vitamina E** (no publicado). HPLC con fluorescencia.
  - **Índices de TBARS.** Método inducido.
  - **Ácidos grasos:** fosfolípidos, libres y totales. GC-FID.
- ❖ Análisis microbiológicos: microorganismos totales aerobios y enterobacterias.
- ❖ Microscopía óptica (sólo tiempo inicial).
- ❖ Análisis sensorial:
  - **Apariencia:** intensidad de color, aparición de iridiscencias, brillo, apariencia plástica y cristales blancos.
  - **Textura:** dureza, gomosidad y desmenuzabilidad.
  - **Flavor:** intensidad de olor y salado.
- ❖ Análisis de purinas y pirimidinas (sólo tiempo inicial).
- ❖ Análisis de óxidos de colesterol (sólo tiempo inicial)

400 MPa  
6 min

- ❖ Tiempo inicial
- ❖ 25 días con luz a 4°C
- ❖ 50 días con luz a 4°C
- ❖ 50 días sin luz a 4°C

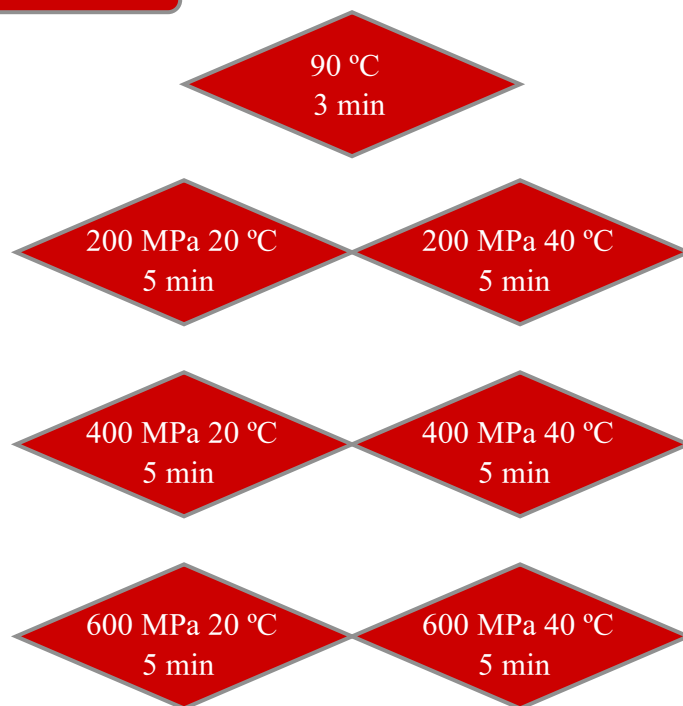
- ❖ Color instrumental (CIELAB  $L^*, a^*, b^*$ , sólo tras 25 y 50 días con luz a 4°C). Minolta.
- ❖ Análisis fisicoquímicos: grasa, proteínas, colágeno y humedad. NIT
- ❖ Análisis microbiológicos: microorganismos totales aerobios y enterobacterias (sólo tras 25 y 50 días con luz a 4°C).
- ❖ Estabilidad oxidativa:
  - **Enzimas antioxidantes:** catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa.
  - **Vitamina E.** HPLC con fluorescencia.
  - **Índices de TBARS.** Método inducido.
- ❖ Análisis sensorial:
  - **Apariencia:** intensidad de color, aparición de iridiscencias, brillo, apariencia plástica y cristales blancos.
  - **Textura:** dureza, gomosidad y desmenuzabilidad.
  - **Flavor:** intensidad de olor y salado.

900 MPa  
6 min

- ❖ Tiempo inicial
- ❖ 25 días con luz a 4°C
- ❖ 50 días con luz a 4°C
- ❖ 50 días sin luz a 4°C

- ❖ Análisis fisicoquímicos: grasa, proteínas, colágeno y humedad. NIT.
- ❖ Estabilidad oxidativa:
  - **Enzimas antioxidantes:** catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa.
  - **Vitamina E.** HPLC con fluorescencia.
  - **Índices de TBARS.** Método inducido.
- ❖ Análisis de purinas y pirimidinas (sólo tiempo inicial).
- ❖ Análisis de óxidos de colesterol (sólo tiempo inicial).

NABO (*Brassica napus*)



- ❖ Color instrumental (CIELAB  $L^*, a^*, b^*$ ). Ultrascan.
- ❖ Textura instrumental:
  - Test de compresión
  - Test de corte
- ❖ Humedad expresable (capacidad de retención de agua).
- ❖ Compuestos antioxidantes:
  - **Ácido ascórbico**. Sólo ácido ascórbico por HPLC–UV.
  - **Contenido fenólico total**. Follin–Ciocalteu.
  - **Capacidad antioxidante (TEAC)**. Ensayo DPPH.
- ❖ Glucosinolatos. Método aproximado por HPLC–IPC.









---

*A* nalysis of seven purines and pyrimidines  
in pork meat products by ultra high performance liquid  
chromatography–tandem mass spectrometry.

Journal of Chromatography A, 1217 (26), 4294–4299.



M. Clariana, M. Gratacós-Cubarsí, M. Hortós, J.A. García-Regueiro, M. Castellari. "Analysis of seven purines and pyrimidines in pork meat products by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry". *Journal of chromatography A*. Vol. 1217, issue 26 (June 2010) : p. 4294-4299  
Copyright © 2010 Elsevier

Received 10 February 2010

Revised 23 March 2010

Accepted 12 April 2010

Available online 18 April 2010

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967310005194>

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.033>

## Abstract

An ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method (UPLC–MS/MS) is proposed for the simultaneous quantification of inosine, adenosine, guanosine, uridine, hypoxanthine, xanthine and uric acid in pork meat, dry-cured and cooked ham. Samples were added with  $^{15}\text{N}_2$ -xanthine (internal standard) and extracted with boiling water for 30 min. Supernatants were washed with hexane, added with formic acid 10% in water, methanol:acetone (1:1, v/v), evaporated to dryness under  $\text{N}_2$ , and finally re-dissolved in water prior to injection. Chromatographic separation was carried out with a HSS T3 column with a total time of analysis of 15 min. Two specific transitions for each compound were used for identification and quantification (with matrix matched calibration curves). Linearity, limit of detection, repeatability and accuracy were evaluated. The method was used to quantify the seven purines and pyrimidines in 15 commercial samples.

## Keywords

Nucleosides; Oxypurines; Uric acid; Pork meat products; Tandem mass spectrometry



---

**C**omparison of the Determination of Eight  
Cholesterol Oxides in Dry-Cured Shoulder by  
GC-FID, GC-MS, and GC Tandem Mass  
Spectrometry.

Food Analytical Methods, doi: 10.1007/s12161-010-9190-0.



M. Clariana, I. Díaz, C. Sárraga and J. A. García-Regueiro. "Comparison of the Determination of Eight Cholesterol Oxides in Dry-Cured Shoulder by GC-FID, GC-MS, and GC Tandem Mass Spectrometry". *Food analytical method*. Vol. 4, number 4 (December 2011) : p. 465-474  
Copyright © 2010, Springer Science+Business Media, LLC

<http://www.springerlink.com/content/aw45316t616918j1/>

<http://dx.doi.org/10.1007/s12161-010-9190-0>

## **Abstract**

The analysis of eight cholesterol oxidation products: 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol,  $\alpha$ -epoxycholesterol,  $\beta$ -epoxycholesterol, 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol, cholestanetriol, 25-hydroxycholesterol, and 7-ketcholesterol in dry-cured shoulder was carried out. The extraction of lipids was performed by using the Bligh and Dyer method (1959). Interferences were removed by solid-phase extraction (SPE) in two steps with silica and aminopropylsilica SPE columns. The separation of the eight cholesterol oxidation products was done by gas chromatography, and the detection was performed by flame ionization detection (FID) and mass spectrometry (MS). The results obtained from the use of both systems of detection were compared. The results showed that gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was the most suitable technique to obtain reliable quantitative data, and significant differences ( $p < 0.05$ ) between FID and MS determining 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol, and 25-hydroxycholesterol were observed. For the determination of cholesterol oxidation products, it was necessary to apply gas chromatography-tandem mass spectrometry to increase the sensitivity and to avoid interference from other compounds.

## **Keywords**

Cholesterol oxides – GC-FID – GC-MS – GC-MS/MS – Dry-cured shoulder



## Comparison of the Determination of Eight Cholesterol Oxides in Dry-Cured Shoulder by GC-FID, GC-MS, and GC Tandem Mass Spectrometry

Maria Clariana · Isabel Díaz · Carmen Sárraga ·  
Jose A. García-Regueiro

Received: 18 November 2010 / Accepted: 14 December 2010  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** The analysis of eight cholesterol oxidation products: 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol,  $\alpha$ -epoxycholesterol,  $\beta$ -epoxycholesterol, 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol, cholestanetriol, 25-hydroxycholesterol, and 7-ketocholesterol in dry-cured shoulder was carried out. The extraction of lipids was performed by using the Bligh and Dyer method (1959). Interferences were removed by solid-phase extraction (SPE) in two steps with silica and aminopropylsilica SPE columns. The separation of the eight cholesterol oxidation products was done by gas chromatography, and the detection was performed by flame ionization detection (FID) and mass spectrometry (MS). The results obtained from the use of both systems of detection were compared. The results showed that gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was the most suitable technique to obtain reliable quantitative data, and significant differences ( $p < 0.05$ ) between FID and MS determining 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol, and 25-hydroxycholesterol were observed. For the determination of cholesterol oxidation products, it was necessary to apply gas chromatography-tandem mass spectrometry to increase the sensitivity and to avoid interference from other compounds.

**Keywords** Cholesterol oxides · GC-FID · GC-MS · GC-MS/MS · Dry-cured shoulder

M. Clariana · I. Díaz · C. Sárraga · J. A. García-Regueiro (✉)  
IRTA-Food Technology,  
Finca Camps i Armet s/n,  
17121 Monells, Spain  
e-mail: joseantonio.garcia@irta.es

### Introduction

The oxidation of cholesterol in food produces cholesterol oxidation products (COPs), which have been studied as a result of their implication in human health because of the relationship with atherosclerotic plaque formation (Leonarduzzi et al. 2002) or their potential carcinogenic properties (Sevanian and Peterson 1986). The mechanism of COPs action seems to be related with the replacing of cholesterol molecules in membranes, perturbing permeability, stability, and other membrane properties (Guardiola et al. 1996). Cholesterol oxidation can be influenced by several factors such as fat composition, since high percentages of polyunsaturated fatty acids can enhance the production of COPs (Leonarduzzi et al. 2002); or processing conditions such as heat (Leonarduzzi et al. 2002), the presence of pro-oxidant substances (Leonarduzzi et al. 2002), irradiation (Boselli et al. 2005), or the storage conditions (Leonarduzzi et al. 2002).

The analysis of COPs in food has been reported in different kinds of foods (Schmarr et al. 1996; Novelli et al. 1998; García-Regueiro and Maraschiello 1997; Careri et al. 1998; Saldanha et al. 2006); however, only a limited number of COPs are determined because of the difficulties in quantifying specific COPs due to low concentrations or by the mass spectrometry conditions applied (McCluskey and Devery 1993). According to Schmarr et al. (1996), to achieve a suitable quantification, it is important to consider some aspects such as concentration of COPs in samples and their polarity because COPs have a range from medium to high polarity. Analysis of COPs has been carried out either by liquid chromatography (HPLC; Baggio and Bragagnolo



---

*I*nfluence of high pressure application on the nutritional, sensory and microbiological characteristics of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. Effects along the storage period.

Innovative Food Science and Emerging Technologies,

doi: 10.1016/j.ifset.2010.12.008.



M. Clariana, L. Guerrero, C. Sárraga, I. Díaz, A. Valero, José A. García-Regueiro. "Influence of high pressure application on the nutritional, sensory and microbiological characteristics of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. Effects along the storage period". *Innovative food science and emergint technologies*. Vol. 12, issue 4 (October 2011) : p. 456-465  
Copyright © 2011, Elsevier

Received 28 October 2010

Accepted 25 December 2010

Available online 3 January 2011

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856410001153>

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2010.12.008>

## **Abstract**

The effect of high pressure processing at 600 MPa on sliced and vacuum packaged commercial dry-cured ham was determined by analyzing the induced color changes, the physicochemical characteristics, the microbiological count and the changes in sensory attributes and also its effect on lipid oxidation measured through TBARS (thiobarbituric reactive substances), antioxidant enzyme activities and the content of fatty acid from total, free and phospholipid fractions. This effect was also studied during 50 days refrigerated storage with different light conditions. The high pressure processing at 600 MPa modified the color of dry-cured ham producing an increase in lightness L\*-parameter. Many sensory attributes were also modified resulting in an increase in hardness, chewiness, brightness, odor intensity and saltiness, while reducing color intensity. High pressure produced a reduction in the aerobic count. The oxidative stability of the pressurized dry-cured ham was not altered as observed from the absence of differences in fatty acid contents and antioxidant enzyme activities. Initially pressurization produced a decrease in TBARS levels, however this effect was not found after 50 days of refrigerated storage.

## **Industrial relevance**

The application of high hydrostatic pressure (HHP) in food technology is a useful tool to combine a minimal processing that increases the shelf-life of the food products, maintaining their safety and nutritional properties and with minimal changes in flavor or taste. This processing technology is very important to increase the safety of the sliced foods which are prone to the microbiological deterioration, as cured meat products and cooked ham. Pressurization of sliced dry-cured ham at 600 MPa has been shown effective reducing spoilage associated microorganisms. The present study was carried out to evaluate the oxidative stability, nutritional quality, safety and sensory attributes of dry-cured ham pressurized at 600 MPa. This is very important because the hypothesis that HHP does not affect to sensorial characteristics needs to be confirmed in different kind of foods. Also, the possible causes of the observed effects should be explained by the study of physic-chemical parameters. In this way the oxidative stability is an important issue because some authors claimed that HHP can increase oxidation in food containing lipids.

## **Research Highlights**

▶ Pressurization of dry-cured ham at 600 MPa did not increase lipid oxidation. ▶ Fatty acid contents and antioxidant enzyme activities were not changed. ▶ TBARS levels were decreased at initial storage time with HPP at 600 MPa. ▶ HPP at 600 MPa induced changes in the color, texture and flavor of dry-cured ham. ▶ The light storage for 50 days reduced phospholipids and increased free fatty acids.

## **Keywords**

High pressure processing; Dry-cured ham; Oxidative stability; Fatty acids; Sensory analysis



— *E*ffects of high pressure application (400 and 900 MPa) and refrigerated storage time on the oxidative stability of sliced skin vacuum packed dry-cured ham.

Meat Science, doi: 10.1016/j.meatsci.2011.07.18.



M. Clariana, L. Guerrero, C. Sárraga, J. A. Garcia-Regueiro. "Effects of high pressure application (400 and 900 MPa) and refrigerated storage time on the oxidative stability of sliced skin vacuum packed dry-cured ham". *Meat science*. Vol. 90, issue 2 (February 2012) : p. 323-329

Copyright © 2012, Elsevier

Received 15 February 2011

Revised 19 July 2011

Accepted 24 July 2011

Available online 28 July 2011

<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.07.018>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174011002683>

## Abstract

The effect of high pressure processing at 400 MPa and 900 MPa on the oxidative stability of sliced and vacuum packaged commercial dry-cured ham was determined by analyzing the antioxidant enzyme activities, TBARS levels (thiobarbituric acid reactive substances), vitamin E content and physicochemical characteristics during refrigerated storage for 50 days in different light conditions. In dry-cured ham pressurized at 400 MPa color changes and sensory analyses were also assessed. The high pressure process at 900 MPa produced a decrease in superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSHPx) activities and increased vitamin E content. In contrast, pressurization at 400 MPa, increased SOD activity, and showed no effect on vitamin E content and GSHPx activity. In general the physicochemical parameters determined (fat, moisture and collagen) were unaffected by pressurization. Treatment at 400 MPa increased the instrumental color measurement of lightness ( $L^*$  values, CIELAB). This level of pressure also modified the hardness, chewiness, saltiness and color intensity. These changes of the sensory attributes in dry-cured ham were significant, but small.

## Highlights

► Pressurization at 900 MPa decreased the activity of some antioxidant enzymes. ► Vitamin E content was increased with pressurization at 900 MPa. ► Pressurization at 400 and 900 MPa had not effect on physicochemical parameters. ► Pressurization at 400 modified the dry-cured ham sensory attributes.

## Keywords

High pressure processing; Dry-cured ham; Physicochemical parameters; Oxidative stability; Sensory analysis





---

*H*igh pressure processing of swede (*Brassica napus*): Impact on quality properties.

Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12, 85–92.



M. Clariana, J. Valverde, H. Wijngaard, A.M. Mullen, B. Marcos. "High pressure processing of swede (*Brassica napus*): Impact on quality properties". *Innovative food science & emerging technologies*. Vol. 12, issue 2 (April 2011) : p. 85-92  
Copyright © 2011 Elsevier

Received 10 August 2010

Accepted 30 January 2011

Available online 4 February 2011

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2011.01.011>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856411000142>

## Abstract

The effects of combined pressure/temperature treatments (200, 400 and 600 MPa, at 20 and 40 °C) on the physical and nutritional properties of swede roots (*Brassica napus* var. *napobrassica*) were assessed. Changes induced by high pressure processing (HPP) on the original properties of swede samples were compared with those produced by thermal treatment (blanching). All studied treatments altered the physical properties of swede, resulting in a loss of hardness and water binding capacity. The strongest alteration of texture was observed after HPP at 400 MPa, while 600 MPa was the treatment that better preserved the texture properties of swede. Blanching caused less total colour changes ( $\Delta E$ ) than HPP. Antioxidant properties of swede were measured as total antioxidant capacity, ascorbic acid and total phenol content. All treatments caused a loss of antioxidant capacity, which was less pronounced after HPP at 600 MPa and 20 °C and blanching. Four glucosinolates were detected in swede roots, glucoraphanin, progoitrin, glucobrassicinapin and glucobrassicin. Glucobrassicinapin and glucobrassicin contents were reduced with all studied treatments. Progoitrin content was not affected by blanching and HPP at 200 MPa. HPP at higher pressure levels (400 and 600 MPa), though, induced an increase of progoitrin levels. The results indicated that blanching and HPP at 600 MPa and 20 °C were the treatments that better preserved the original quality properties of swede.

**Industrial relevance:** Development of mild processing technologies that minimally affect the sensory and texture of products is a challenge for the food industry. The present work has studied the effects of combined pressure–temperature treatments on the colour, texture, antioxidant activity and glucosinolate profile of fresh-cut swede (*Brassica napus*) as an alternative to traditional blanching techniques.

**Research Highlights:** Pressurisation of swede at 600 MPa produced the lowest loss of original texture. Pressurisation produced a higher colour change than mild heat treatment in swede. Pressurisation at 600 MPa/20 °C produced the lowest loss of antioxidant properties. The glucosinolate content varied in function of treatment and glucosinolate studied.

## Keywords

- High pressure processing; Swede; Texture; Antioxidants; Glucosinolates



---

**E**ffect of High Pressure Processing on the  
level of some purines and pyrimidines nucleosides and  
bases in dry cured and cooked ham.

Meat Science, doi: 10.1016/j.meatsci.2011.01.031.



M. Clariana, M. Hortós, J.A. García-Regueiro, M. Castellari. "Effect of high pressure processing on the level of some purines and pyrimidines nucleosides and bases in dry cured and cooked ham". *Meat science*. Vol. 89, issue 4 (December 2011) : p. 533-535  
Copyright © 2011, Elsevier

Received 19 November 2010

Revised 18 January 2011

Accepted 28 January 2011

Available online 4 February 2011.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.031>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174011000441>

## **Abstract**

The effect of high pressure (at 600 and 900 MPa) on the levels of purines and pyrimidines was evaluated in dry-cured and cooked ham. Pressurization of dry-cured ham did not modify purines and pyrimidines contents. On the contrary, treatment at 600 MPa and 900 MPa caused a decrease in guanosine and an increase in adenosine respectively.

## **Keywords**

Purines; Pyrimidines; High pressure process; Pork meat products





---

Effect of High Pressure Processing on  
cholesterol oxidation products in vacuum packaged  
sliced dry-cured ham.

Food and Chemical Toxicology, 49, 1468–1471.





M. Clariana, J. A. García-Regueiro. "Effect of high pressure processing on cholesterol oxidation products in vacuum packaged sliced dry-cured ham". *Food and chemical toxicology*. Vol. 49, issue 6 (june 2011) : p. 1468-1471  
Copyright © 2011, Elsevier

Received 1 February 2011

Accepted 16 March 2011

Available online 21 March 2011

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691511000962>

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.027>

### **Abstract**

The effect of high pressure processing (at 600 and 900 MPa) on cholesterol oxidation products has been studied in vacuum packaged sliced dry-cured ham. Pressurisation of dry-cured ham at 600 MPa did not show changes in the contents of cholesterol oxidation products. However, the effect of pressurisation at 900 MPa produced a significant increase in the contents of 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol,  $\beta$ -epoxycholesterol,  $\alpha$ -epoxycholesterol, 25-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol. In view of the results, at the pressure of 900 MPa, a strong damage of membrane could be produced and the potential production of harmful compounds in dry-cured ham as it was observed for cholesterol oxidation products.

### **Highlights**

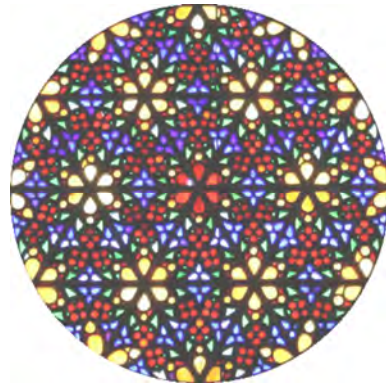
► Pressurisation at 600 MPa did not increase cholesterol oxidation products content. ► Pressurisation at 900 MPa increased mainly all cholesterol oxidation products. ► The effect of 900 MPa was similar to that produced when heating meat. ► The content of 7-ketocholesterol was a good indicator of cholesterol oxidation.

### **Keywords**

Oxidation; Cholesterol oxidation products; High pressure process; Dry-cured ham







La finalidad del presente trabajo ha sido estudiar el efecto de la aplicación de altas presiones en los fenómenos oxidativos o en aquellos relacionados con la vida útil de dos tipos de alimentos: el nabo y el jamón curado loncheado. Los óxidos de colesterol y las purinas y pirimidinas fueron algunos de los compuestos escogidos por sus implicaciones en la seguridad de los alimentos y en las rutas de oxidación. Para poder obtener datos fiables se desarrollaron y optimizaron los métodos de análisis de estos compuestos. En la primera parte de esta discusión se exponen y discuten brevemente estas metodologías. También se examinan los resultados obtenidos en su aplicación en alimentos. En la segunda parte se aborda el efecto de la aplicación de diferentes valores de presión en dos alimentos de diferente naturaleza, el nabo y el jamón curado. La elección de dos alimentos de tan diferente composición se hizo, entre otras cosas, con el fin de obtener una visión global del efecto de la presurización. En esta parte de la discusión se compara el efecto de diferentes valores de presión en la textura, color, compuestos con actividad antioxidante y estabilidad oxidativa de los dos alimentos estudiados.

# 1. Desarrollo de nuevos métodos de análisis

## 1.1. Análisis de purinas y pirimidinas

La determinación de estos compuestos no había podido ser resuelta de modo satisfactorio tanto desde el punto de vista de su extracción como de la separación efectiva de algunos compuestos, como la hipoxantina, xantina y ácido úrico. El empleo de la espectrometría de masas fue una aproximación para resolver esta dificultad, con ella se consigue una separación adicional en base a los iones de diferente masa ( $m/z$ ) que permite solucionar solapamientos producidos en la separación cromatográfica. Además, la obtención del ión de masa molecular junto con iones específicos de fragmentación facilita su identificación.

El proceso de extracción se optimizó para obtener recuperaciones superiores al 80 % y evitar la degradación de los compuestos de estudio. Las purinas y pirimidinas se encuentran en la fase hidrosoluble, para extraerlas fue necesaria la eliminación de otros interferentes, como las proteínas. En anteriores trabajos se habían empleado para su extracción soluciones ácidas o agua, tanto con altas temperaturas como a temperatura ambiente (Cheng *y col.*, 2004; Cooper,

Khosravan, Erdmann, Fiene y Lee, 2006; Fan *y col.*, 2006; Liu, Lin, Yan, Chen, Hoidal y Xu, 2003; Lou, 1998; Lou *y col.*, 2005; Mateo, Dominguez, Aguirrezabal, y Zumalacarregui, 1996; Piñeiro–Sotelo, de Quiros, Lopez–Hernandez y Simal–Lozano, 2002; Tikk *y col.*, 2006). Partiendo de estos trabajos se ensayó la recuperación de purinas y pirimidinas con dos tipos de extracciones: la hidrólisis ácida y la extracción con agua a altas temperaturas (100 °C). Las recuperaciones obtenidas con la hidrólisis ácida fueron menores del 10 % en cuatro de los siete compuestos estudiados, inosina, guanosina, adenosina y ácido úrico, relacionadas tanto con la degradación de algunos nucleósidos a sus bases purínicas (Fan *y col.*, 2007; Lim, Huang, Jenner, Wang, Tang y Halliwell, 2006), como con la escasa solubilidad del ácido úrico a pH bajo (Coolen, Arts, Swennen, Bast, Stuart y Dagnelie, 2008). Las recuperaciones obtenidas con el empleo de agua y altas temperaturas fueron superiores al 83 % para todos los compuestos de estudio, confirmando la ausencia de degradación de nucleósidos a bases. Esta extracción había sido empleada previamente para el análisis de ácido úrico y xantina en plasma (Liu, Lin, Yan, Chen, Hoidal y Xu, 2003), así que se modificó para adaptarla al análisis de purinas y pirimidinas en productos cárnico. La baja solubilidad de la hipoxantina, xantina, ácido úrico y guanosina (Tabla 2), que era aun menor en disoluciones ácidas, hizo necesario el control del pH de los extractos, ya que las recuperaciones iniciales variaban en función del pH de la muestra de estudio. Es por este motivo que adicionamos ácido fórmico, en un intento de obtener un pH homogéneo en los diferentes extractos (Pub. 1, sec. 2.3).

No fue posible conseguir el objetivo de obtener un método sin el empleo de disolventes orgánicos. Al inyectar el extracto acuoso en el sistema de cromatografía líquida de alta resolución, UPLC, se producía un aumento de presión, lo que obligó a mejorar la purificación del extracto mediante lavados

con disolventes para eliminar los componentes más apolares procedentes de la matriz.

**Tabla 2.** Propiedades de algunas purinas y pirimidinas.

	Solubilidad en agua (M)	Punto fusión, °C	Peso molecular
Ácido úrico	0,0004	>300	168,11
Hipoxantina	0,0005	>300	152,11
Xantina	0,005	>300	136,11
Uridina	0,7	163–167	244,2
Adenosina	0,03	234–236	267,24
Inosina	0,5	222–226	268,23
Guanosina	0,003	250	283,24

Extraído de <http://www.sigmaaldrich.com>, <http://www.drugbank.com> y The Merck Index, Susan Budavari, Ed. Merck & Co. 1996.

En un principio, el análisis de purinas y pirimidinas se realizó por UPLC con detección UV–DAD. Sin embargo, este tipo de detección no permitió la detección y la identificación de los compuestos debido a las interferencias producidas por la matriz. Además, tanto la coelución de los picos cromatográficos pertenecientes al ácido úrico e hipoxantina, como los diferentes intervalos de concentraciones de los compuestos en las muestras, no permitió una correcta cuantificación (Pub. 1, Fig. 2). La aplicación de la espectrometría de masas (MS) permitió la determinación simultánea de la pirimidina uridina y de las purinas adenosina, guanosina, inosina, xantina, hipoxantina y ácido úrico. De esta manera, se obtuvo por primera vez la determinación simultánea de estos compuestos sin solapamiento en productos cárnicos, así como la posibilidad de aplicar el procedimiento a otros alimentos o muestras.

Gracias tanto al uso de la espectrometría de masas como a la extracción con agua a pH neutro, la presente metodología puede seguir desarrollándose para otros compuestos implicados en el metabolismo del ATP. Este método fue validado para la cuantificación de purinas y pirimidinas en diferentes matrices alimentarias como carne magra y jamón cocido y curado. La repetibilidad



intradía en el análisis de purinas y pirimidinas de las muestras de estudio fue menor o igual al 8 % y la interdías menor del 12 % (Pub. 1, Tabla 2). La recuperación estuvo influenciada tanto por el analito de estudio como por la matriz empleada, pero se obtuvieron recuperaciones mayores del 70 % en todos los casos. También se realizaron pruebas preliminares en pescado, dando resultados muy satisfactorios y abriendo nuevas posibilidades en este tipo de matriz, donde los compuestos derivados del metabolismo del ATP son utilizados como índice de frescura (Saito, Arai y Matsuyoshi, 1959).

**Tabla 3.** Concentraciones de purinas y pirimidinas en muestras comerciales (expresado en  $\mu\text{g/g}$  peso seco).

	Carne magra de cerdo			Jamón curado			Jamón cocido		
	Máx	Mín	Promedio <sup>1</sup>	Máx	Mín	Promedio <sup>1</sup>	Máx	Mín	Promedio <sup>1</sup>
Ácido úrico	0,9	< LC <sup>2</sup>	< LC <sup>b</sup>	6,1	0,7	3,0 <sup>ab</sup>	29,8	< LC	8,4 <sup>a</sup>
Hipoxantina	1013,3	510,7	958,7 <sup>c</sup>	4782,3	2900,7	4090,4 <sup>a</sup>	3099,0	2104,2	2524,6 <sup>b</sup>
Xantina	1,2	0,3	0,7 <sup>b</sup>	76,1	19,8	37,3 <sup>a</sup>	37,9	0,2	11,5 <sup>b</sup>
Uridina	76,7	34,5	68,6 <sup>c</sup>	314,2	190,5	266,2 <sup>a</sup>	132,4	85,6	113,7 <sup>b</sup>
Adenosina	3,5	2,0	2,7 <sup>b</sup>	23,0	3,0	7,7 <sup>b</sup>	160,2	42,5	87,1 <sup>a</sup>
Inosina	1846,2	1295,6	1748,6 <sup>b</sup>	1807,0	1013,0	1347,6 <sup>c</sup>	3039,0	1685,1	2296,5 <sup>a</sup>
Guanosina	30,7	16,5	29,4 <sup>b</sup>	122,0	68,1	90,6 <sup>a</sup>	127,8	48,7	84,8 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>: Se analizaron cinco muestras por triplicado para cada tipo de producto.

<sup>2</sup>: Menor que el límite de cuantificación (LC); LC = 3\*LOD.

<sup>abc</sup>: Las diferentes letras en una misma fila indican diferencias entre las medias a  $p < 0.05$

Al analizar el contenido de purinas y pirimidinas en diferentes productos derivados del cerdo se encontró que los compuestos mayoritarios eran inosina e hipoxantina (Tabla 3). En carne magra la concentración de inosina fue superior a la de hipoxantina, mientras en jamón curado el orden fue inverso. El jamón curado también presentó mayores concentraciones de guanosina, uridina y xantina. Esto indica que durante el proceso de curado se degradan por acción de enzimas endógenas tanto los nucleótidos como los nucleósidos (Dierick, Vandekerckhove y Demeyer, 1974; Watanabe, Tsuneishi y Takimoto, 1989), y esta degradación se ha relacionado con el desarrollo del sabor típico de la carne (Spurvey, Pan y Shahidi, 1998).

En el jamón cocido, a diferencia del jamón curado, las concentraciones de inosina e hipoxantina fueron similares (Tabla 3). En un estudio anterior también se encontraron concentraciones similares de inosina e hipoxantina al calentar carne de ternera a 95 °C (Cambero *y col.*, 2000).

## 1.2. Análisis de óxidos de colesterol

El análisis de los óxidos de colesterol en alimentos normalmente requiere de una metodología larga y laboriosa y de grandes volúmenes de disolventes (García-Regueiro y Maraschiello, 1997; Guardiola *y col.*, 1995; Lai, Gray y Zabik, 1995; Petron *y col.*, 2003). En el presente trabajo, en base a anteriores metodologías (García-Regueiro y Maraschiello, 1997; Petron *y col.*, 2003; Ulberth y Rossler, 1998) se optimizó este proceso con el fin de aumentar tanto su sensibilidad como su selectividad. Se partió de una mayor cantidad de grasa intramuscular, 50 mg en vez de 10 mg (Petron *y col.*, 2003), y se ajustó el volumen de disolvente empleado. La extracción de la grasa se realizó por el método de Blight y Dyer (1959) con algunas modificaciones, empleando un total de 10 ml de cloroformo y 4 ml de metanol por muestra, con un coeficiente de variación siempre menor del 9 %. El proceso de purificación también requirió optimizar el volumen de disolventes.

Finalmente, partiendo de una cantidad de grasa cinco veces mayor que la empleada anteriormente, los volúmenes de disolventes para la extracción y purificación sólo se incrementaron en un factor de dos (Petron *y col.*, 2003). Al partir de una mayor cantidad de muestra inicial, se pudieron determinar los óxidos de colesterol 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol y colestanoetriol, los cuales apenas se habían podido determinar previamente por su baja concentración en las muestras (Petron *y col.*, 2003).

En una primera fase, la determinación de los óxidos de colesterol se realizó mediante cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID). Esta técnica había sido ampliamente utilizada anteriormente para el análisis de óxidos de colesterol (Ahn *y col.*, 2001; Careri, Mangia, Musci y Parolari, 1998; García-Regueiro y Maraschiello, 1997; Monahan *y col.*, 1992;

Vestergaard y Parolari, 1999). Sin embargo, los límites de detección obtenidos (Pub. 2, Tabla 2) eran superiores a los valores en que algunos óxidos de colesterol se encontraban en el jamón curado (Petron *y col.*, 2003; Vestergaard y Parolari, 1999). Además, ante la imposibilidad de obtener una correcta cuantificación de los óxidos de colesterol  $7\alpha$ -hidroxicolesterol y  $25$ -hidroxicolesterol, debido a los interferentes de la matriz, realizamos una segunda determinación mediante espectrometría de masas (MS).

El espectrómetro de masas se utilizó en modo "SCAN" para los compuestos que estaban presentes en mayor concentración ( $7\alpha$ -hidroxicolesterol,  $7\beta$ -hidroxicolesterol,  $25$ -hidroxicolesterol y  $7$ -cetocholesterol). La determinación de los compuestos que se hallaban en menor concentración ( $\alpha$ -epoxicolesterol,  $\beta$ -epoxicolesterol,  $20$ -hidroxicolesterol y colestanoetriol) se realizó con espectrometría de masas en tandem (MS/MS) en modo SIM (monitorización de iones seleccionados)/SCAN. Como puede observarse en la Tabla 4 (Pub. 2), el empleo del espectrómetro de masas permitió cuantificar el  $25$ -hydroxycholesterol y reducir los límites de detección de los óxidos de colesterol que se encontraban en menor concentración, como mínimo en un factor de diez. La repetibilidad, tanto intradía como interdías se redujo, y las recuperaciones obtenidas fueron superiores al 90 % para todos los óxidos de colesterol. Además, al comparar la detección FID y MS se comprobó que los óxidos de colesterol  $7\alpha$ -hidroxicolesterol y  $20\alpha$ -hidroxicolesterol no se habían cuantificado correctamente mediante FID debido a los interferentes derivados de la matriz (Pub. 2, Tabla 3).

La optimización metodológica junto con la detección GC-MS, MS/MS permitió determinar simultáneamente los ocho óxidos de colesterol,  $7\alpha$ -hidroxicolesterol,  $7\beta$ -hidroxicolesterol,  $\alpha$ -epoxicolesterol,  $\beta$ -epoxicolesterol,  $20$ -hidroxicolesterol, colestanoetriol,  $25$ -hidroxicolesterol y  $7$ -cetocholesterol en

paletilla curada (Ahn *y col.*, 2001; Monahan *y col.*, 1992; Petron *y col.*, 2003; Schmarr *y col.*, 1996; Vestergaard y Parolari, 1999; Zanardi *y col.*, 2000).

La determinación de óxidos de colesterol en paletilla curada dio resultados similares a los descritos con anterioridad en jamón curado, aunque algo inferiores (Petron *y col.*, 2003; Vestergaard y Parolari, 1999). Esta diferencia pudo deberse a que el producto analizado era diferente, tanto en composición como en el tratamiento tecnológico (tiempo de curado, cantidad de sal, etc.). La correcta cuantificación de los óxidos de colesterol en diferentes productos alimentarios, aun siendo algunos de ellos compuestos muy minoritarios, posee relevancia por su posible toxicidad.

Tanto para los óxidos de colesterol como para las purinas y pirimidinas, el empleo de la espectrometría de masas permitió la determinación de estos compuestos en matrices complejas. La MS, en el modo de selección de iones, permitió reducir las etapas de purificación, reduciéndose así los tiempos de análisis y los volúmenes de disolventes empleados. Este es un factor importante al trabajar con matrices alimentarias, donde la heterogénea composición puede dificultar los análisis. Además, la MS permitió determinar simultáneamente compuestos presentes a diferentes concentraciones en los alimentos.

## 2. Aplicación de altas presiones en alimentos

La presurización mostró un efecto diferente en función del alimento de estudio. En el nabo, los resultados de textura instrumental mostraron que todas las condiciones de presión y temperatura producían ablandamiento, también se apreció un incremento en la elasticidad del vegetal con presiones hasta 400 MPa (Tabla 4). Por el contrario, en el jamón curado el análisis sensorial reportó un incremento en la dureza y la gomosidad con la presurización. Fulladosa, Serra, Gou y Arnau (2009) en jamón curado presurizado a 600 MPa relacionaron los resultados de la textura instrumental con los obtenidos mediante análisis sensorial, siendo el incremento en dureza y gomosidad obtenido en el análisis sensorial equivalente al incremento en dureza y elasticidad instrumental. En los alimentos estudiados, la presión comprime las células del tejido (Hartmann y Delgado, 2004), produciendo desorganización celular. Sin embargo, la diferente composición, gran contenido en agua e hidratos de carbono en el nabo y poco contenido en agua y gran porcentaje de proteínas en el jamón curado, contribuyeron a que para una misma acción, el resultado fuera totalmente diferente.

**Tabla 4.** Efecto de los diferentes valores de presión en la textura instrumental del nabo y en la textura sensorial del jamón curado loncheado.

		NT		200 MPa		400 MPa		600 MPa	
		400	600	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C
Nabo	Dureza <sup>(1)</sup>	246,0 <sup>a</sup>		100,4 <sup>cd</sup>	113,8 <sup>b</sup>	64,3 <sup>f</sup>	82,1 <sup>e</sup>	98,3 <sup>cd</sup>	108,3 <sup>bc</sup>
	Elasticidad	50,8 <sup>b(2)</sup>		38,8 <sup>cd</sup>	30,2 <sup>e</sup>	70,9 <sup>a</sup>	65,9 <sup>a</sup>	46,0 <sup>bc</sup>	46,4 <sup>b</sup>
		4,6 <sup>cd(3)</sup>		5,1 <sup>bc</sup>	5,6 <sup>ab</sup>	6,0 <sup>a</sup>	5,7 <sup>a</sup>	5,0 <sup>c</sup>	5,1 <sup>bc</sup>
Jamón	Dureza <sup>(4)</sup>	4,3 <sup>b(6)</sup>	4,2 <sup>b(7)</sup>			5,0 <sup>a(1)</sup>		5,5 <sup>a(2)</sup>	
	Elasticidad <sup>(5)</sup>	2,8 <sup>b</sup>	2,3 <sup>b</sup>			3,8 <sup>a</sup>		3,6 <sup>a</sup>	

<sup>(1)</sup> Datos de la fuerza de compresión del nabo, N. Pub. 5, Fig.1.

<sup>(2)</sup> Datos de la fuerza de corte del nabo, N. Pub. 5, Fig.2.

<sup>(3)</sup> Datos de la distancia de corte del nabo, mm. Pub. 5, Fig.2.

<sup>(4)</sup> Datos de dureza del análisis sensorial del jamón curado. Pub. 4, Tabla 5 y Pub. 3, Tabla 7.

<sup>(5)</sup> Datos de gomosidad del análisis sensorial del jamón curado. Pub. 4, Tabla 5 y Pub. 3, Tabla 7.

abc: Las diferentes letras en una misma fila indican diferencias entre las medias a  $p < 0.05$ . En el jamón, la comparación se realiza entre:

<sup>(6)</sup> NT400 y presurizado a 400 MPa tras 50 días de almacenamiento con o sin luz.

<sup>(7)</sup> NT600 y presurizado a 600 MPa tras 50 días de almacenamiento con o sin luz.

Tanto en el jamón presurizado entre 400 y 600 MPa, como en el nabo presurizado entre 200 y 400 MPa, el aumento de la presión supuso una modificación mayor de la textura original. Sin embargo, en el nabo la presurización a 600 MPa afectó la textura en menor medida que la presurización a 400 MPa (Tabla 4). Se ha comentado previamente (Pub. 5, sec. 3.1) que la desactivación del enzima poligalacturonasa a 600 MPa podría ser la responsable de esta recuperación de la textura. Aunque también podría relacionarse con el incremento de los iones  $H^+$  y  $OH^-$  del agua que produce la presurización, dando lugar a una reorganización para ocupar un menor volumen (Cheftel y Culioli, 1997). Las pectinas son un componente de la pared celular de los vegetales. La demetilación de las pectinas por el enzima pectina metilesterasa, PME, produce pectinas ácidas y metanol. Estas pectinas se podrían reagrupar de una manera más compacta a 600 MPa que a 400 MPa, por la separación de cargas que produce la presurización (Cheftel y Culioli, 1997), produciendo una textura más dura y menos elástica que con otros valores de presión (Tabla 4). Araya *y col.*

(2007) observaron por microscopía electrónica que al cortar zanahoria presurizada a 550 MPa se producía la rotura del tejido intercelular, mientras que en el caso del vegetal crudo la rotura era intracelular. Este aumento de las fuerzas de unión intracelular y el debilitamiento de las uniones intercelulares podría estar causado por la nueva organización de las pectinas ácidas, como se ha comentado, ya que éstas son el componente mayoritario de la laminilla media, que es la capa más externa de la pared celular.

En el nabo se encontró que la AAPH producía una disminución en la capacidad de retención de agua (Pub. 5, Fig. 3), probablemente como consecuencia de alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares. En el presente estudio la capacidad de retención de agua del jamón curado no se midió. Sin embargo, de acuerdo por un lado con la disminución en la capacidad de retención de agua medida en el jamón curado presurizado en anteriores trabajos (Fulladosa *y col.*, 2009) y por otro lado, con el aumento en la aparición de iridiscencias y en la apariencia plástica obtenida tras la presurización del jamón curado (Pub. 3, Tabla 7; Pub. 4, Tabla 5), podemos sugerir que este parámetro también disminuye en el jamón curado con la presurización. A esta disminución en la capacidad de retención de agua en el nabo y en el jamón curado pueden contribuir tanto las alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares, permitiendo el paso de agua de dentro hacia el exterior de las células, como los cambios de solvatación de las moléculas inducidos por la AAPH (Messens, Van Camp y Huyghebaert, 1997).

El efecto de la presión en el color fue diferente en función del alimento de estudio, el nabo se oscureció mientras en el jamón curado hubo un aumento de la luminosidad o de los tonos claros (Tabla 5). Estos cambios se han relacionado con los cambios estructurales inducidos por la presión, alterando el ratio de luz absorbida/reflejada (Carlez *y col.*, 1995; Oey *y col.*, 2008b). Sin embargo, en el



nabo el oscurecimiento también se relaciona con la acción de los enzimas peroxidadas, que son muy abundantes y pueden ser los responsables del desarrollo de colores de fondo en vegetales (Burnette, 1977). De acuerdo con anteriores estudios, estas enzimas se desactivan con el escaldado, pero se necesitan presiones del orden de los 900 MPa para inactivarlos mediante la presión (Baardseth y Slinde, 1980; Eisenmenger y Reyes-De-Corcuera, 2009). En otros vegetales, como las judías verdes con un gran contenido de clorofila, se ha observado que la presurización intensifica el color del pigmento (Krebbbers, Koets, van den Wall, Matser, Moezelaar y Hoogerwerf, 2002). Algo similar puede observarse en el jamón curado, donde la presurización a 600 MPa produjo un incremento en los colores rojos tras 50 días de almacenamiento (Tabla 5), seguramente relacionado con la estabilidad del pigmento nitrosilmioglobina a la presión que se traduce en el mantenimiento del color rojo característico de las carnes curadas tras la presurización (Cheftel y Culioli, 1997). Sin embargo, a diferencia de lo observado en vegetales, donde el color puede verse afectado por reacciones de oxidación durante el almacenamiento (Oey *y col.*, 2008b), en el jamón curado presurizado a 600 MPa se mantuvo mejor el color rojo durante el almacenamiento que en el jamón curado no presurizado (Pub. 3, Tabla 3).

El aumento de los tonos claros (emblanquecimiento) del jamón curado con la AAPH no se ha observado en otros tipos de carnes curadas, como la cecina, donde la presurización a 500 MPa/4 min no produjo diferencias en los valores de  $L^*$  (Rubio, Martínez, González-Fernández, García-Cachán, Rovira y Jaime, 2006). Tampoco produjo diferencias en este parámetro la presurización del jamón curado entero a 400 o 600 MPa, sugiriéndose el efecto protector de los largos procesos de curado en el emblanquecimiento producido por la AAPH (Serra *y col.*, 2007b). Tanto la cecina como los jamones con largos periodos de curación comparten una característica común, una actividad de agua (0,9) menor que la encontrada en los jamones de curación corta (0,95–0,965) (Andrés,

Möller, Adamsen, Ruiz y Skibsted, 2004b; Fulladosa *y col.*, 2009; Rubio, Martínez, González-Fernández, García-Cachán, Rovira y Jaime, 2006; Serra *y col.*, 2007a). Así, se podría sugerir que en el emblanquecimiento producido por la AAPH el agua libre en el alimento juega un papel muy importante; bien sea por su posible compresión con la presión (4 % cada 100 MPa; (Cheftel y Culioli, 1997)) o por la formación de puentes de hidrógeno que puede promover el aumento de la presión (Cheftel, 1995), que daría como resultado cambios estructurales en la superficie del jamón, con una potencial precipitación de la tirosina si la cantidad de agua se reduce. De acuerdo con esto, en anteriores trabajos se han atribuido las modificaciones inducidas por la presurización en el color a cambios en las propiedades de enlace de las proteínas con el agua (Souza *y col.*, 2011).

**Tabla 5.** Efecto de los diferentes valores de presión en el color instrumental (CIELAB L\*, a\* y b\*) del nabo y del jamón curado loncheado.

		NT		200 MPa		400 MPa		600MPa	
		400	600	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C
Nabo	L*	66,6 <sup>a</sup>		26,3 <sup>de</sup>	25,9 <sup>e</sup>	28,8 <sup>cd</sup>	27,7 <sup>ede</sup>	29,5 <sup>c</sup>	26,5 <sup>de</sup>
	a*	3,9 <sup>a</sup>		3,4 <sup>ab</sup>	2,7 <sup>ab</sup>	1,9 <sup>b</sup>	2,0 <sup>b</sup>	2,2 <sup>ab</sup>	2,3 <sup>ab</sup>
	b*	16,8 <sup>a</sup>		10,7 <sup>b</sup>	9,7 <sup>b</sup>	11,3 <sup>b</sup>	11,3 <sup>b</sup>	12,0 <sup>b</sup>	10,7 <sup>c</sup>
Jamón	L*	41,3 <sup>b(1)</sup>	35,2 <sup>b(2)</sup>			42,9 <sup>a(1)</sup>		37,3 <sup>a(2)</sup>	
	a*	15,1	11,7 <sup>b</sup>			15,6		12,8 <sup>a</sup>	
	b*	5,0	4,7			5,6		4,4	

Datos extraídos de las publicaciones 3, 4 y 5.

<sup>abc</sup>: Las diferentes letras en una misma fila indican diferencias entre las medias a  $p < 0.05$ .

En el jamón, la comparación se realiza entre:

<sup>(1)</sup> NT400 y presurizado a 400 MPa tras 50 días de almacenamiento con o sin luz.

<sup>(2)</sup> NT600 y presurizado a 600 MPa tras 50 días de almacenamiento con o sin luz.

En los dos alimentos estudiados, los cambios inducidos por la presión en el contenido de compuestos antioxidantes o con capacidad antioxidante estarían muy influenciados por las modificaciones conformacionales. En el nabo, la desorganización celular inducida por la presión facilitaría la oxidación de los

compuestos más susceptibles a la acción del oxígeno y de los enzimas oxidativos. Así, la presurización a 200 y 400 MPa produjo pérdidas tanto en el contenido de vitamina C como de compuestos fenólicos, y por ende en la capacidad antioxidante. Mientras que la AAPH a 600 MPa, que había producido una menor modificación de la textura, solo produjo ligeras pérdidas en el contenido de vitamina C (Tabla 6).

En el jamón curado la presurización a 400 MPa produjo un aumento en la actividad del enzima superóxido dismutasa (SOD). Este enzima forma parte del sistema antioxidante de la carne y un aumento de su actividad se relaciona con una pérdida en la estabilidad oxidativa. Sin embargo, a 600 MPa no se encontró ninguna diferencia en la actividad de este enzima, y con una presión de 900 MPa disminuyó la actividad del enzima (Tabla 6). Esta reducción de la actividad enzimática a 900 MPa también se produjo en otro enzima antioxidante: la glutatión peroxidasa (GSHPx). Estas medidas, como ya se ha visto en el nabo, donde el mayor valor de presión ofrece una mejor retención de los compuestos con capacidad antioxidante, podrían sugerir una mejor conservación de la estabilidad oxidativa en el jamón curado presurizado a 900 MPa. Sin embargo, a este valor de presión se encontró una correlación negativa entre la actividad del enzima GSHPx en el tiempo inicial y la concentración de los óxidos de colesterol  $7\alpha$ -hidroxicolesterol ( $r = -0,96534$ ;  $p < 0,005$ ),  $7\beta$ -hidroxicolesterol ( $r = -0,96935$ ;  $p < 0,005$ ), colestanoetriol ( $r = -0,91907$ ;  $p < 0,01$ ) y  $25$ -hidroxicolesterol ( $r = -0,81706$ ;  $p < 0,05$ ) (análisis de correlaciones Pearson obtenidas con el paquete estadístico SAS, versión 8.2, Instituto SAS Inc., Cary, NC). Esta correlación negativa que se observó en el jamón curado a 900 MPa junto al incremento de vitamina E, compuesto con acción antioxidante que forma parte de las membranas celulares, sugeriría que a este valor de presión se produjo la rotura de las membranas celulares, produciendo un incremento relativo de la

concentración de vitamina E y dejando el colesterol más expuesto a la acción de oxidantes. Así, no quedó claro que una mayor desestructuración celular produjera un aumento en la estabilidad oxidativa del jamón curado. En este caso, la disminución en la actividad enzimática con la AAPH a 900 MPa sería debida a cambios conformacionales en el enzima que resultarían en su parcial o total inactivación (Hendrickx *y col.*, 1998).

El incremento en la actividad de la SOD a 400 MPa fue debido a un incremento en las especies superóxido ( $O_2^-$ ) en la matriz. Este incremento de la oxidación potencial se ha asociado a la desintegración de las membranas celulares, lo que afectaría a los ácidos grasos poliinsaturados, más susceptibles a la oxidación (Andrés *y col.*, 2004a; Beltran *y col.*, 2003; Carlez *y col.*, 1995). Sin embargo, la presurización de jamón curado a 600 MPa no produjo cambios en el contenido de óxidos de colesterol ni de vitamina E (Tabla 6), tampoco en el contenido de ácidos grasos provenientes de los fosfolípidos (Pub. 3; Tabla 5), sugiriendo el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares. Por otro lado, en matrices proteicas como la carne se cree que hay un efecto cooperativo de la desnaturalización de las proteínas en el inicio de la oxidación lipídica (Wada, 1992).

En el presente trabajo no se encontraron diferencias en el contenido de proteínas totales presurizando jamón curado entre 400 y 600 MPa (Pub. 3, Tabla 2; Pub. 4, Tablas 1–2). Aunque en el jamón curado presurizado a 900 MPa, tras 50 días de almacenamiento con diferentes condiciones lumínicas, se encontró un incremento en la concentración de proteínas (Pub. 4, Tabla 3). De acuerdo con Carlez *y col.* (1995), el almacenamiento en refrigeración durante 60 días de jamón ibérico curado presurizado a 300 MPa/30 min produjo un incremento en la oxidación de las proteínas. Esta mayor oxidación de las proteínas podría ser la responsable del inicio de los procesos oxidativos inducidos por la presurización

en jamón curado. Sin embargo, es necesario un estudio más detallado para comprender los procesos involucrados en el inicio de la oxidación lipídica y proteica inducida por la AAPH. En vista de los resultados obtenidos podemos sugerir que los enzimas SOD y GSHPx fueron sensibles a altos valores de presión (900 MPa), mientras el enzima catalasa mostró una gran estabilidad.

**Tabla 6.** Efecto de los diferentes valores de presión en los compuestos con actividad antioxidante en el nabo y en el jamón curado loncheado.

		NT			200 MPa		400 MPa		600MPa		900MPa
		400	600	900	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C	
N a b o	Ácido ascórbico <sup>(1)</sup>	846,7 <sup>a</sup>			526,7 <sup>c</sup>	529,7 <sup>c</sup>	257,5 <sup>d</sup>	314,9 <sup>d</sup>	664,6 <sup>bc</sup>	568,2 <sup>bc</sup>	
	Compuestos fenólicos <sup>(2)</sup>	436,3 <sup>a</sup>			384,9 <sup>bcd</sup>	326,0 <sup>e</sup>	319,0 <sup>e</sup>	347,6 <sup>de</sup>	420,0 <sup>ab</sup>	387,8 <sup>bc</sup>	
	TEAC <sup>(3)</sup>	215,2 <sup>a</sup>			76,3 <sup>cd</sup>	81,2 <sup>cd</sup>	51,8 <sup>d</sup>	58,5 <sup>d</sup>	182,9 <sup>ab</sup>	104,3 <sup>c</sup>	
J a m ó n	Catalasa <sup>(4)</sup>	51,5 <sup>(8)</sup>	47,7 <sup>(9)</sup>	55,5 <sup>(10)</sup>			51,3 <sup>(8)</sup>		49,6 <sup>(9)</sup>		50,9 <sup>(10)</sup>
	Glutación peroxidasa <sup>(5)</sup>	220,5	160,1	255,9 <sup>a</sup>			232,0		193,3		142,8 <sup>b</sup>
	Superóxido dismutasa <sup>(6)</sup>	136,9 <sup>a</sup>	145,4	132,8 <sup>a</sup>			150,5 <sup>b</sup>		144,2		106,4 <sup>b</sup>
	Vitamina E <sup>(7)</sup>	2,5	1,3	1,8 <sup>b</sup>			2,9		1,4		2,7 <sup>a</sup>

Datos extraídos de las publicaciones 3,4 y 5.

<sup>(1)</sup> mg /100 g peso seco.

<sup>(2)</sup> mg de ácido gálico/100 g peso seco.

<sup>(3)</sup> capacidad antioxidante de trolox (IC50<sub>Trolox</sub>/IC50<sub>s</sub>) x 10<sup>5</sup>.

<sup>(4)</sup> μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min por gramo de músculo.

<sup>(5)</sup> nmol NADPH/min por gramo de músculo.

<sup>(6)</sup> Unidades de SOD por gramo de músculo.

<sup>(7)</sup> μg α-tocopheryl/g

abc. Las diferentes letras en una misma fila indican diferencias entre las medias a *p*<0.05. En el jamón, la comparación se realiza tras 50 días de almacenamiento con o sin luz entre:

<sup>(8)</sup> NT400 y presurizado a 400 MPa.

<sup>(9)</sup> NT600 y presurizado a 600 MPa

<sup>(10)</sup> NT900 y presurizado a 900 MPa

La oxidación lipídica en el jamón curado también se midió mediante los índices de TBARS. La presurización a 400 MPa no produjo diferencias en los índices de TBARS, tampoco la AAPH a 900 MPa (Pub. 4, Tablas 1–3). Aunque el efecto global de la presurización en este experimento (400 y 900 MPa) resultó en un incremento de los índices de TBARS (*p*<0,05), de 1,2 a 1,7 mmol MDA/mg. Al comparar el efecto de la AAPH a 900 MPa en el tiempo inicial se encontró que la presurización incrementaba los índices de TBARS, de 0,85 a 1,32 mmol MDA/mg (*p*<0,005, ANOVA con el paquete estadístico SAS, versión 8.2, Instituto SAS Inc., Cary, NC) y que este incremento se correlacionaba con el

incremento de los óxidos de colesterol  $7\alpha$ -hidroxicolesterol ( $r = 0,94296$ ;  $p < 0,005$ ),  $7\beta$ -hidroxicolesterol ( $r = 0,94325$ ;  $p < 0,005$ ) y colestanoetriol ( $r = 0,9526$ ;  $p < 0,005$ ) (análisis de correlaciones Pearson obtenidos con el paquete estadístico SAS, versión 8.2, Instituto SAS Inc., Cary, NC); indicando que este valor de presión disminuía la estabilidad oxidativa del jamón curado. Sin embargo, la presión de 600 MPa produjo una reducción en los índices de TBARS en el jamón curado durante el almacenamiento en presencia de luz (Pub. 3, Tabla 1). Resulta difícil afirmar con los datos de TBARS la reducción de los procesos oxidativos a 600 MPa, debido a la ausencia de efecto de esta presión en las actividades enzimáticas y en la concentración de ácidos grasos totales o libres (Tabla 6; Pub. 3, Tablas 4–6), así sólo se pudo constatar que no se incrementaron los procesos oxidativos de modo global. Ello es una evidencia de la necesidad de más estudios, con una aproximación experimental alternativa, para esclarecer las causas de la pérdida de estabilidad oxidativa por la generación de especies oxidantes y el efecto de la desestructuración celular, que con los métodos utilizados mostró una lectura similar a la generada cuando hay una disminución de las especies oxidantes.

Parece importante destacar que la AAPH a 600 MPa tanto en el nabo como en el jamón curado produjo la mejor conservación tanto de la estabilidad oxidativa como de los compuestos con actividad antioxidante. Esta mejor conservación de la estabilidad oxidativa con valores medios de presión ya se vio anteriormente en jamón ibérico curado presurizado entre 200 y 800 MPa, relacionándola con un incremento en las reacciones de los productos secundarios de la oxidación lipídica (Andrés *y col.*, 2004a). En fresas también se encontraron resultados similares, aunque se relacionaron con un aumento en la extractabilidad con la presión de los compuestos con acción antioxidante (Patras *y col.*, 2009a).

El efecto de la AAPH en otros componentes como los glucosinolatos y las purinas y pirimidinas es relevante por sus propiedades organolépticas y beneficiosas para la salud. La presurización del nabo produjo pérdidas en el glucosinolato indólico glucobrasicina y el glucosinolato alifático glucobrasicanapina. De acuerdo con Van Eylen *y col.* (2009), la disminución de glucosinolatos producida por la AAPH era debida a su hidrólisis por el enzima mirosinasa en compuestos con beneficio potencial para la salud humana. Los resultados de dureza (Tabla 4) se correlacionaron con la concentración de estos glucosinolatos ( $r= 0,744$ ;  $p<0,0001$  para la glucobrasicina;  $r= 0,766$ ;  $p<0,0001$  para la glucobrasicanapina). Además, la mirosinasa en brócoli mantiene su actividad por encima de los 400 MPa (Van Eylen, Oey, Hendrickx y Van Loey, 2007). Así, una mayor ruptura celular inducida por la presión pondría en contacto al enzima mirosinasa con los glucosinolatos, favoreciendo su hidrólisis. Sin embargo, este efecto no se observó para los otros dos glucosinolatos alifáticos, progoitrina y glucorafanina. La concentración de glucorafanina no se vio afectada, mientras que la de progoitrina aumentó (Tabla 7). El efecto de la presión en estos dos glucosinolatos podría ser debido a una combinación de factores. Por un lado, la desestructuración celular inducida por la presión produciría la liberación de los glucosinolatos de las vacuolas, aumentando su concentración. Por otro lado, la presión podría estar afectando a la afinidad del enzima mirosinasa, produciendo una menor hidrólisis de estos dos glucosinolatos. Algo similar se ha observado previamente en el enzima  $\beta$ -glucosidasa en mermeladas presurizadas (Oey *y col.*, 2008b). Aunque sin la medida de los compuestos de hidrólisis no podemos conjeturar más allá, ya que también se podría producir un aumento tanto de los glucosinolatos por la desestructuración celular como de sus productos de hidrólisis.

**Tabla 7.** Efecto de los diferentes valores de presión en el contenido de glucosinolatos en el nabo y de purinas y pirimidinas en el jamón curado loncheado.

		NT		200 MPa		400 MPa		600MPa		900MPa
		600	900	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C	20 °C	40 °C	
N a b o	Glucorafanina <sup>(1)</sup>	0,46 <sup>ab</sup>		0,50 <sup>ab</sup>	0,43 <sup>b</sup>	0,64 <sup>a</sup>	0,54 <sup>ab</sup>	0,58 <sup>ab</sup>	0,54 <sup>ab</sup>	
	Progoitrina <sup>(1)</sup>	0,33 <sup>d</sup>		0,31 <sup>d</sup>	0,36 <sup>d</sup>	0,63 <sup>a</sup>	0,48 <sup>bc</sup>	0,53 <sup>ab</sup>	0,52 <sup>b</sup>	
	Glucobrasicanapina <sup>(1)</sup>	1,04 <sup>a</sup>		0,52 <sup>bc</sup>	0,56 <sup>bc</sup>	0,62 <sup>bc</sup>	0,42 <sup>c</sup>	0,53 <sup>bc</sup>	0,51 <sup>bc</sup>	
	Glucobrasicina <sup>(1)</sup>	0,68 <sup>a</sup>		0,41 <sup>c</sup>	0,36 <sup>cd</sup>	0,28 <sup>d</sup>	0,38 <sup>cd</sup>	0,39 <sup>c</sup>	0,36 <sup>cd</sup>	
J a m ó n	Ácido úrico <sup>(2)</sup>	4,5 <sup>(3)</sup>	3,9 <sup>(4)</sup>					7,1 <sup>(3)</sup>		5,8 <sup>(4)</sup>
	Hipoxantina <sup>(2)</sup>	4101,9	3860,3					4318,7		3658,1
	Xantina <sup>(2)</sup>	21,0	30,3					34,0		34,7
	Uridina <sup>(2)</sup>	206,6	246,2					207,1		250,3
	Adenosina <sup>(2)</sup>	9,4	8,6					4,9		5,7
	Inosina <sup>(2)</sup>	1963,1	1067,5					1943,6		1131,3
	Guanosina <sup>(2)</sup>	88,2	77,6					86,4		77,9

Datos extraídos de las publicaciones 5 y 6.

<sup>(1)</sup> mg /100 g peso seco.

<sup>(2)</sup> µg /g peso seco.

<sup>abc</sup>: Las diferentes letras en una misma fila indican diferencias entre las medias a  $p < 0.05$ . En el jamón, la comparación se realiza tras 50 días de almacenamiento con o sin luz entre:

<sup>(3)</sup> NT600 y presurizado a 600 MPa.

<sup>(4)</sup> NT900 y presurizado a 900 MPa.

A diferencia de lo observado en los glucosinolatos del nabo, la AAPH entre 600 y 900 MPa no produjo diferencias en la concentración de purinas y pirimidinas en el jamón curado (Tabla 7). En base a las concentraciones de estos compuestos resulta difícil discernir si los enzimas implicados en su metabolismo continúan activos en el producto final. Tampoco podemos saber si estos enzimas, como hemos indicado para los enzimas antioxidantes con la AAPH a 900 MPa, se modifican con la presión. Sin embargo, la falta de efecto de la presión mostró que este tratamiento en el jamón curado no produjo un incremento en la actividad de los enzimas implicados en el metabolismo de los compuestos relacionados con el ATP. Esta falta de efecto de la presión en las purinas y pirimidinas permite destacar que la presurización del jamón curado, a las dos presiones evaluadas, no supone un aumento en el poder uricogénico del alimento, como



tampoco una disminución de algunos de los compuestos que contribuyen al flavor típico de este producto.

En el nabo no fue posible realizar el análisis sensorial, sin embargo en el jamón curado sí, y a continuación discutiremos las diferencias más relevantes en función de la presión aplicada (400 o 600 MPa). Para poder comparar el efecto de los dos valores de presión en los atributos sensoriales se utilizaron las diferencias entre el jamón no tratado y el presurizado. Esta comparación se realizó tanto en los resultados del almacenamiento con luz como en los obtenidos tras 50 días de almacenamiento con o sin luz (Tabla 8).

**Tabla 8.** Comparación del efecto de la presurización a 400 y 600 MPa en los atributos sensoriales del jamón curado loncheado.

	Almacenamiento con luz				Condiciones de almacenamiento 50 días			
	$\Delta$ HPP400 <sup>1</sup>	$\Delta$ HPP600 <sup>2</sup>	SE <sup>(3)</sup>	p <sup>(4)</sup>	$\Delta$ HPP400	$\Delta$ HPP600	SE	p
Color	0,7	1,1	0,14	*	0,8	1,0	0,10	NS
Iridiscencias	-0,7	-0,8	0,17	NS	-1,0	-0,9	0,28	NS
Brillo	-0,2	0,5	0,19	**	0,0	-0,3	0,21	NS
Salado	-0,7	-0,8	0,13	NS	-1,0	-1,8	0,24	*
Olor	0,3	0,1	0,19	NS	0,2	-0,3	0,14	**
Cristales blancos	-0,2	-0,2	0,14	NS	-0,4	-0,1	0,14	NS
Dureza	-0,4	-1,2	0,14	**	-0,6	-1,3	0,19	*
Gomosidad	-0,4	-1,0	0,22	*	-1,0	-1,2	0,30	NS
Desmenuzabilidad	0,3	0,5	0,19	NS	0,0	0,5	0,25	NS

La comparación entre presiones, 400 y 600 MPa, se realizó con los valores  $\Delta$  HPP400 y  $\Delta$  HPP600 de los atributos sensoriales mediante los procedimientos MEANS y GLM del paquete estadístico SAS (versión 8.2, Instituto SAS Inc., Cary, NC). Se realizaron dos análisis de varianza (ANOVA): uno para los resultados de almacenamiento con luz y el otro para los resultados de diferentes condiciones lumínicas de almacenamiento tras 50 días de refrigeración. Los dos modelos de ANOVA (GLM) incluyeron catador, tiempo de almacenamiento, presión y la interacción presión\*tiempo almacenamiento como efectos fijos. Las diferencias fueron testadas por el Test de Tukey test ( $p < 0.05$ ).

<sup>(1)</sup>  $\Delta$  HPP400: diferencia entre el valor obtenido con NT400 y presurizado a 400 MPa.

<sup>(2)</sup>  $\Delta$  HPP600: diferencia entre el valor obtenido con NT600 y presurizado a 600 MPa.

<sup>(3)</sup> Error estándar.

<sup>(4)</sup> Significancia: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.005$ ; NS, no significativa ( $p > 0.05$ ).

Ya hemos visto que la AAPH produjo una pérdida de color instrumental en el jamón curado. Esta pérdida de intensidad de color también fue percibida en el

análisis sensorial por los panelistas, siendo menos intensa a 400 MPa que a 600 MPa. Sin embargo, al comparar el efecto de los valores de presión en este atributo tras 50 días de almacenamiento no se encontraron diferencias entre las presiones. Esto indicaría que la presurización a 400 MPa tuvo una menor incidencia en la intensidad de color del jamón, sin embargo, con el tiempo de almacenamiento esta diferencia se redujo y el color fue similar para las dos presiones evaluadas. Otro factor importante en el aspecto del jamón curado es la aparición de iridiscencias, en este atributo no se encontró diferencia en función de la presión aplicada.

Como ya se ha indicado, la textura del jamón curado se modificó con la AAPH. Al comparar los valores de presión se observó que a 600 MPa se produjo un mayor incremento de la dureza de las lonchas de jamón en todas las condiciones estudiadas. Esta presión también produjo un incremento mayor de la gomosidad del jamón curado durante el almacenamiento con luz. Los cambios en la textura del jamón curado con la AAPH se han relacionado con cambios en su estructura interna (ordenamiento celular, compresión) (Fulladosa *y col.*, 2009; Tanzi, Saccani, Barbuti, Grisenti, Lori y Bolzoni, 2004). Así, de acuerdo con la mayor modificación en la dureza a presiones más elevadas, se puede considerar que las modificaciones de la estructura interna fueron más importantes al aumentar la presión. El escaso efecto observado con la AAPH a 400 MPa durante el almacenamiento con luz en estos atributos (Pub. 4, Tabla 6) se debe atribuir a que a esta presión la modificación fue prácticamente inexistente, y no al hecho de hacer el análisis sensorial de las muestras de 400 MPa (almacenamiento con luz) en diferentes días (Pub. 4, sec. 3.5). Estos datos muestran que durante el almacenamiento con luz el efecto de la presurización a 400 MPa en la textura del jamón curado fue prácticamente inexistente.

Uno de los problemas que se han encontrado al presurizar carnes curadas es el aumento de la percepción de salado (Fulladosa *y col.*, 2009; Saccani *y col.*, 2004; Serra *y col.*, 2007b). Durante el almacenamiento con luz la presurización a 400 MPa no modificó este atributo sensorial (Pub. 4, Tabla 6), sin embargo, al comparar las dos presiones no se encontraron diferencias (Tabla 8). Esto indicaría que debido a que el análisis sensorial se realizó en diferentes días en el estudio de 400 MPa, este parámetro no mostró diferencias significativas. Aunque tras 50 días de almacenamiento, la AAPH a 400 MPa produjo un menor incremento en la percepción de salado que la presurización a 600 MPa (Tabla 8). En el presente estudio se ha sugerido la relación entre el incremento en la percepción de salado con la AAPH y las modificaciones estructurales (Pub. 4, sec. 3.5). El hecho de que la modificación de la percepción de salado, como ya se ha visto para la dureza y la gomosidad, sea mayor presurizando a 600 MPa que a 400 MPa tras 50 días de almacenamiento, podría ser indicativa de esta relación.

La presurización a 400 MPa modificó en menor medida la calidad sensorial del jamón curado. Sin embargo, a esta presión la descontaminación microbiana obtenida fue de 0,8 Log UFC/g (medido en los días 25 y 50 del almacenamiento con luz, dato no mostrado en las publicaciones), mientras que a 600 MPa se produjo una reducción de 2,6 Log UFC/g (Pub. 3, Tabla 2). Asimismo, al obtener con la presurización a 600 MPa una mejor conservación de la estabilidad oxidativa, pensamos que es un valor óptimo de presión para la conservación del jamón curado loncheado. La AAPH a 600 MPa también fue para el nabo el valor de presión que produjo una menor pérdida de los compuestos con actividad antioxidante, además de modificar en menor medida la textura y color original. Un mayor estudio de la causa de la merma en la calidad sensorial de estos dos alimentos con la presurización podría ofrecer alternativas para evitarlos. Así, la AAPH sería para estos alimentos una técnica de conservación viable que

ofreciese una mínima pérdida en el poder antioxidante y la estabilidad oxidativa manteniendo todos sus atributos sensoriales.

Queremos concluir esta discusión con una reflexión surgida durante el desarrollo de este trabajo. Se ha comentado el posible aumento en la extractabilidad de algunos compuestos con la presurización. Esta afirmación nos conduce a considerar que las técnicas analíticas empleadas para la determinación de los compuestos analizados en este estudio presentan problemas de recuperación de los analitos, ya que no consiguen extraer todo el contenido en el alimento sin presurizar. También induce a plantear la biodisponibilidad debido a los posibles cambios en la conformación de algunas biomoléculas. ¿Puede el tratamiento con altas presiones aumentar o reducir la biodisponibilidad de algunos compuestos, como proteínas o compuestos con actividad antioxidante, en los alimentos? En el contexto del análisis es importante poder llegar a diferenciar si las diferencias observadas se deben al aumento de la extracción, para ello se deben reformular las aproximaciones experimentales para obtener una información más exacta de los fenómenos que ocurren durante el tratamiento con altas presiones. Los cambios estructurales no se reflejan en los valores de los datos químicos, ya que en muchos casos éstos no son diferentes entre las muestras tratadas y las no tratadas. Sin embargo, sí que se observan cambios en las características físicas del alimento con un impacto en la calidad del producto, aunque es obvio que estas diferencias son dependientes del alimento debido a las grandes diferencias entre los distintos tipos.







De acuerdo con los objetivos específicos planteados en la presente tesis y con los artículos que la componen se puede concluir que:

- I Se ha desarrollado y validado un método para la determinación de purinas y pirimidinas en matrices cárnicas basado en una metodología previa para el análisis de ácido úrico y xantina en plasma, que se compone de una extracción en un baño de agua a 100 °C y del análisis mediante cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas. Las modificaciones desarrolladas se han focalizado en incrementar el número de compuestos analizados, de dos a siete, en la adaptación a una matriz proteica, con una mayor cantidad de interferentes, y en una precisa determinación mediante espectrometría de masas, ya que la coelución de compuestos y los interferentes derivados de la matriz no permitieron la determinación mediante UV. Además, gracias al uso de una extracción a pH neutro, esta metodología se podría seguir desarrollando para otros compuestos envueltos en el metabolismo del ATP.

- II Se ha optimizado y validado un método basado en anteriores trabajos para la determinación de óxidos de colesterol en jamón curado. En la actual metodología la extracción, por el método de Blight and Dyer (1959) mediante cloroformo, metanol y agua, y la purificación, modificación de la empleada previamente por Petron *y col.* (2003), primero con columnas SPE de sílica y mezclas de hexano/dietil éter y segundo con columnas SPE de aminopropil y mezclas de hexano/acetato de etilo, se optimizaron para obtener un empleo eficiente de los disolventes orgánicos. Con las mejoras obtenidas, este método ha permitido cuantificar en jamón curado los óxidos de colesterol  $20\alpha$ -hidroxicolesterol,  $25$ -hidroxicolesterol y colestanoetriol, los cuales apenas se habían podido determinar previamente en jamón curado. Además, se ha demostrado que la determinación de estos compuestos con detectores de ionización a la llama (FID) puede dar resultados erróneos.
- III.1 La aplicación de altas presiones hidrostáticas a 400 MPa en el jamón curado loncheado ha producido, además de una reducción en el conteo de microorganismos, la modificación de la textura, el sabor y el color de este alimento. Las lonchas de jamón curado presurizado han incrementado su luminosidad, dureza y sabor salado. La estabilidad oxidativa del jamón curado presurizado a 400 MPa, medida mediante la actividad del enzima SOD, se ha reducido.
- III.2 La presurización a 600 MPa ha modificado en mayor medida las cualidades organolépticas del jamón curado, aunque también ha producido una mayor reducción del conteo de microorganismos. Además, a esta presión se ha reducido el índice de TBARS, indicando una mejor conservación de la estabilidad oxidativa, sin embargo esta

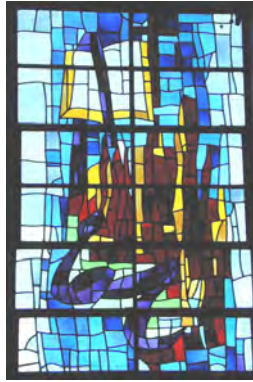


mejora no ha sido confirmada por el resto de parámetros relacionados con la estabilidad oxidativa.

III.3 La presurización a 900 MPa ha producido un incremento en la concentración de proteínas medidas mediante espectroscopía del infrarrojo cercano (NIT). Este incremento junto al estudio con microscopía óptica del jamón presurizado a 600 MPa puede indicar que los cambios producidos por la aplicación de altas presiones en el jamón curado están relacionados con una alteración de la estructura interna original del jamón curado.

IV La aplicación de altas presiones en el nabo (200–600 MPa/20–40 °C) ha producido en términos generales una modificación de la textura y del color de este vegetal. A diferencia del ablandamiento producido por el escaldado, la alta presión ha obtenido una textura también blanda aunque flexible. Sin embargo, la posible falta de inactivación de los enzimas peroxidasas junto con la modificación de la estructura, han producido una gran alteración del color del nabo. Las diferentes combinaciones de presión/temperatura han producido una pérdida de compuestos con actividad antioxidante, siendo la presurización a 600 MPa/20 °C el valor de presión/temperatura que mejor ha mantenido las concentraciones, incluso superior a las obtenidas mediante el escaldado. Este valor de presión/temperatura también ha producido una menor modificación de la textura y del color originales del nabo. El efecto de la presurización en la concentración de glucosinolatos ha sido dependiente del glucosinolato de estudio.





**Addis, P. B. (1986).** *Occurrence of lipid oxidation products in foods.* Food and Chemical Toxicology, vol. 24, nº 10–11, 1021–1030.

**Ahn, D. U., Nam, K. C., Du, M. y Jo, C. (2001).** *Effect of irradiation and packaging conditions after cooking on the formation of cholesterol and lipid oxidation products in meats during storage.* Meat Science, vol. 57, nº 4, 413–418.

**Andrés, A. I., Adamsen, C. E., Möller, J. K. S., Ruiz, J. y Skibsted, L. H. (2006).** *High-pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on colour and oxidative stability during chill storage packed in modified atmosphere.* European Food Research and Technology, vol. 222, nº 5, 486–491.

**Andrés, A. I., Möller, J. K. S., Adamsen, C. E., Ruiz, J. y Skibsted, L. H. (2004b).** *Efecto de la aplicación de alta presión hidrostática (APH) sobre el color y estabilidad oxidativa de jamón ibérico loncheado y envasado en atmósfera modificada.* Eurocarne, vol. 131, 47–53.

**Andrés, A. I., Möller, J. K. S., Adamsen, C. E. y Skibsted, L. H. (2004a).** *High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on radical formation, lipid oxidation and colour.* European Food Research and Technology, vol. 219, nº 3, 205–210.

**Angsupanich, K. y Ledward, D. A. (1998).** *High pressure treatment effects on cod (*Gadus morhua*) muscle.* Food Chemistry, vol. 63, nº 1, 39–50.

**Arroyo, G., Sanz, P. D. y Préstamo, G. (1997).** *Effect of high pressure on the reduction of microbial populations in vegetables.* Journal of Applied Microbiology, vol. 82, nº 6, 735–742.

- Aruoma, O. I. y Halliwell, B. (1989).** *Inactivation of alpha-antiproteinase by hydroxyl radicals – the effect of uric acid.* FEBS Letters, vol. 244, nº 1, 76–80.
- Asaka, M. y Hayaszi, R. (1991).** *Activation of polyphenoloxidase in pear fruits by high pressure treatment.* Agricultural and Biological Chemistry, vol. 55, nº 9, 2439–2440.
- Baardseth, P. y Slinde, E. (1980).** *Heat inactivation and pH optima of peroxidase and catalase in carrot, swede and Brussels sprouts.* Food Chemistry, vol. 5, nº 2, 169–174.
- Baggio, S. R. y Bragagnolo, N. (2006).** *The effect of heat treatment on the cholesterol oxides, cholesterol, total lipid and fatty acid contents of processed meat products.* Food Chemistry, vol. 95, nº 4, 611–619.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Pothakamury, U. R., Palou, E. y Swanson, B. (1998).** *Emerging technologies in food preservation.* En: Nonthermal Preservation of Foods. Eds. Barbosa-Cánovas, G. V., Pothakamury, U. R., Palou, E. y Swanson, B. pp 1–9. Marcel Dekker I.N.C. New York.
- Beltran, E., Pla, R., Yuste, J. y Mor-Mur, M. (2003).** *Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values.* Meat Science, vol. 64, nº 1, 19–25.
- Berne, R. M., Knabb, R. M., Ely, S. W. y Rubio, R. (1983).** *Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview.* Federation Proceedings, vol. 42, nº 15, 3136–3142.
- Blackburn, G. M., Kellard, B., Rashid, A. y Thompson, M. H. (1983).** *Physical association of oestrogens and other steroids with DNA.* Biochemical pharmacology, vol. 32, nº 17, 2571–2575.
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959).** *A rapid method of total lipid extraction and purification.* Canadian journal of Biochemistry Physiology, vol. 37, 911–917.
- Bodin, K. y Diczfalusy, U. (2002).** *Analysis of cholesterol oxidation products in plasma, tissues and food.* European Journal of Lipid Science and Technology, vol. 104, nº 7, 435–439.
- Boselli, E., Caboni, M. F., Rodríguez-Estrada, M. T., Toschi, T. G., Daniel, M. y Lercker, G. (2005).** *Photooxidation of cholesterol and lipids of turkey meat during storage under commercial retail conditions.* Food Chemistry, vol. 91, nº 4, 705–713.

- Bragagnolo, N., Danielsen, B. y Skibsted, L. (2005).** *Effect of rosemary on lipid oxidation in pressure-processed, minced chicken breast during refrigerated storage and subsequent heat treatment.* European Food Research and Technology, vol. 221, nº 5, 610–615.
- Bragagnolo, N., Danielsen, B. y Skibsted, L. H. (2006).** *Combined effect of salt addition and high-pressure processing on formation of free radicals in chicken thigh and breast muscle.* European Food Research and Technology, vol. 223, nº 5, 669–673.
- Burnette, F. S. (1977).** *Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review.* Journal of Food Science, vol. 42, nº 1, 1–6.
- Cambero, M. I., Pereira-Lima, C. I., Ordoñez, J. A. y de Fernando, G. D. G. (2000).** *Beef broth flavour: relation of components with the flavour developed at different cooking temperatures.* Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 80, nº 10, 1519–1528.
- Campus, M. (2010).** *High pressure processing of meat, meat products and seafood.* Food Engineering Reviews, vol. 2, nº 4, 256–273.
- Campus, M., Flores, M., Martínez, B. y Toldrá, F. (2008).** *Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin.* Meat Science, vol. 80, nº 4, 1174–1181.
- Cano, M. P., Hernandez, A. y Ancos, B. (1997).** *High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Strawberry and Orange Products.* Journal of Food Science, vol. 62, nº 1, 85–88.
- Cardello, A. V., Schutz, H. G. y Leshner, L. L. (2007).** *Consumer perceptions of foods processed by innovative and emerging technologies: A conjoint analytic study.* Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol. 8, nº 1, 73–83.
- Careri, M., Mangia, A., Musci, M. y Parolari, G. (1998).** *Development of gas chromatographic method for determination of cholesterol oxides in meat products.* Chromatographia, vol. 47, nº 1–2, 42–48.
- Carlez, A., Veciana-Nogues, M. T. y Cheftel, J. C. (1995).** *Changes in Colour and Myoglobin of Minced Beef Meat Due to High Pressure Processing.* LWT–Food Science and Technology, vol. 28, nº 5, 528–538.
- Carver, J. D. y Walker, W. A. (1995).** *The role of nucleotides in human nutrition.* Journal of Nutritional Biochemistry, vol. 6, nº 2, 58–72.

- Catinella, S., Rovatti, L., Hamdan, M., Porcelli, B., Frosi, B. y Marinello, E. (1997).** *Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry of methylated purine bases.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 11, nº 8, 869–874.
- Cava, R., Ladero, L., González, S., Carrasco, A. y Ramírez, M. R. (2009).** *Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage.* Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol. 10, nº 1, 76.
- Cheah, P. B. y Ledward, D. A. (1997).** *Catalytic Mechanism of Lipid Oxidation following High Pressure Treatment in Pork Fat and Meat.* Journal of Food Science, vol. 62, nº 6, 1135–1139.
- Cheah, P. B. y Ledward, D. A. (1996).** *High pressure effects on lipid oxidation in minced pork.* Meat Science, vol. 43, nº 2, 123–134.
- Cheftel, J. C. (1995).** *Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation.* Food Science and Technology International, vol. 1, nº 2–3, 75–90.
- Cheftel, J. C. (1992).** *Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: An Overview.* En: High Pressure and Biotechnology. Eds. Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. y Masson, P. pp 195–209. John Libbey Eurotext. Montrouge.
- Cheftel, J. C. y Culioli, J. (1997).** *Effects of high pressure on meat : A review.* Meat Science, vol. 46, nº 3, 211–236.
- Chen, G., Chu, Q., Zhang, L. y Ye, J. (2002).** *Separation of six purine bases by capillary electrophoresis with electrochemical detection.* Analytica Chimica Acta, vol. 457, nº 2, 225–233.
- Cheng, S. Y., Lee, W. C. y Chen, J. C. (2004).** *Increase of uricogenesis in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* reared under hyper-osmotic conditions.* Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, vol. 138, 245–253.
- Claude, J. R. y Beaumont, J. L. (1966).** *Les transformations de la molécule de cholestérol in vitro—leur importance au cours des analyses chromatographiques.* Journal of Chromatography A, vol. 21, 189–201.
- Clifford, A. J., Riumallo, J. A., Young, V. R. y Scrimshaw, N. S. (1976).** *Effect of oral purines on serum and urinary uric acid of normal, hyperuricemic and gouty humans.* Journal of Nutrition, vol. 106, nº 3, 428–450.

- Clifford, A. J. y Story, D. L. (1976).** *Levels of purines in foods and their metabolic effects in rats.* Journal of Nutrition, vol. 106, nº 3, 435–442.
- Coolen, E. J. C. M., Arts, I. C. W., Swennen, E. L. R., Bast, A., Stuart, M. A. C. y Dagnelie, P. C. (2008).** *Simultaneous determination of adenosine triphosphate and its metabolites in human whole blood by RP–HPLC and UV–detection.* Journal of Chromatography B, vol. 864, nº 1–2, 43–51.
- Cooper, N., Khosravan, R., Erdmann, C., Fiene, J. y Lee, J. W. (2006).** *Quantification of uric acid, xanthine and hypoxanthine in human serum by HPLC for pharmacodynamic studies.* Journal of Chromatography B, vol. 837, nº 1–2, 1–10.
- Cruz–Romero, M. C., Kerry, J. P. y Kelly, A. L. (2008).** *Fatty acids, volatile compounds and colour changes in high–pressure–treated oysters (Crassostrea gigas).* Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol. 9, nº 1, 54–61.
- Denda, A. y Hayashi, R. (1992).** En: High Pressure and Biotechnology (Colloque INSERM Vol. 224). Eds. Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. y Masson, P. pp 333–335. John Libbey Eurotext/Les Editions INSERM. Montrouge, France.
- Der Plancken, V., Van Loey, A. y Hendrickx, M. E. (2005).** *Combined effect of high pressure and temperature on selected properties of egg white proteins.* Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol. 6, nº 1, 11–20.
- Dierick, N., Vandekerckhove, P. y Demeyer, O. (1974).** *Changes in nonprotein nitrogen compounds during dry sausage ripening.* Journal of Food Science, vol. 39, nº 2, 301–304.
- Dissing, J. Å., Bruun–Jensen, L. y Skibsted, L. H. (1997).** *Effect of high–pressure treatment on lipid oxidation in turkey thigh muscle during chill storage.* European Food Research and Technology, vol. 205, nº 1, 11–13.
- Durantón, F., Marée, E., Simonin, H., Chéret, R. y de Lamballerie, M. (2010).** *Effect of high pressure–high temperature process on meat product quality.* High Pressure Research, vol. 31, nº 1, 163–167.
- Eisenmenger, M. J. y Reyes–De–Corcuera, J. I. (2009).** *High pressure enhancement of enzymes: A review.* Enzyme and Microbial Technology, vol. 45, nº 5, 331–347.
- Faelli, A. y Esposito, G. (1970).** *Effect of inosine and its metabolites on intestinal iron absorption in rat.* Biochemical Pharmacology, vol. 19, nº 9, 2551.

Fahey, J. W., Zalcmann, A. T. y Talalay, P. (2001). *The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants*. *Phytochemistry*, vol. 56, nº 1, 5–51.

Fan, H., Li, S. P., Xiang, J. J., Lai, C. M., Yang, F. Q., Gao, J. L. y Wang, Y. T. (2006). *Qualitative and quantitative determination of nucleosides, bases and their analogues in natural and cultured Cordyceps by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC–ESI–MS/MS)*. *Analytica Chimica Acta*, vol. 567, nº 2, 218–228.

Fan, H., Yang, E. Q. y Li, S. P. (2007). *Determination of purine and pyrimidine bases in natural and cultured Cordyceps using optimum acid hydrolysis followed by high performance liquid chromatography*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 45, 141–144.

Fornas, E., Martínez–Sales, V., Camañas, A. y Báguena, J. (1984). *Intestinal absorption of cholesterol autoxidation products in the rat*. *Archivos de Farmacología y Toxicología*, vol. 10, nº 3, 175–182.

Frigola, M. y Ayuso, F. (2003). *El envasado del jamón curado*. II Congreso Mundial del jamon sobre ciencia, tecnología y comercialización, 101–111.

Frycak, P., Huskova, R., Adam, T. y Lemr, K. (2002). *Atmospheric pressure ionization mass spectrometry of purine and pyrimidine markers of inherited metabolic disorders*. *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 37, nº 12, 1242–1248.

Fulladosa, E., Serra, X., Gou, P. y Arnau, J. (2009). *Effects of potassium lactate and high pressure on transglutaminase restructured dry–cured hams with reduced salt content*. *Meat Science*, vol. 82, nº 2, 213.

Galazka, V. B., Dickinson, E. y Ledward, D. A. (2000). *Influence of high pressure processing on protein solutions and emulsions*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 5, nº 3–4, 182–187.

García, C., Berdagué, J. J., Antequera, T., López–Bote, C., Córdoba, J. J. y Ventanas, J. (1991). *Volatile components of dry cured Iberian ham*. *Food Chemistry*, vol. 41, nº 1, 23–32.

García–Palazon, A., Suthanthangjai, W., Kajda, P. y Zabetakis, I. (2004). *The effects of high hydrostatic pressure on  $\beta$ –glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria  $\times$  ananassa*)*. *Food Chemistry*, vol. 88, nº 1, 7–10.



- García-Regueiro, J. A. y Maraschiello, C. (1997).** *Procedure for the determination of eight cholesterol oxides in poultry meat using on-column and solvent venting capillary gas chromatography.* Journal of Chromatography A, vol. 764, n° 2, 279–293.
- García-Regueiro, J. A., Sárraga, C., Hortós, M., Díaz, I., Valero, A. y Rius, M. A. (2002).** *Bioequivalence of meat products treated by high hydrostatic pressure.* (Profit Final Project Report FIT060000200066).
- Garriga, M., Aymerich, M. T. y Hugas, M. (2002).** *Effect of high pressure processing on the microbiology of skin vacuum packaged sliced meat products: cooked pork ham, dry cured pork ham and marinated beef loin.* Final Report, IRTA.
- Garriga, M., Grèbol, N., Aymerich, M. T., Monfort, J. M. y Hugas, M. (2004).** *Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life.* Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol. 5, n° 4, 451.
- George, S. K., Dipu, M. T., Mehra, U. R., Singh, P., Verma, A. K. y Ramgaokar, J. S. (2006).** *Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine.* Journal of Chromatography B, vol. 832, n° 1, 134–137.
- Ghaedian, A. R. y Wehling, R. L. (1996).** *Distribution of uric acid in the fractions obtained from experimental milling of wheat infested with granary weevil larvae.* Cereal Chemistry, vol. 73, n° 5, 628–631.
- Gilleland, G. M., Lanier, T. C. y Hamann, D. D. (1997).** *Covalent Bonding in Pressure-Induced Fish Protein Gels.* Journal of Food Science, vol. 62, n° 4, 713–733.
- Gomis, D. B. (1992).** *HPLC analysis of organic acids.* En: Food Analysis by HPLC. Eds. Nollet, L. M. L. Marcel Dekker Inc. New York.
- Greife, H. A. (1984).** *Enteral and intermediary metabolism of nucleic acids.* Uebersichten zur Tierernaehrung, vol. 12, n° 1, 1–44.
- Grubben, G. J. H. y Denton, O. A. (2004).** *Plant resources of tropical Africa 2. Vegetables.* PROTA Foundation; Backhuys Publishers. pp. 127–130. Leiden Netherlands/CTA, Wageningen, Netherlands.

- Grundy, S. M. (1990).** *Cholesterol and atherosclerosis: diagnosis and treatment.* Lippincott.
- Grundy, S. M. (1986).** *Cholesterol and Coronary Heart Disease: A New Era.* Journal of American Medical Association, vol. 256, nº 20, 2849–2858.
- Guardiola, F., Codony, R., Addis, P. B., Rafecas, M. y Boatella, J. (1996).** *Biological effects of oxysterols: Current status.* Food and Chemical Toxicology, vol. 34, nº 2, 193–211.
- Guardiola, F., Codony, R., Rafecas, M. y Boatella, J. (1995).** *Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray-dried egg.* Journal of Chromatography A, vol. 705, nº 2, 289–304.
- Gutierrez, J. B. (2008).** *Jamón curado.* Diaz De Santos. Spain.
- Harborne, J. B. (1993).** *Insect Feeding Preferences—Plant chemical as defecation agents.* En: Introduction to Ecological Biochemistry. Eds. Anonymous pp 128–158. Elsevier Academic Press.
- Hartmann, C. y Delgado, A. (2004).** *Numerical simulation of the mechanics of a yeast cell under high hydrostatic pressure.* Journal of Biomechanics, vol. 37, nº 7, 977–987.
- Hendrickx, M. E., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I. y Weemaes, C. (1998).** *Effects of high pressure on enzymes related to food quality.* Trends in Food Science & Technology, vol. 9, nº 5, 197–203.
- Heremans, K. (2002).** *The effects of high pressure on biomaterials.* En: Ultra High Pressure Treatments of Foods. Eds. Hendrickx, M. E. y Knorr, D. pp 23–51. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
- Hite, B. H. (1899).** *The effect of pressure on the preservation of milk.* West Virginia University, Agricultural Experiment Station, Morgantown, WV, Bulletin, vol. 58, 15–35.
- Homma, N., Ikeuchi, Y. y Suzuki, A. (1994).** *Effects of high pressure treatment on the proteolytic enzymes in meat.* Meat Science, vol. 38, nº 2, 219–228.
- Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A. M., Farkas, D. F. y Knorr, D. (1989).** *Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms.* Food Technology, vol. 43, 99–107.

- Houška, M., Strohalm, J., Kocurová, K., Totušek, J., Lefnerová, D., Tříška, J., Vrchotová, N., Fiedrleová, V., Holasova, M., Gabrovská, D. y Paulíčková, I. (2006). *High pressure and foods—fruit/vegetable juices*. Journal of Food Engineering, vol. 77, n° 3, 386–398.
- Hugas, M., Garriga, M. y Monfort, J. M. (2002). *New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology*. Meat Science, vol. 62, 359–371.
- Huppertz, T., Kelly, A. L. y Fox, P. F. (2002). *Effects of high pressure on constituents and properties of milk*. International Dairy Journal, vol. 12, n° 7, 561–572.
- Ichinoseki, S., Nishiumi, T. y Suzuki, A. (2006). *Tenderizing Effect of High Hydrostatic Pressure on Bovine Intramuscular Connective Tissue*. Journal of Food Science, vol. 71, n° 6, E276–E281.
- Indrawati, A., Van Loey, A., Smout, C. y Hendrickx, M. E. (2003). *High hydrostatic pressure in food preservation*. En: Food Preservation Techniques. Eds. Zeuthen, P. y Bøgh–Sørensen, L. CRC Press.
- Jiménez–Colmenero, F., Carballo, J., Fernández, P., Barreto, G. y Solas, M. T. (1997). *High–pressure–induced changes in the characteristics of low–fat and high–fat sausages*. Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 75, 61–66.
- Jimenez–Colmenero, F., Ventanas, J. y Toldrá, F. (2010). *Nutritional composition of dry–cured ham and its role in a healthy diet*. Meat Science, vol. 84, n° 4, 585–593.
- Johnston, D. E., Austin, B. A. y Murphy, R. J. (1992). *Effects of high hydrostatic pressure on milk*. Milchwissenschaft, vol. 47, n° 12, 760–763.
- Jonas, D. A., Elmadfa, I., Engel, K. H., Heller, K. J., Kozianowski, G., König, A., Müller, D., Narbonne, J. F., Wackernagel, W. y Kleiner, J. (2001). *Safety Considerations of DNA in Food*. Annals of Nutrition and Metabolism, vol. 45, n° 6, 235–254.
- Jung, S., Ghou, M. y de Lamballerie–Anton, M. (2000). *Changes in lysosomal enzyme activities and shear values of high pressure treated meat during ageing*. Meat Science, vol. 56, n° 3, 239–246.

- Kanner, J. (1994).** *Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications.* Meat Science, vol. 36, n° 1–2, 169–189.
- Kato, M. y Hayashi, R. (1999).** *Effects of High Pressure on Lipids and Biomembranes for Understanding High–Pressure–Induced Biological Phenomena.* Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, vol. 63, n° 8, 1321–1328.
- Kim, S. y Nawar, W. (1993).** *Parameters influencing cholesterol oxidation.* Lipids, vol. 28, n° 10, 917–922.
- Krebbbers, B., Koets, M., van den Wall, F., Matsers, A. M., Moezelaar, R. y Hoogerwerf, S. W. (2002).** *Effects of high–pressure processing on the quality of green beans.* Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Proceedings, vol. 19, 389–396.
- Krut, L. H., Yang, J. W., Schonfeld, G. y Ostlund, R. E. (1997).** *The Effect of Oxidizing Cholesterol on Gastrointestinal Absorption, Plasma Clearance, Tissue Distribution, and Processing by Endothelial Cells.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, vol. 17, n° 4, 778–785.
- Kubow, S. (1990).** *Toxicity of dietary lipid peroxidation products.* Trends in Food Science & Technology, vol. 1, 67–71.
- Kumar, N. y Singhal, O. P. (1991).** *Cholesterol oxides and atherosclerosis: A review.* Journal of the science of food and agriculture, vol. 55, n° 4, 497–510.
- Kurth, L. B. (1986).** *Effect of Pressure–Heat Treatments on Cathepsin B1 Activity.* Journal of Food Science, vol. 51, n° 3, 663–664.
- Lai, S. M., Gray, J. I. y Zabik, M. E. (1995).** *Evaluation of Solid Phase Extraction and Gas Chromatography for Determination of Cholesterol Oxidation Products in Spray–Dried Whole Egg.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 43, n° 5, 1122–1126.
- Lercker, G. y Rodriguez–Estrada, M. T. (2002).** *Cholesterol Oxidation Mechanisms.* En: Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products. Eds. Guardiola, F., Dutta, P., Codony, R. y Savage, G. P. pp 1–25. AOCS Publishing. Champaign, Illinois.
- Lim, K. S., Huang, S. H., Jenner, A., Wang, H. S., Tang, S. Y. y Halliwell, B. (2006).** *Potential artifacts in the measurement of DNA deamination.* Free Radical Bio. Med., vol. 40, n° 11, 1939–1948.

- Linton, M., McClements, J. M. J. y Patterson, M. (1999).** *Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in Orange Juice Using a Combination of High Pressure and Mild Heat.* Journal of food protection, vol. 62, 277–279.
- Liu, X., Lin, W. M., Yan, X. H., Chen, X. H., Hoidal, J. R. y Xu, P. (2003).** *Improved method for measurement of human plasma xanthine oxidoreductase activity.* Journal of Chromatography B, vol. 785, nº 1, 101–114.
- Lizard, G., Monier, S., Cordelet, C., Gesquiere, L., Deckert, V., Gueldry, S., Lagrost, L. y Gambert, P. (1999).** *Characterization and Comparison of the Mode of Cell Death, Apoptosis Versus Necrosis, Induced by 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol and 7-Ketocholesterol in the Cells of the Vascular Wall.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, vol. 19, nº 5, 1190–1200.
- López-Fandiño, R., Carrascosa, A. V. y Olano, A. (1996).** *The Effects of High Pressure on Whey Protein Denaturation and Cheese-Making Properties of Raw Milk.* Journal of dairy science, vol. 79, nº 6, 929–936.
- Lou, S. N. (1998).** *Purine content in grass shrimp during storage as related to freshness.* Journal of Food Science, vol. 63, nº 3, 442–444.
- Lou, S. N., Chen, H. H., Hsu, P. Y. y Chang, D. H. (2005).** *Changes in purine content of tilapia surimi products during processing.* Fisheries Science, vol. 71, nº 4, 889–895.
- Ludwig, H. y Macdonald, G. (2005).** *The significance of the activity of dissolved oxygen, and other gases, enhanced by high hydrostatic pressure.* Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology, vol. 140, nº 4, 387–395.
- Lullien-Pellerin, V. y Balny, C. (2002).** *High-pressure as a tool to study some proteins' properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation.* Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol. 3, nº 3, 209–221.
- Ma, H. J. y Ledward, D. A. (2004).** *High pressure/thermal treatment effects on the texture of beef muscle.* Meat Science, vol. 68, nº 3, 347–355.
- Macdonald, G., Assef, R., Guiffre, A. y Lo, E. (1984).** *Vasoconstrictor effects of uridine and its nucleotides and their inhibition by adenosine.* Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, vol. 11, nº 4, 381–384.

- Mariutti, L., Orlieu, V., Bragagnolo, N. y Skibsted, L. H. (2008).** *Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat.* European Food Research and Technology, vol. 227, n° 2, 337–344.
- Martin, D., Lorenzen, P., Schwertfeger, M., Buchheim, W. y Schlimme, E. (2001).** *Ribonucleosidgehalte in hochdruckbehandelten Milchproben.* Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte, vol. 53, n° 4, 283–293.
- Martin, D., Lorenzen, P. C. y Schrader, K. (2008).** *Influence of high-pressure treatment on ribonucleoside contents and enzyme activities in milk.* Ernährung, vol. 32, n° 2, 56–64.
- Masson, P. (1992).** *Pressure resistance and proteins.* En: High Pressure and Biotechnology. Eds. Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. y Masson, P. pp 89–99. John Libbey Eurotext.
- Mateo, J., Dominguez, M. C., Aguirrezabal, M. M. y Zumalacarregui, J. M. (1996).** *Taste compounds in chorizo and their changes during ripening.* Meat Science, vol. 44, n° 4, 245–254.
- Matser, A. M., Knott, E. R., Teunissen, P. G. M. y Bartels, P. V. (2000).** *Effects of high isostatic pressure on mushrooms.* Journal of Food Engineering, vol. 45, n° 1, 11–16.
- Mattila, P., Hellström, J. y Törrönen, R. (2006).** *Phenolic Acids in Berries, Fruits, and Beverages.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 54, n° 19, 7193–7199.
- McArdle, R., Marcos, B., Kerry, J. P. y Mullen, A. M. (2010).** *Monitoring the effects of high pressure processing and temperature on selected beef quality attributes.* Meat Science, vol. 86, n° 3, 629–634.
- McArdle, R., Marcos, B., Kerry, J. P. y Mullen, A. M. (2010).** *Influence of HPP conditions on selected beef quality attributes and their stability during chilled storage.* Meat Science, vol. 87, n° 3, 274–281.
- McCluskey, S. y Devery, R. (1993).** *Validation of chromatographic analysis of cholesterol oxides in dried foods.* Trends in Food Science & Technology, vol. 4, n° 6, 175–178.
- Mertens, B. (1995).** *Hydrostatic pressure treatment of food: equipment and processing.* En: New Methods of Food Preservation. Eds. Gould, G. W. pp 135–158. Blackie Academic and Professional. London.

**Messens, W., Van Camp, J. y Huyghebaert, A. (1997).** *The use of high pressure to modify the functionality of food proteins.* Trends in Food Science & Technology, vol. 8, nº 4, 107–112.

**Minerich, P. L. y Krug, R. (2003).** *Case study in real world: use of high pressure technology for processing hams.* En: Institute of Food Technology Annual Meeting Book of Abstracts. Chicago, Illinois, 13–16 July. Eds. Institute of Food Technologists. pp 89. Chicago.

**Mithen, R. (2001).** *Glucosinolates, biochemistry, genetics and biological activity.* Plant Growth Regulation, vol. 34, nº 1, 91–103.

**Monahan, F. J., Gray, J. I., Booren, A. M., Miller, E. R., Buckley, D. J., Morrissey, P. A. y Gomma, E. A. (1992).** *Influence of dietary treatment on lipid and cholesterol oxidation in pork.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 40, nº 8, 1310–1315.

**Morales, P., Calzada, J. y Nuñez, M. (2006).** *Effect of High-Pressure Treatment on the Survival of Listeria monocytogenes Scott A in Sliced Vacuum-Packaged Iberian and Serrano Cured Hams.* Journal of food protection, vol. 69, 2539–2543(5).

**Mori, S., Uchida, A., Yamamoto, S., Sultana, A., Tatsumi, R., Mizunoya, W., Suzuki, A. y Ikeuchi, Y. (2007).** *Effect of high pressure on the accumulation of IMP and on the stability of AMP deaminase in rabbit skeletal muscle.* Journal of Food Biochemistry, vol. 31, nº 3, 328–342.

**Mori, S., Yokoyama, A., Iguchi, R., Yamamoto, S., Suzuki, A., Mizunoya, W., Tatsumi, R., Yoshioka, K. y Ikeuchi, Y. (2007).** *Effect of high pressure treatment on cytoplasmic 5'-nucleotidase from rabbit skeletal muscle.* Journal of Food Biochemistry, vol. 31, nº 3, 314–327.

**Morin, R. J., Hu, B., Peng, S. K. y Sevanian, A. (1991).** *Cholesterol oxides and carcinogenesis.* Journal of clinical laboratory analysis, vol. 5, nº 3, 219–225.

**Northrop, D. B. (2002).** *Effects of high pressure on enzymatic activity.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology, vol. 1595, nº 1–2, 71–79.

**Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L. A. (1987).** *Cholesterol Oxides in Swedish Foods and Food Ingredients: Fresh Eggs and Dehydrated Egg Products.* Journal of Food Science, vol. 52, nº 1, 57–62.

Novelli, E., Zanardi, E., Ghiretti, G. P., Campanini, G., Dazzi, G., Madarena, G. y Chizzolini, R. (1998). *Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame Milano and Mortadella*. Meat Science, vol. 48, n° 1–2, 29–40.

Oey, I., Lille, M., Van Loey, A. y Hendrickx, M. E. (2008b). *Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review*. Trends in Food Science & Technology, vol. 19, n° 6, 320–328.

Oey, I., Van der Plancken, I., Van Loey, A. y Hendrickx, M. E. (2008a). *Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems?* Trends in Food Science & Technology, vol. 19, n° 6, 300–308.

Oh, H. E., Hemar, Y., Anema, S. G., Wong, M. y Pinder, N. D. (2008). *Effect of high-pressure treatment on normal rice and waxy rice starch-in-water suspensions*. Carbohydrate Polymers, vol. 73, n° 2, 332–343.

Ohshima, T., Ushio, H. y Koizumi, C. (1993). *High-pressure processing of fish and fish products*. Trends in Food Science & Technology, vol. 4, n° 11, 370–375.

Orlien, V., Hansen, E. y Skibsted, L. H. (2000). *Lipid oxidation in high-pressure processed chicken breast muscle during chill storage: critical working pressure in relation to oxidation mechanism*. European Food Research and Technology, vol. 211, n° 2, 99–104.

Ortea, I., Rodríguez, A., Tabilo-Munizaga, G., Pérez-Won, M. y Aubourg, S. (2010). *Effect of hydrostatic high-pressure treatment on proteins, lipids and nucleotides in chilled farmed salmon (*Oncorhynchus kisutch*) muscle*. European Food Research and Technology, vol. 230, n° 6, 925–934.

Osada, K., Kodama, T., Yamada, K. y Sugano, M. (1993). *Oxidation of cholesterol by heating*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 41, n° 8, 1198–1202.

Osada, K., Sasaki, E. y Sugano, M. (1994). *Lymphatic absorption of oxidized cholesterol in rats*. Lipids, vol. 29, n° 8, 555–559.

Park, S. W. y Addis, P. B. (1991). *Method of analysis of cholesterol oxides*. En: Biological Effects of Cholesterol Oxides. Eds. Peng, S. K. y Morin, R. J. pp 33–70. CRC Press. Boca Raton, FL.

Park, S. W. y Addis, P. B. (1987). *Cholesterol oxidation-products in some muscle foods*. Journal of Food Science, vol. 52, n° 6, 1500–1503.



- Park, S. W. y Addis, P. B. (1986).** *Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 34, n° 4, 653–659.
- Park, S. W., Guardiola, F., Park, S. H. y Addis, P. B. (1996).** *Kinetic evaluation of 3 beta-hydroxycholest-5-en-7-one (7-ketocholesterol) stability during saponification.* Journal of the American Oil Chemists Society, vol. 73, n° 5, 623–629.
- Patras, A., Brunton, N., Da Pieve, S. y Butler, F. (2009a).** *Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purees.* Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol. 10, n° 3, 308–313.
- Paul, A. A. y Southgate, D. A. T. (1978).** *McCance and Widdowson's The composition of foods.* Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp. 418.
- Penazzi, G., Caboni, M. F., Zunin, P., Evangelisti, F., Tiscornia, E., Gallinatoschi, T. y Lercker, G. (1995).** *Routine high performance liquid chromatographic determination of free 7-ketocholesterol in some foods by two different analytical methods.* Journal of American Oil Chemistry Society, vol. 72, n° 12, 1523–1527.
- Petron, M. J., García-Regueiro, J. A., Martín, L., Muriel, E. y Antequera, T. (2003).** *Identification and quantification of cholesterol and cholesterol oxidation products in different types of Iberian hams.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 51, n° 19, 5786–5791.
- Pie, J. E., Spahis, K. y Seillan, C. (1990).** *Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 38, n° 4, 973–979.
- Piñeiro-Sotelo, M., de Quiros, A. R. B., Lopez-Hernandez, J. y Simal-Lozano, J. (2002).** *Determination of purine bases in sea urchin (*Paracentrotus lividus*) gonads by high-performance liquid chromatography.* Food Chemistry, vol. 79, n° 1, 113–117.
- Podsedek, A. (2007).** *Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review.* Food Science and Technology, vol. 40, n° 1, 1–11.
- Pothakamury, U. R., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. y Meyer, R. (1995).** *The pressure builds for better food processing.* Chemical Engineering Progress, vol. 110, 45–53.

- Quaglia, G. B., Gravina, R., Paperi, R. y Paoletti, F. (1996). *Effect of high pressure treatments on peroxidase activity, ascorbic acid content and texture in green peas*. Food Science and Technology, vol. 29, n° 5–6, 552–555.
- Rivas–Cañedo, A., Fernández–García, E. y Nuñez, M. (2009). *Volatile compounds in fresh meats subjected to high pressure processing: Effect of the packaging material*. Meat Science, vol. 81, n° 2, 321–328.
- Rodríguez–Alcalá, L. M., Harte, F. y Fontecha, J. (2009). *Fatty acid profile and CLA isomers content of cow, ewe and goat milks processed by high pressure homogenization*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol. 10, n° 1, 32–36.
- Rodríguez–Estrada, M. T., Penazzi, G., Caboni, M. F., Bertacco, G. y Lercker, G. (1997). *Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburgers*. Meat Science, vol. 45, n° 3, 365–375.
- Rose–Sallin, C., Huggett, A. C., Bosset, J. O., Tabacchi, R. y Fay, L. B. (1995). *Quantification of cholesterol oxidation–products in milk powders using [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 43, n° 4, 935–941.
- Rubens, P., Snauwaert, J., Heremans, K. y Stute, R. (1999). *In situ observation of pressure–induced gelation of starches studied with FTIR in the diamond anvil cell*. Carbohydrate Polymers, vol. 39, n° 3, 231–235.
- Rubio, B., Martínez, B., González–Fernández, C., García–Cachán, M. D., Rovira, J. y Jaime, I. (2006). *Influence of storage period and packaging method on sliced dry cured beef "Cecina de Leon": Effects on microbiological, physicochemical and sensory quality*. Meat Science, vol. 74, n° 4, 710–717.
- Ruiz–Capillas, C., Carballo, J. y Jiménez Colmenero, F. (2007). *Biogenic amines in pressurized vacuum–packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions*. Meat Science, vol. 75, n° 3, 397–405.
- Saccani, G., Parolari, G., Tanzi, E. y Rabbuti, S. (2004). *Sensory and microbiological properties of dried hams treated with high hydrostatic pressure*. Proceedings of 50th international congress of meat science and technology, 726–729.
- Safranow, K. y Machoy, Z. (2005). *Simultaneous determination of 16 purine derivatives in urinary calculi by gradient reversed–phase high–performance*

*liquid chromatography with UV detection*. Journal of Chromatography B, vol. 819, n° 2, 229–235.

**Safranow, K., Machoy, Z. y Ciechanowski, K. (2000).** *Analysis of purines in urinary calculi by high-performance liquid chromatography*. Analytical Biochemistry, vol. 286, n° 2, 224–230.

**Saito, T., Arai, K. y Matsuyoshi, M. (1959).** *A new method for estimating the freshness of fish*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, vol. 24, 749–750.

**Saldanha, T., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. N. y Bragagnolo, N. (2006).** *HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: Comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 54, n° 12, 4107–4113.

**Saldo, J., Fernández, A., Sendra, E., Butz, P., Tauscher, B. y Guamis, B. (2003).** *High pressure treatment decelerates the lipolysis in a caprine cheese*. Food Research International, vol. 36, n° 9–10, 1061–1068.

**Sallin, C., Baumann, E., Bütikofer, U., Sieber, R. y Bosset, J. O. (1993).** *Contribution to oxidized cholesterol determination in milk and milk products. I: Possibilities and limits of RP-HPLC techniques*. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, vol. 84, n° 1, 141–157.

**Sampaio, G. R., Bastos, D. H. M., Soares, R. A. M., Queiroz, Y. S. y Torres, E. A. F. S. (2006).** *Fatty acids and cholesterol oxidation in salted and dried shrimp*. Food Chemistry, vol. 95, n° 2, 344–351.

**Sanchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B. y Cano, M. P. (2006).** *Impact of high-pressure and traditional thermal processing of tomato puree on carotenoids, vitamin C and antioxidant activity*. Journal of the Science of Food and Agriculture, vol. 86, n° 2, 171–179.

**Sangronis, E., Pothakamury, U. R., Ramos, A., Ibarz, A., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. (1997).** *La alta presión hidrostática : Una alternativa en el procesamiento no térmico de alimentos*. Alimentaria, vol. 283, 1–4.

**Schlotte, V., Sevanian, A., Hochstein, P. y Weithmann, K. U. (1998).** *Effect of uric acid and chemical analogues on oxidation of human low density lipoprotein in vitro*. Free Radical Biology and Medicine, vol. 25, n° 7, 839–847.

- Schmarr, H. G., Gross, H. B. y Shibamoto, T. (1996). *Analysis of polar cholesterol oxidation products: Evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction, and gas chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 44, n° 2, 512–517.
- Seegmiller, J. E., Laster, L. y Howell, R. R. (1963). *Biochemistry of uric acid and its relation to gout*. The New England journal of Medicine, vol. 268, n° 15, 821.
- Serra, X., Grèbol, N., Guardia, M. D., Guerrero, L., Gou, P., Masoliver, P., Gassiot, M., Sárraga, C., Monfort, J. M. y Arnau, J. (2007b). *High pressure applied to frozen ham at different process stages. 2. Effect on the sensory attributes and on the colour characteristics of dry-cured ham*. Meat Science, vol. 75, n° 1, 21.
- Serra, X., Sárraga, C., Grèbol, N., Guardia, M. D., Guerrero, L., Gou, P., Masoliver, P., Gassiot, M., Monfort, J. M. y Arnau, J. (2007a). *High pressure applied to frozen ham at different process stages. 1. Effect on the final physicochemical parameters and on the antioxidant and proteolytic enzyme activities of dry-cured ham*. Meat Science, vol. 75, n° 1, 12–20.
- Sevanian, A., Bittolo-Bon, G., Cazzolato, G., Hodis, H., Hwang, J., Zamburlini, A., Maiorino, M. y Ursini, F. (1997). *LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein*. Journal of lipid research, vol. 38, n° 3, 419–428.
- Severini, C., Baiano, A., Rovere, P., Dall'Aglio, G. y Massini, R. (2002). *Effect of high pressure on olive oil oxidation and the maillard reaction in model and food systems*. Italian Journal of Food Science, vol. 14, n° 3, 225–234.
- Shibutani, S. y Kinoshita, K. (1969). *A study on food nutritive constituents of Turnip varieties grown in Japan*. Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Okayama University, vol. 33, n° 1, 9–19.
- Shigehisa, T., Ohmori, T., Saito, A., Taji, S. y Hayashi, R. (1991). *Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products*. International journal of food microbiology, vol. 12, n° 2–3, 207–215.
- Shoji, T. y Saeki, H. (1989). *Processing and preservation of fish meat by pressurization*. En: Use of High Pressure in Food. Eds. Hayashi, R. pp 75–87. San-Ei Publishing Co. Kyoto, Japan.
- Sila, D. N., Duvetter, T., De Roeck, A., Verlent, I., Smout, C., Moates, G. K., Hills, B. P., Waldron, K. K., Hendrickx, M. E. y Van Loey, A. (2008). *Texture*

*changes of processed fruits and vegetables: potential use of high-pressure processing.* Trends in Food Science & Technology, vol. 19, nº 6, 309–319.

**Simpson, R. K. y Gilmour, A. (1997).** *The effect of high hydrostatic pressure on Listeria monocytogenes in phosphate-buffered saline and model food systems.* Journal of Applied Microbiology, vol. 83, nº 2, 181–188.

**Smeller, L. (2002).** *Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology, vol. 1595, nº 1–2, 11–29.

**Smelt, J. P., Hellemons, J. C. y Patterson, M. (2002).** *Effects of high pressure on vegetative microorganisms.* En: Ultra High Pressure Treatments of Foods. Eds. Hendrickx, M. E. y Knorr, D. pp 55–76. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.

**Smith, L. L. (1981).** *Cholesterol autoxidation.* Plenum Press. New York.

**Souza, C.M., Boler, D.D., Clark, D.L., Kutzler, L.W., Holmer, S.F., Summerfield, J.W., Cannon, J.E., Smit, N.R., McKeith, F.K. y Killefer, J. (1998).** *The effects of high pressure processing on pork quality, palatability, and further processed products.* Meat Science, vol. 87, nº 4, 419–427.

**Spurvey, S., Pan, B. S. y Shahidi, F. (1998).** *Flavour of shellfish.* En: Flavour of Meat, Meat Products and Seafoods. Eds. Shahidi, F. pp 159–196. Blackie Academic and Professional. London, U.K.

**Staprans, I., Pan, X. M., Rapp, J. H. y Feingold, K. R. (1998).** *Oxidized Cholesterol in the Diet Accelerates the Development of Aortic Atherosclerosis in Cholesterol-Fed Rabbits.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, vol. 18, nº 6, 977–983.

**Stute, R., Heilbronn, Klingler, R. W., Boguslawski, S., Eshtiaghi, M. N. y Knorr, D. (1996).** *Effects of High Pressures Treatment on Starches.* Starch - Stärke, vol. 48, nº 11–12, 399–408.

**Tanzi, E., Saccani, G., Barbuti, S., Grisenti, M. S., Lori, D. y Bolzoni, S. (2004).** *High-pressure treatment of raw ham. Sanitation and impact on quality.* Industria Conserve, vol. 79, 37–50.

**Tauscher, B. (1999).** *Chemical reactions of food components under high hydrostatic pressure.* En: Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology: Proceedings of the International Conference on High Pressure

Bioscience and Biotechnology, Heidelberg, August 30–September 3, 1998. Eds. Ludwig, H. pp 363–366. Springer. Heidelberg.

**Télez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., Pérez-Lamela, C., Vázquez, M. y Simal-Gándara, J. (2001).** *Aplicación de alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos.* Ciencia y Tecnología de los Alimentos, vol. 3, nº 2, 66–80.

**Terzuoli, L., Porcelli, B., Setacci, C., Giubolini, M., Cinci, G., Carlucci, F., Pagani, R. y Marinello, E. (1999).** *Comparative determination of purine compounds in carotid plaque by capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography B, vol. 728, nº 2, 185–192.

**Tewari, G., Jayas, S. D. y Holley, A. R. (1999).** *High pressure processing of foods: an overview.* Science des aliments, vol. 19, nº 6, 619–661.

**Tikk, M., Tikk, K., Torngren, M. A., Meinert, L., Aaslyng, M. D., Karlsson, A. H. y Andersen, H. J. (2006).** *Development of inosine monophosphate and its degradation products during aging of pork of different qualities in relation to basic taste and retronasal flavor perception of the meat.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 54, nº 20, 7769–7777.

**Toldrá, F. y Flores, M. (2006).** *Processed Pork Meat Flavors.* En: Handbook of Food Products Manufacturing. Eds. Hui, Y. H. pp 281–301. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.

**Toldrá, F. y Flores, M. (1998).** *The Role of Muscle Proteases and Lipases in Flavor Development During the Processing of Dry-Cured Ham.* Critical reviews in food science and nutrition, vol. 38, nº 4, 331–352.

**Toldrà, M., Dàvila, E., Saguer, E., Fort, N., Salvador, P., Parés, D. y Carretero, C. (2008).** *Functional and quality characteristics of the red blood cell fraction from biopreserved porcine blood as influenced by high pressure processing.* Meat Science, vol. 80, nº 2, 380–388.

**Torres, J. A. y Velázquez, G. (2005).** *Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods.* Journal of Food Engineering, vol. 67, nº 1–2, 95–112.

**Trejo-Araya, X. I., Hendrickx, M. E., Verlinden, B. E., Van Buggenhout, S., Smale, N., Stewart, C. M. y Mawson, A. J. (2007).** *Understanding texture changes*

*of high pressure processed fresh carrots: A microstructural and biochemical approach.* Journal of Food Engineering, vol. 80, n° 3, 873–884.

**Tuboly, E., Lebovics, V. K., Gaál, Ö., Mészáros, L. y Farkas, J. (2003).** *Microbiological and lipid oxidation studies on mechanically deboned turkey meat treated by high hydrostatic pressure.* Journal of Food Engineering, vol. 56, n° 2–3, 241–244.

**U.S. Department of Health and Human Services (1998).** *Coronary Heart Disease.* The Surgeon General's Report on Nutrition and Health, vol. 58, 88–93.

**Ueno, S., Hayashi, M., Shigematsu, T. y Fujii, T. (2009).** *Formation of green–blue compounds in Brassica rapa root by high pressure processing and subsequent storage.* Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, vol. 73, n° 4, 943–945.

**Ueno, Y., Ikeuchi, Y. y Suzuki, A. (1999).** *Effects of high pressure treatments on intramuscular connective tissue.* Meat Science, vol. 52, n° 2, 143–150.

**Ulberth, F. y Buchgraber, M. (2002).** *Extraction and purification of cholesterol oxidation products.* En: Cholesterol and Phytosterol Oxidation Production: Analysis, Occurrence, and Biological Effects. Eds. Guardiola, F., Dutta, P., Codony, R. y Savage, G. P. pp 27–49. AOCS Press. Champaign, IL.

**Ulberth, F. y Rossler, D. (1998).** *Comparison of Solid–Phase Extraction Methods for the Cleanup of Cholesterol Oxidation Products.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 46, n° 7, 2634–2637.

**Valenzuela, A., Sanhueza, J. y Nieto, S. (2003).** *Cholesterol oxidation: Health hazard and the role of antioxidants in prevention.* Biological research, vol. 36, n° 3–4, 291–302.

**Van Eylen, D., Bellostas, N., Strobel, B. W., Oey, I., Hendrickx, M. E., Van Loey, A., Sørensen, H. y Sørensen, J. C. (2009).** *Influence of pressure/temperature treatments on glucosinolate conversion in broccoli (Brassica oleracea L. cv Italica) heads.* Food Chemistry, vol. 112, n° 3, 646–653.

**Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M. E. y Van Loey, A. (2008).** *Effects of pressure/temperature treatments on stability and activity of endogenous broccoli (Brassica oleracea L. cv. Italica) myrosinase and on cell permeability.* Journal of Food Engineering, vol. 89, n° 2, 178–186.

**Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M. E. y Van Loey, A. (2007).** *Kinetics of the stability of broccoli (Brassica oleracea cv. Italica) myrosinase and isothiocyanates in broccoli juice during pressure/temperature treatments.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 55, nº 6, 2163–2170.

**Veciana–Nogues, M. T., Izquierdo–Pulido, M. y Vidal–Carou, M. C. (1997).** *Determination of ATP related compounds in fresh and canned tuna fish by HPLC.* Food Chemistry, vol. 59, nº 3, 467–472.

**Vestergaard, C. S. y Parolari, G. (1999).** *Lipid and cholesterol oxidation products in dry-cured ham.* Meat Science, vol. 52, nº 4, 397–401.

**Villacís, M. F., Rastogi, N. K. y Balasubramaniam, V. M. (2008).** *Effect of high pressure on moisture and NaCl diffusion into turkey breast.* LWT–Food Science and Technology, vol. 41, nº 5, 836–844.

**Wada, S. (1992).** *Quality and lipid change of sardine meat by high pressure treatment.* En: High Pressure and Biotechnology. Eds. Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. y Masson, P. pp 235–238. J. Libbey Eurotext.

**Watanabe, A., Tsuneishi, E. y Takimoto, Y. (1989).** *Analysis of ATP and Its Breakdown Products in Beef by Reversed-Phase HPLC.* Journal of Food Science, vol. 54, nº 5, 1169–1172.

**Yaldagard, M., Mortazavi, S. A. y Tabatabaie, F. (2008).** *The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects.* African Journal of Biotechnology, vol. 7, nº 16, 2739–2767.

**Yano, Y., Kataho, N., Watanabe, M., Nakamura, T. y Asano, Y. (1995).** *Evaluation of beef aging by determination of hypoxanthine and xanthine contents. Application of a xanthine sensor.* Food Chemistry, vol. 52, nº 4, 439–445.

**Yen, G. C. y Lin, H. T. (1996).** *Comparison of high pressure treatment and thermal pasteurization effects on the quality and shelf life of guava puree.* International Journal of Food Science & Technology, vol. 31, nº 2, 205–213.

**Yin, J. L., Chaufour, X., McLachlan, C., McGuire, M., White, G., King, N. y Hambly, B. (2000).** *Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by cholesterol and its oxides in vitro and in vivo.* Atherosclerosis, vol. 148, nº 2, 365–374.



**Yoshioka, K., Kage, Y. y Omura, H. (1992).** *Effect of high pressure on texture and ultrastructure of fish and chicken muscles and their gels*. En: High Pressure and Biotechnology (Colloque INSERM Vol. 224). Eds. Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. y Masson, P. pp 325–327. John Libbey Eurotext/Les Editions INSERM. Montrouge, France.

**Zanardi, E., Novelli, E., Ghiretti, G. P. y Chizzolini, R. (2000).** *Oxidative stability of lipids and cholesterol in salame Milano, coppa and Parma ham: dietary supplementation with vitamin E and oleic acid*. Meat Science, vol. 55, n° 2, 169–175.

**Zen, J. M., Lai, Y. Y., Yang, H. H. y Kumar, A. (2002).** *Multianalyte sensor for the simultaneous determination of hypoxanthine, xanthine and uric acid based on a preanodized nontronite-coated screen-printed electrode*. Sensors and Actuators B: Chemical, vol. 84, n° 2–3, 237–244.

**Zhang, H., Li, L., Tatsumi, E. y Isobe, S. (2005).** *High-pressure treatment effects on proteins in soy milk*. LWT–Food Science and Technology, vol. 38, n° 1, 7–14.

**Zöllner, N. (1982).** *Purine and pyrimidine metabolism*. Proceedings of the Nutrition Society, vol. 41, n° 03, 329–342.

**Zubillaga, M. P. y Maerker, G. (1984).** *Modified Dry Column Procedure for Extraction of Lipids from Cured Meats*. Journal of Food Science, vol. 49, n° 1, 107–109.

**Zunin, P., Evangelisti, F., Caboni, M. F., Penazzi, G., Lercker, G. y Tiscornia, E. (1995).** *Cholesterol Oxidation in Baked Foods Containing Fresh and Powdered Eggs*. Journal of Food Science, vol. 60, n° 5, 913–915.