

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE EL PERFIL DE  
AMINOÁCIDOS LIBRES EN JAMÓN DE CERDO ENVASADO EN PELÍCULA  
RETORTABLE**

**Por:**

**Fredy Humberto Herrera**

**Guillermo León Valencia**

**Natalia Llano**

**Asesor:**

**Rafael Mariano Álvarez Quintero, PhD**

**CORPORACION UNIVERSITARIA LASALLISTA  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
ESPECIALIZACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN  
CALDAS – ANTIOQUIA**

**2013**

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	3
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN .....	5
1. MARCO DE REFERENCIA .....	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
2.1 Obtención y esterilización de muestras .....	18
2.2 Condiciones experimentales de esterilización .....	18
2.3 Extracción y derivatización de aminoácidos libres en muestras de jamón .....	19
2.4 Cromatografía de gases-espectrometría de masas .....	19
2.5 Identificación y cuantificación de aminoácidos .....	19
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
3.1 Optimización de condiciones de operación y esterilidad comercial .....	21
3.2 Perfil químico de aminoácidos mediante GC/MS .....	21
4. CONCLUSIONES .....	26
BIBLIOGRAFÍA .....	27

## RESUMEN

Los aminoácidos se diferencian solo en la naturaleza química de la cadena lateral o grupo R, las propiedades físico-químicas, como la carga neta, la solubilidad, las posibilidades de reaccionar con otros aminoácidos o compuestos hace que este tipo de analitos tengan gran reactividad química. Interacciones entre los grupos laterales de los aminoácidos (aa) que dan lugar a la formación de enlaces pseudopeptídicos y de lisinoalanina, interacciones de carbohidratos con proteínas y/o aminoácidos: reacción de Maillard, que se inicia con la reacción entre un grupo amino y un compuesto carbonilo, entre el grupo amino de lisina y el grupo amino de asparagina y glutamina, hacen que disminuya el valor nutritivo a causa de la baja biodisponibilidad de los aminoácidos lisina y arginina e incluso pueden originar compuestos tóxicos. Los análisis se realizaron utilizando un sistema de Agilent 7890A equipado con un automuestreador automático de líquidos y detector selectivo de masas 5975C. La separación de la sustancias se realizó en una columna capilar HP-5MS (1% fenilpolimetilsiloxano. 30 m, 0,25 mm de diámetro, espesor de la película 0.25  $\mu\text{m}$ , J&W Scientific, EE.UU.).

El análisis del grupo de aminoácidos libres reportó para el grupo de muestras control un contenido mayor de los aminoácidos Ala y Lys (en promedio 9.83 y 9.64  $\mu\text{g}/100$  gr de jamón, respectivamente), en general los grupos de muestras de los tratamientos T1, T2, T3 y T4 presentaron alteración del contenido de la mayoría de los aminoácidos. En condiciones de retorta, se observó como al prolongar el tiempo de exposición al calor se obtienen mayor degradación de Lys, esto significó un efecto desfavorable y significativo en la calidad nutricional para las condiciones de operación T1 y se presentó aumento del contenido de Cistina (Cys-s) en relación con la temperatura y con tiempos de exposición prolongados. La cistina se identificó como un neo compuesto que podría servir como marcador tecnológico propio de las condiciones de retorta a la que fue sometido el jamón.

**Palabras clave:** retorta, aminoácidos, GC/MS, lisina.

## ABSTRACT

The amino acids differ only in the chemical nature of the R group side chain or the physicochemical properties, such as net charge, solubility, possibilities of reacting with other amino acids or compounds makes this type have high reactivity of chemical analytes. Interactions between the side groups of amino acids (aa) that lead to the formation of lysinoalanine and pseudopeptide bonds, carbohydrate interactions with proteins and / or amino acids of Maillard reaction, which begins with the reaction between an amino group and a carbonyl compound between the amino group of lysine and the amino group of asparagine and glutamine, are diminishing the nutritional value because of the low bioavailability of the amino acids lysine and arginine and can even lead to toxic compounds. Analyses were performed using an Agilent 7890A system

equipped with an autosampler and automatic liquid mass selective detector 5975C. The separation of the substances is performed on a HP-5MS capillary column (1% fenilpolimetilsiloxano. 30 m, diameter 0.25 mm, film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ , J&W Scientific, USA).

Analysis of the free amino group of the group reported for control samples containing more of the amino acids Ala and Lys (average of 9.83 and 9.64  $\mu\text{g}/100$  g of ham, respectively), in general the groups of samples of T1, T2, T3 and T4 showed alteration of the content of most amino acids. In retort conditions, was observed as to prolong the time of exposure to heat are obtained further degradation of Lys, this represented a significant and adverse effect on the nutritional quality for T1 and operating conditions are presented increased content of cystine (Cys -s) in connection with the temperature and with longer exposure times. Cystine was identified as a neo marker compound that serves as its own technological retort conditions to which he was subjected ham.

**Key words:** retort, amino acid, CG/MS, lysine.

## INTRODUCCIÓN

Los empaques retortables son una tecnología de embalaje creada por tratamiento aséptico, hecho de múltiples capas de laminado flexible, que permite la conservación de los productos alimenticios por largo tiempo, permitiendo el envasado estéril de una amplia variedad de alimentos y bebidas. Hasta hace muy poco tiempo los empaques retortables eran fabricados a partir de vidrio o de metal, debido a que ningún otro material podía soportar el esfuerzo térmico del retortado (o tratamiento en autoclave) [1]. Fueron inicialmente desarrollados para productos de uso militar en los años 50. Este desarrollo fue justificado por las ventajas de costo y facilidad de manipulación que ofrecían, frente al envase común de hojalata. Si bien el desarrollo y utilización de esta tecnología en Latinoamérica ha sido lento debido a la competencia de las industrias bien establecidas de productos congelados y enlatados, en Japón el desarrollo de esta industria ha sido rápido y ahora es el envase más usado en los productos procesados térmicamente, gracias a beneficios como la minimización de costos de transporte, la reducción en los tiempos de tratamiento térmico y su consiguiente conservación del sabor de los alimentos, y la reducción del espacio de almacenamiento. En todo el mundo, existe un potencial de 50.000 millones de empaques retortables de todo tipo, de los cuales 15.000 corresponden a América del Norte, 10.000 a Europa, y más de 1.000 millones a Japón. La cifra para América Latina es inferior a la de Japón, y su tamaño y valor serán influenciados en el futuro próximo por las mismas razones que hicieron que los empaques retortables se impusieran en los otros mercados. Este crecimiento ocurre a expensas del mercado de los enlatados, principalmente.

Sin embargo, a pesar de que estos empaques ofrecen un producto con mejores características organolépticas, no se ha profundizado cómo se afectan la calidad y la cantidad de los nutrientes que contiene el alimento, luego de pasar por el proceso de esterilización requerido para los materiales retortables. En este trabajo, se desea analizar si el tratamiento térmico para productos retortables, aplicado a jamón de cerdo, afecta la cantidad de aminoácidos y de una forma más específica de lisina, por ser este más sensible a tratamientos térmicos.

En la actualidad se reconoce que los productos cárnicos aportan a la dieta humana proteínas caracterizadas por dos rasgos de interés nutricional: Una excelente digestibilidad, es decir, casi todos sus aminoácidos resultan absorbidos por el organismo una vez que dichas proteínas han sido ingeridas, un aporte de porcentajes equilibrados de los nueve aminoácidos esenciales: fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano, valina, e histidina.

Entre los aminoácidos esenciales, suele ser la metionina el que ofrece mayores dificultades para satisfacer las cantidades requeridas por las necesidades dietéticas diarias. En consecuencia, las carnes son muy ricas en proteínas de

alto valor biológico, que puede resultar algo disminuido por el escaso aporte de aminoácidos azufrados y porque los niveles de fenilalanina y triptófano no son los más adecuados para cubrir las necesidades requeridas por el organismo. A pesar de todo, suelen ser una de las principales fuentes de lisina en las dietas más comunes.

## 1. MARCO DE REFERENCIA

Todos los productos alimenticios necesitan protección, y la preservación de las propiedades del alimento desde el procesamiento hasta el consumidor requiere de envases apropiados para tal fin. Los productos esterilizados por retorta están obteniendo mayor aceptación comercial, en gran parte debido a su mayor comodidad y calidad que los ofrecidos por los productos enlatados. La evaluación de la estabilidad a largo plazo de estos productos con almacenamiento a temperatura ambiente pueden identificar las áreas potenciales de mejora, y en definitiva, incrementar la satisfacción del consumidor con estas tecnologías [1].

Las tendencias globales en cuanto el uso de empaques para la industria alimentaria, ha demostrado que los materiales poliméricos reemplazan rápidamente a los materiales tradicionales como el vidrio y el metal principalmente, sin embargo, los diferentes tipos de láminas (películas) de plástico han proporcionado el uso generalizado de envases flexibles en forma de materiales multicapas combinados [2]. Pueden encontrarse buenas combinaciones de láminas de polímeros que ofrecen protección al alimento, entre los cuales se encuentran la poliamida (PA), poliéster (PET), polipropileno (PP), polietileno (LDPE), polietileno lineal (LLDPE), polietilvinilalcohol (EVOH), foils de aluminio y Nylon. El tratamiento térmico por esterilización (120°C por 20 min) destruye efectivamente microorganismos patógenos [3,4] y ha sido usado ampliamente. Los tratamientos térmicos de esterilización tienen condiciones específicas de presión, tiempo y temperatura de acuerdo a la naturaleza del producto y al  $F_0$  calculado, sin embargo, algunos autores han planteado el método de esterilización por retorta acompañado de Inducción Electromagnética de Alta Frecuencia (EMI) como alternativa de conservación que ha demostrado su capacidad para inactivar microorganismos causantes del deterioro sin afectar significativamente las propiedades nutritivas de varios alimentos [2].

Es importante partir del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los materiales y su comportamiento durante los métodos de transformación con el fin de seleccionar la combinación correcta de materiales y condiciones de proceso para un producto determinado; de igual forma, la información relativa sobre como las propiedades del producto cambiarán durante su procesamiento y vida en anaquel también es importante, ya que todos los materiales poliméricos generalmente “envejecen” en alguna forma dependiendo de su entorno operativo (estrés mecánico, presión, temperatura, componentes del alimento, tiempo de almacenamiento, exposición a la luz).

La seguridad de los productos tratados térmicamente postproceso, particularmente retortables, depende en gran medida del material de empaque en el que se embala. Las principales características de las películas plásticas, que se utilizan en la fabricación de alimentos poseen propiedades de alta barrera contra la permeabilidad de los gases y buenas propiedades mecánicas contra el daño, por lo tanto, se han realizado muchos estudios sobre las

propiedades de distintas películas coextruidas que se utilizan en la industria alimentaria [6].

Muchos estudios han tratado sobre aminoácidos y sus cambios durante la termoesterilización de los alimentos. Sin embargo, se ha prestado poca atención a la evaluación de la pérdida de aminoácidos o de proteínas de gran valor biológico durante el almacenamiento.

La temperatura de procesamiento no solo afecta a los microorganismos, también puede resultar en la reducción del valor nutricional y sus propiedades sensoriales como: el color y consistencia, en los productos esterilizados. Las reacciones de Maillard, degradación de Strecker, oxidación de lípidos, interacciones de proteínas con lípidos oxidados y degradación de vitaminas pueden ser consideradas como las reacciones más significativas causadas por la termoesterilización. Esas reacciones, especialmente las reacciones de pardeamiento no enzimático, pueden ocurrir no solo durante el procesamiento, si no también durante el tiempo de almacenamiento, donde la temperatura también puede limitar la vida útil del producto. El valor nutricional de alimentos esterilizados y almacenados por largos periodos de tiempo decrece debido a la destrucción de aminoácidos esenciales, pérdida de vitaminas y ácidos grasos y producción de componentes antinutritivos y tóxicos [7, 8, 10,11].

La esterilización de los materiales alimenticios mediante calentamiento destruye bacterias, levaduras, mohos y otros organismos que provocan la descomposición, y también destruyen organismos patógenos que producen toxinas letales si no se destruyen. La tasa de destrucción de microorganismos varía con la cantidad de calentamiento y el tipo de los organismos.

Algunas bacterias pueden tener crecimiento vegetativo, pueden presentar estados en forma latente, o de spora. La destrucción de los microorganismos mediante métodos de calentamiento significa una pérdida de viabilidad y no una destrucción en el sentido físico. Si se supone que inactivar una sola enzima en una célula produce la inactivación de la célula, entonces, en una suspensión de microorganismos de una sola especie a temperatura constante, la tasa de muertes se puede expresar como una ecuación cinética de primer orden. La tasa de destrucción (número de muertes por unidad de tiempo) es proporcional al número de organismos. Entonces  $\frac{dN}{dt} = -kN$ , donde N es el número de organismos viables en un tiempo dado, t es el tiempo en minutos y k es una constante de velocidad de reacción en minutos<sup>-1</sup>. La constante de velocidad de reacción está en función de la temperatura y del tipo de microorganismo.

Para la determinación del tiempo del proceso térmico para la esterilización respecto a los alimentos enlatados, el *Clostridium botulinum* es el principal organismo cuyo número se debe reducir. Se ha establecido que el proceso de calentamiento mínimo debe reducir el número de esporas por un factor de  $10^{12}$ , puesto que, D es el tiempo para reducir el número original en  $10^{-1}$ . Por lo general el nivel de esterilidad N es un número mucho menor que un organismo. Estos tiempos no representan una esterilización completa sino, un concepto

matemático que, según se ha encontrado empíricamente, produce una esterilización efectiva.

Para el microorganismo *Cl. botulinum* tiene el valor experimental de  $Z=10^{\circ}\text{C}$ . Esto significa que cada aumento de  $10^{\circ}\text{C}$  en la temperatura hará aumentar a la tasa de muerte en un factor de 10. Cuando se utiliza la ecuación  $t=D_T \log_{10} \frac{N_0}{N}$ , al sustituir  $T=121^{\circ}\text{C}$  como la temperatura estándar en esta ecuación y al sustituir  $F_0$  por  $t$ ,  $F_0=D_{121} \log_{10} \frac{N_0}{N}$ , donde el valor  $F_0$  de un proceso es el tiempo  $t$  en minutos a  $121,1^{\circ}\text{C}$  que producirá el mismo grado de esterilización que el proceso dado a la temperatura  $T$ .

Al combinar ambas ecuaciones la  $F_0$  del proceso dado a la temperatura:

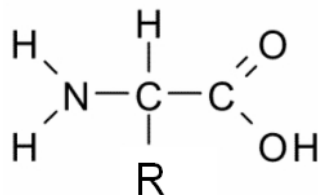
$T$  es  $F_0=t*10^{(T^{\circ}\text{C}-121.1)/(Z^{\circ}\text{C})}$ , este es el valor  $F_0$  en minutos para el proceso térmico dado a una temperatura constante  $T^{\circ}\text{C}$  y un tiempo dado  $t$  en minutos. [13]

Los efectos de procesos de esterilización diferentes pero sucesivos en un material dado son aditivos. Por lo tanto, si hay varias etapas de temperaturas  $T_1, T_2$ , etc. Cada una con diferentes tiempos  $t_1, t_2$ , etc. Los valores  $F_0$  para cada etapa se suman para dar el  $F_0$  total.

### 1.1 Impacto del proceso de esterilización sobre lisina y el perfil químico de aminoácidos libres

Los aminoácidos contienen, por lo menos, un grupo amino primario ( $-\text{NH}_2$ ) y un grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), el grupo amino primario ocupa una posición  $\alpha$  con relación al grupo carboxilo, ver figura 1. Donde  $R$  se denomina cadena lateral, que puede ser un protón, como en el caso de la glicina, hasta un resto alifático, aromático o heterocíclico portador de otros grupos funcionales.

Figura 1. Estructura química de un aminoácido



Los aminoácidos se diferencian solo en la naturaleza química de la cadena lateral o grupo  $R$ , las propiedades físico-químicas, como la carga neta, la solubilidad, la reactividad química y las posibilidades de establecer puentes de hidrogeno de los aminoácidos dependen de la naturaleza química de este grupo. Las proteínas naturales contienen hasta 20 aminoácidos primarios, unidos vía enlace amida. Sin embargo el número total de aminoácidos existentes en la naturaleza es de orden de 200 [14].

Es conocido que el valor nutricional de las proteínas no depende exclusivamente de su composición inicial, ya que se conoce que en todo

alimento las condiciones de tratamiento pueden alterar su valor nutritivo. Los tratamientos térmicos muy intensos desnaturalizan las proteínas y en particular disminuyen su solubilidad y también pueden alterar el contenido de algunos aminoácidos lo cual disminuye el valor nutricional del contenido de proteína.

Al aplicar tratamientos térmicos a los alimentos se causa alteración química de residuos de aminoácidos y se produce formación de nuevos enlaces covalentes intra o intermoleculares. Estos cambios pueden alterar las propiedades nutritivas y funcionales de las proteínas y dependen de las condiciones de tiempo y temperatura de los tratamientos aplicados [15].

En general los tratamientos térmicos como, pasteurización, esterilización UHT directa o indirecta, preesterilización y esterilización, producen en los alimentos, modificaciones deseables e indeseables. Entre ellos, los deseables consisten en la destrucción de microorganismos o esporas y la inactivación de enzimas aumentando la vida comercial del producto. Entre los indeseables, cambios en los componentes (proteínas, lípidos, carbohidratos y aminoácidos) que alteran el aroma, color, la consistencia y reducen el valor nutritivo del producto. Por eso optimizar el tratamiento térmico sería maximizar los efectos deseables y minimizar los indeseables [16]. El principio general del proceso consiste en el empleo de la temperatura más alta posible en el tiempo más corto viable. Los avances experimentados en tecnología en cárnicos, facilitan la obtención de estos objetivos. Con el propósito de una categorización de procesos se necesita la definición de una serie de indicadores térmicos que cubran los rangos de temperatura y tiempo efectivo de interés tecnológico en la industria cárnica, tanto en la fabricación como en el almacenamiento y la vida comercial, estos están descritos en dos tipos de parámetros para alimentos ricos en proteína como la leche y los cárnicos.

El Tipo I, incluye desnaturalización, degradación e inactivación de compuestos termolábiles, entre ellos están proteínas, enzimas y vitaminas. En las reacciones del Tipo II, se incluye la formación de compuestos que no estaban presentes en el alimento no procesado o que sólo estaban a nivel de trazas como lactulosa, hidroximetilfurfural, furosina, etc.

Pompei (1988) [17] clasifica las alteraciones de los componentes de los alimentos por tratamientos térmicos así:

- a) Interacciones entre los grupos laterales de los aminoácidos (aa) que dan lugar a la formación de enlaces pseudopeptídicos y de lisinoalanina. Las reacciones de este tipo favorecidas por un pH alcalino, originan aa no naturales como lantionina, aminoalanina, ornitina, ornitinoalanina, ácido diaminopropiónico y lisinoalanina. Estas reacciones disminuyen el valor nutritivo a causa de la baja biodisponibilidad de los aminoácidos lisina y arginina y pueden originar compuestos tóxicos.
- b) Reacciones de degradación de las cadenas laterales.
- c) Reestructuración de grupos sulfhidrilo (-SH), y disulfuro (S-S), estas reacciones son de especial interés en fórmulas para lactantes, con un elevado contenido en proteínas séricas, más ricas en grupos S-H que la caseína.

- d) Insolubilización de proteínas por desnaturalización: las interacciones dan lugar a agregados poco solubles.
- e) Interacciones con lípidos: pueden provocar el bloqueo de algún aminoácido y reducir la disponibilidad de los AA azufrados.
- f) Interacciones de carbohidratos con proteínas y/o aminoácidos: reacción de Maillard, que se inicia con la reacción entre un grupo amino y un compuesto carbonilo. La lisina (AA esencial) es el más afectado por su doble grupo amino.

Desde bastante tiempo, la reacción de Maillard (RM) ha sido objeto de especial interés en el estudio del efecto del tratamiento térmico sobre la calidad proteica de alimentos como la leche y de las fórmulas de alimentos para lactantes, porque afecta al valor nutritivo de las proteínas, puede dar lugar a compuestos antinutritivos y tóxicos y provoca cambios organolépticos y funcionales; por otra parte en la composición de productos como los cárnicos, la elevada relación carbohidratos/proteínas y los tratamientos térmicos aplicados, favorecen la RM, requiriendo para este proceso un elevado aporte de energía de activación [18].

El tipo de aminoácido juega un papel importante en la formación de color. Cuando los aminoácidos estén incluidos en una cadena proteica, la reacción de Maillard no afecta a toda ella sino que se produce una selección, y el primer aminoácido dañado es el que contiene el grupo amino terminal de la cadena. Los siguientes aminoácidos dañados son los básicos, especialmente la lisina cuya destrucción es de cinco a quince veces mayor que la de los restantes aminoácidos. Posteriormente, se afectarían los aminoácidos azufrados, cisteína y metionina, y algunas veces el triptófano. En cuanto a la reactividad de los aminoácidos libres, no hay mucha concordancia entre los distintos autores. La lisina es el más reactivo en solución acuosa con distintos azúcares y en condiciones fisiológicas, además de la lisina, la glicina es la que produce más color mientras que la cisteína normalmente produce poca coloración. Sin embargo, las muestras que contienen triptófano suelen ser más coloreadas que cuando está otro aminoácido implicado [19].

Adicionalmente se ha reportado también que el contenido de lisina disminuye por efecto del calor, atribuida a una reacción que ocurre entre el grupo amino de lisina y el grupo amino de asparagina y glutamina, ocasionando un enlace cruzado que disminuye el valor nutritivo por impedimento del ataque enzimático. Por efecto del calor también se producen reacciones de entrecruzamiento entre cadenas de polipéptidos por acilación de grupos amino libres, lo que da como resultado una disminución de lisina disponible. Lisina se considera nutricionalmente disponible solamente si su grupo amino está libre [20].

De esto se deduce el interés de disponer de indicadores químicos del deterioro de los alimentos que permitan controlar las modificaciones que se producen durante los procesos de pre e industrialización y almacenamiento. Estos parámetros son de utilidad para la optimización de procesos y condiciones de almacenamiento para el control de calidad del producto. Su determinación

permitirá detectar los procesos a los que ha sido sometido el producto y estudiar los efectos de su almacenamiento sobre su calidad.

## **1.2 Comparación entre tecnologías para el análisis de aminoácidos**

En referencia a los métodos analíticos separativos, se requiere la precipitación de las proteínas de las muestras en aplicaciones LC (Liquid Chromatography), GC (Gas Chromatography) y CE (Capillary Electrophoresis) independientemente del método de detección utilizado, lo que hace que los métodos planteen dificultades para su automatización. Los métodos cromatográficos líquidos acoplados con detección óptica están bien establecidos y son altamente reproducibles. Sin embargo, los protocolos clásicos de derivatización pre-y post-columna emplean OPA (O-ftalaldehido) o ninhidrina y requieren de largos tiempos de ejecución cromatográfico, por lo que se hacen de muy bajo rendimiento para altos volúmenes de muestras. Otra desventaja compartida por todos los métodos basados en detección óptica es su falta de especificidad en comparación con los métodos basados en hallazgos sobre espectros de masa de los análogos. Este último, sin embargo, requiere un buen tratamiento de la matriz de análisis, la supresión de efectos iónicos que alteren la precisión cuantitativa y comúnmente requieren del uso de patrones de isótopos estables como estándares internos marcados isotópicamente. Sin embargo, los métodos basados en MS (Mass Spectrometry) prevalecerán en el futuro.

HILIC-MS (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) y CE-MS (Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry) permiten el análisis directo de aminoácidos sin derivatización previa, pero adolecen de baja capacidad y relativamente pobre desempeño en la validación de las aplicaciones. LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) de par iónico se ha aplicado al análisis de aminoácidos nativos y iTRAQ®-aminoácidos marcados (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation).

En la Tabla 2 se reportan las características principales de las plataformas analíticas más sobresalientes para el análisis de aminoácidos en matrices complejas.

El beneficio más importante de iTRAQ®-LC-MS/MS en comparación con otros métodos basados en MS es la disponibilidad de patrones internos para los 20 aminoácidos proteínógenos y también para aminoácidos no proteicos. Pero iTRAQ®-LC-MS/MS tiene una serie de desventajas que incluyen una pobre reproducibilidad debido al gran número de transiciones que tienen que adquirirse, que podría aliviarse con procesos de adquisición de masas de tipo: monitoreo de reacción múltiple programada (sMRM, scheduled Multiple Reaction Monitoring), a esta técnica se reconocen algunas desventajas: la imposibilidad de medir con precisión aminoácidos azufrados, dificultad de automatizar la preparación de muestras, y altos costos en reactivos y materiales de consumo.

GC-MS es un método muy robusto y presenta una excelente reproducibilidad de los tiempos de retención. Especialmente con reproducibilidad excelente de los datos cuantitativos para diferentes derivados de aminoácidos como por ejemplo los cloroformatos, además el método puede ser automatizado fácilmente dando respuesta a altos flujos de muestras. Sin embargo, algunos aminoácidos termolábiles derivatizados no pueden medirse en forma cuantitativa, por lo que se requieren procedimientos alternos de derivatización para los análisis termolábiles.

Por otro lado, los análisis con inyección directa en ESI-MS/MS (Electrospray Ionization-MS/MS) ofrecen un alto rendimiento y son ampliamente utilizados en el tamizaje clínico de errores congénitos del metabolismo en neonatos. Hasta la fecha existen varios métodos para la cuantificación de los aminoácidos en hidrolizados de proteínas, fluidos fisiológicos, matrices alimentarias vegetales y animales. La gran importancia analítica en la determinación y cuantificación de aminoácidos se refleja en una serie de soluciones que van desde kits comerciales para uso exclusivo en algunos instrumentos, hasta el desarrollo de métodos nuevos y la optimización de los actuales, además de la expansión del espectro de aplicabilidad sobre otros análisis, reducción de preparación de muestras y análisis de tiempo, mejora de la sensibilidad, robustez y buena reproducibilidad son el foco de la investigación.

Un aspecto importante es el método de automatización para atender las necesidades de alto flujo de muestras (high through put analysis), que es esencial en estudios con un diseño experimental amplio o en laboratorios que atienden la demanda de este tipo de pruebas.

Hay espacio para las nuevas metodologías y para mejorar el análisis de aminoácidos, incluyendo la expansión del espectro de cubrimiento de análisis, la reducción de preparación de muestras y de tiempos de análisis, mejora de la sensibilidad, robustez y buena reproducibilidad. Debido a la alta selectividad y sensibilidad, MS se espera que juegue un papel clave en el futuro dependiendo de que los materiales de referencia isotópicamente marcada, que son un requisito previo para cuantificación robusta, resultaran fácilmente disponibles y a un costo favorable. Reducción de pre-tratamiento es otro aspecto importante para facilitar la automatización y la mejora de la robustez y rendimiento de la aplicación, aspectos que son esenciales en estudios de alto peso muestral.

**Tabla 1.** Comparación de métodos seleccionados en el análisis metabólico de aminoácidos

Método	Ventajas	Desventajas	LOD	Ref.
Métodos LC acoplado con detección óptica	Altamente reproducible	Es necesaria la precipitación de proteína y derivatizar	UV: 5 $\mu$ M (LOQ)	21-22
	Bajo costo de equipos	Falta la especificidad del analito		
	Buena linealidad sobre un amplio	Sustancias co-eluyentes no pueden		

Método	Ventajas	Desventajas	LOD	Ref.
	intervalo	ser distinguidas No es aplicable a análisis de alto flujo		
UPLC - MS	Rápida separación	Es necesario la precipitación de proteína Las altas presiones requieren de equipos especiales	1.3 - 5.3 $\mu$ M (LOQ)	23
	Buena resolución	Limitado número de amino ácidos cubiertos Ión supresión		
IP - LC - MS/MS	No es necesaria la derivatización	Es necesaria la precipitación de proteína	0.0003 - 9 $\mu$ M (LOD)	24,25,26
	Alto número de analitos cubiertos	Ión supresión		
	Buena resolución para amino ácidos polares	Contaminación del sistema analítico con el reactivo IP		
HILIC	No es necesaria la derivatización	Es necesaria la precipitación de proteína	5 $\mu$ M (LOD) 10 $\mu$ M (LOQ)	27
	Compatible con MS	Mala reproducibilidad		
	Muy adecuado para compuestos polares	Ión supresión en caso de detección con MS		
CE - MS	No es necesaria la derivatización	Es necesaria la precipitación de proteína	0.1 - 14 $\mu$ M (LOD)	28
	Bajo consumo de muestras	Solo es posible bajo volumen de inyección		
GC - MS	Método robusto	No es adecuado para derivados de aminoácidos termolábiles	0.03-19.98 pmol en columna (LOD)	29
	Altamente reproducible			
	Buena resolución	Es necesaria la derivatización		
	Rápida separación			
iTRAQ®	Separación rápida	Es necesaria la precipitación de	2 - 10 $\mu$ M (LOQ)	Inédito

Método	Ventajas	Desventajas	LOD	Ref.
	Disponibilidad de estándares internos para cada analito	proteína Recuperación insuficiente de aminoácidos que contienen azufre		
Infusión Directa MS/MS, TOF	No es necesaria la separación	Difíciles de automatizar La extracción y derivatización es requerida		Datos propios
	Alto rendimiento	Aminoácidos isobáricos no pueden ser resueltos		
NMR	No son necesarias la separación y la derivatización	Insuficiente sensibilidad, aunque LOD puede bajar por derivatización	2D: 20 - 312 $\mu$ M (LOD)	30
	Cuantificación robusta			
	Mínima preparación de muestras	Largos tiempos de análisis		

Tomado de: Amino acid analysis in biological fluids by Gc-MS, Hannelore Kaspar, 2009.

### 1.3 Cromatografía de gases/Espectrometría de Masas (GC/MS)

El primer trabajo en el que se hace pasar una fase móvil gaseosa a través de una columna data de 1951, dando lugar a la técnica conocida como cromatografía de gases. Esta técnica, es en la actualidad la plataforma tecnológica más ampliamente utilizada para la separación de los componentes volátiles, semivolátiles y polares en muestras de complejas. La combinación de alta resolución, sensibilidad y tiempos de análisis cortos la ha convertido en una técnica de rutina usada en muchos laboratorios para análisis químico y bioquímico.

En cromatografía de gases, la muestra se inyecta en un puerto que permanece caliente y allí se mezcla con el gas portador (generalmente He). En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna capilar. La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. Como consecuencia de la diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en fracciones que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores específicos.

La Espectrometría de Masas EM, es utilizada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. Sus principales cualidades son: Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula. Cuantificación, permite medir la concentración de las sustancias. Gran sensibilidad, capacidad de detección a concentraciones del orden de nanogramo (ng)  $10^{-9}$  g. Universal y específica, proporciona información estructural sobre la molécula analizada. Suministra información isotópica. Es una técnica rápida: se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de compuestos.

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía (70 eV), capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas. Además de moléculas ionizadas o iones moleculares ( $M^+$ ) también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de cada molécula, muchas veces de sus propios isómeros y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ión será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia. El espectro de masas puede almacenarse en la memoria de un computador para compararse con los espectros de una colección de espectros (o librería) y proceder a su identificación o puede estudiarse para averiguar la naturaleza de la molécula que le dio origen.

La cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas GC/MS, en principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles.

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente de ionización, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o TIC (Total Ion Current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a picos gaussianos de áreas relacionadas a la concentración de cada compuesto detectado mediante sus propios factores de respuesta.

**GC/MS para el análisis de aminoácidos.** Típicamente, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) se utiliza para el análisis de aminoácidos. Sin embargo, GC también se puede utilizar, y en algunos casos de disponibilidad, costos de instrumentación u operación puede hacer que sea una mejor elección. La naturaleza polar de aminoácidos requiere derivatización antes del análisis GC. El objetivo de derivatización es hacer un análogo más volátil, menos reactivo, y de este modo mejorar su comportamiento cromatográfico. En el caso de los aminoácidos, la derivatización reemplaza los hidrógenos activos de los grupos OH, NH<sub>2</sub>, SH (grupos funcionales polares) por un fragmento no polar.

La silylación es una técnica de derivatización muy común, y es útil para una amplia variedad de compuestos. La principal desventaja de este método es su sensibilidad a la humedad. La presencia de humedad resulta en una pobre eficiencia de reacción y la inestabilidad de los análogos derivados (pueden hidrolizarse). Para este tipo de estudios, se aplica principalmente el reactivo de silylación N-terc-butildimetilsilyl-N-methyltrifluoroacetamida (MTBSTFA) para la derivatización de aminoácidos. MTBSTFA, forma grupos terbutildimetilsilylo (TBDMS) cuando reaccionan con derivados grupos funcionales polares que contienen unos hidrógenos activos.

Los datos cromatográficos (tiempos de retención e índices de retención de Kovats) y espectrales obtenidos a partir de las señales, permiten la identificación de los derivados de cada uno de los aminoácidos. La sustitución de un hidrógeno activo por un grupo TBDMS añade 114 unidades de masa al peso molecular. Los espectros de impacto electrónico de estos derivados contienen fragmentos típicos correspondientes al peso molecular del derivado de menos CH<sub>3</sub> (M-15), C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (M-57), C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> + CO (M-85) y CO-O-TBDMS (M-159).

Bajo las condiciones de reacción utilizadas, la mayoría de los aminoácidos producen un único producto de reacción. Algunos aminoácidos producen productos de derivatización parcial, específicamente, asparagina, glutamina y triptófano. En el caso de estos aminoácidos, dependiendo del interés sobre ellos se procede a realizar una modificación en las condiciones de reacción, tales como, reducción de la temperatura y/o cambiando el tiempo de reacción, para evitar que esto ocurra. Por ejemplo, aumentar el tiempo de reacción de 2 a 4 horas puede resultar en un aumento de la respuesta de la forma completamente derivatizada de triptófano [31].

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Obtención y esterilización de muestras

Se desarrollo un jamón de cuartos delanteros de cerdo (con una extensión de 100%) mediante la técnica de elaboración de batido, controlando el pH (5,8 – 6,2), el cual se embutió en película flexible multicapa (nylon/PET/EVOH/nylon). La calidad e integridad de este material se evaluó mediante espectrofotometría infrarroja (FTIR) utilizando un equipo Nicolet 6700 Thermo Scientific equipado con un accesorio de reflectancia atenuada (ATR), operando en un rango de numero de onda entre 720 cm<sup>-1</sup> - 4000 cm<sup>-1</sup>.

La esterilización de las muestras de jamón se realizo a interior de un autoclave doble-propósito (vapor saturado convencional y esterilización por agua sobrecalentada), Makinox con procesador weintex DVP-10SX, Para determinar las condiciones de operación y esterilidad comercial del jamón elaborado, se realizó un protocolo de estudio de distribución y penetración de calor el cual se llevo a cabo utilizando un equipo de adquisición de datos CalPlex -TechniCal (EEUU). Los datos tiempo vs temperatura obtenidos en cada monitoreo se registraron y analizaron utilizando el software CALSoft 5. La evaluación se efectuó empleando el método de la fórmula de Ball (novenos grado) y utilizando un valor de letalidad F<sub>0</sub> (121.1/10) objetivo de 6.0 min. Validación realizada por la empresa Q-TECH informe cod. 2012\I00112

### 2.2 Condiciones experimentales de esterilización

Las variables de operación establecidas (tiempo, temperatura y presión) se ejecutaron mediante cuatro tratamientos diferentes, remarcados como T1, T2, T3, y T4. Ver tabla 2.

**Tabla 2.** Variables de operación.

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
<b>Temperatura (°C)</b>	116	118	120	82
<b>Tiempo (min.)</b>	36	26	21	60
<b>Presión (psi)</b>	23	23	23	-

Los tratamientos T1, T2, y T3 se ejecutaron en la autoclave. Para T4 se uso el método convencional (Cocción abierta en vapor saturado); adicionalmente, se utilizo una muestra blanco la cual no recibió ningún proceso de cocción.

### **2.3 Extracción y derivatización de aminoácidos libres en muestras de jamón**

Las muestras de jamón se pesaron en cantidades aproximadamente de 1 gr, estas se extrajeron con 3 ml de agua en un homogenizador Ultra-turrax durante 3 minutos. Posteriormente se recuperó de cada muestra 1.7 ml de líquido sobrenadante, al que se adicionaron 100  $\mu$ L de etanol, conjuntamente con 200  $\mu$ L de HCl 1 N para precipitar proteínas y mejorar la solubilidad acuosa de los aminoácidos. Cada vial se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm 4°C. Se recuperaron 200  $\mu$ L de líquido sobrenadante, los cuales se sometieron a secado en un sistema evaporador rotatorio (CentriVap, Labconco. Kansas City. EE.UU). Posteriormente, el residuo obtenido se redisolvió en 200  $\mu$ L de acetonitrilo (Merck, Darmstadt. Germany) y 50  $\mu$ L de MTBSTFA+TBDMCS (Sigma-Aldrich. Saint Louis, MO. EE.UU.). Procediendo a la derivatización de los aminoácidos, la reacción se prolongo durante 60 minutos a 60°C.

### **2.4 Cromatografía de gases-espectrometría de masas**

Los análisis se realizaron utilizando un sistema de Agilent 7890A equipado con un automuestreador automático de líquidos y detector selectivo de masas 5975C. La separación de la sustancias se realizo en una columna capilar HP-5MS (1% fenilpolimetilsiloxano. 30 m, 0,25 mm de diámetro, espesor de la película 0.25  $\mu$ m, J&W Scientific, EE.UU.). La temperatura del horno se programó desde 100 °C (2 min) a 180 ° (1 min) con una rata de calentamiento de 15 °C/min y luego aumento a 5 °C/min, permaneció isotérmicamente a 300 °C (10 min) para finalizar el análisis. La temperatura del inyector se estableció en 260 °C, en modo Split (5:1, usando un liner lo lana de vidrio). Las temperaturas del MSD en la cámara de ionización y cuádrupolo se programaron en 230 y 150 °C, respectivamente. Los espectros de masas y la corriente total de iones (TIC) se adquirieron en modo scan a 4.70 scans<sup>-1</sup> con una energía de ionización de 70 eV, en el rango de masas m/z 40-700. Las señales cromatográficas se controlaron por su homogeneidad, con la ayuda de iones extraídos de fragmentos de característicos para optimizar la resolución, la simetría de las señales, y la identificabilidad de los compuestos. Las aéreas de los compuestos se integraron en modo automático, para iones selectos, utilizando software para deconvolución.

### **2.5 Identificación y cuantificación de aminoácidos**

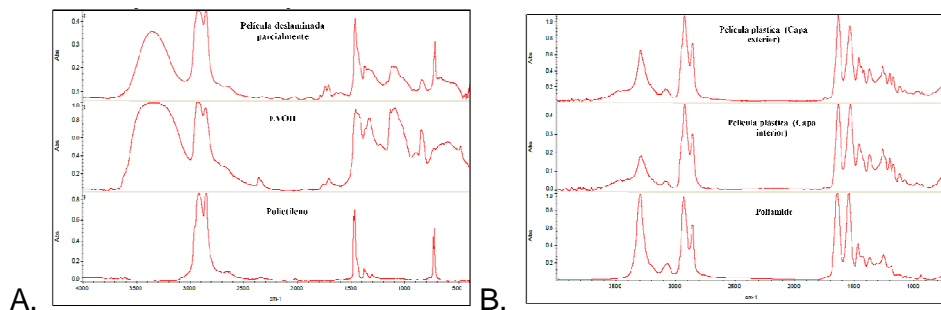
Un total de 21 L-aminoácidos (L-amino acids Kit LAA21-1KT. Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO. EE.UU) se pesaron y diluyeron en HCl 1 N, obteniendo concentraciones conocidas para calibrar la concentración de aminoácidos en las muestras. Cada aminoácido estándar se utilizó para establecer una librería espectral (MSL, metabolite standard library) y para el cálculo de índices de

retención lineal (n-alcenos C7-C28 Supelco. North Harrison Road, Bellefonte, PA) mediante el software de deconvolución AMDIS 2.68. Se crearon curvas de calibración para cada anólito, a cada una fue evaluada su linealidad mediante la variación de los factores de respuesta en el rango de calibración y aceptando coeficientes de correlación mínimo de 0.998. Para cada sustancia se determinó su límite de detección (L.D) y límite de Cuantificación (L.C) determinando sensibilidad satisfactoria para todas las sustancias en el orden de 400 µg/Kg. Las sustancias identificadas se sometieron por análisis multivariado de componentes principales (Principal Component Analysis, PCA) para determinar marcadores de cambio en la composición de aminoácidos, dada la significancia de la variabilidad de las sustancias en la matriz de correlación, se tendrán en cuenta los factores relacionados con las condiciones de esterilización, para este efecto, no se tendrán en cuenta las sustancias traza ( $\leq 400$  µg/Kg). Se utilizó el software Minitab® 16. 1.0.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la capa exterior e interior del material de envase (conformado por nylon) presenta la presencia de señales a 1700cm<sup>-1</sup> y 2900 – 3300cm<sup>-1</sup> que caracterizan la presencia del grupo carbonilo y del nitrógeno propios del enlace amida. Ver figura 2A. Al ser parcialmente de-laminado el material se observó la aparición de señales que caracterizan la presencia de polietilvinilalcohol (EVOH) y polietileno (PE) como se observa en la figura 2B, al comparar este espectro con los correspondientes a los espectros estándar de estos dos materiales se observaron, la aparición de señales 3352cm<sup>-1</sup>, 2918cm<sup>-1</sup>, 2850cm<sup>-1</sup>, 1464cm<sup>-1</sup>, 1377cm<sup>-1</sup>, 1115cm<sup>-1</sup>, 845cm<sup>-1</sup> y 719cm<sup>-1</sup> que están relacionadas con la presencia de grupos hidroxilo y alqueno que pertenecen a las películas EVOH y PE. La identificación de estos compuestos en la película permitió asegurar en el desarrollo de los experimentos la idoneidad del material para los procesos de transferencia de oxígeno y vapor de agua, variables que influyen en la adecuada conservación del producto.

**Figura 2A.** Cara externa e interna de material retortable comparada contra espectro FTIR de referencia de nylon; **2B.** Capa intermedia de material retortable comparada contra espectro FTIR de referencia de EVOH y PE



### 3.1 Optimización de condiciones de operación y esterilidad comercial

Para conseguir la esterilidad comercial del jamón obtenido se requirió de la optimización del CUT (tiempo y temperatura de calentamiento), que depende de características físicas del jamón: longitud, diámetro y masa. Los procedimientos de optimización de CUT permitieron determinar los tiempos de sostenimiento en función de la temperatura garantizando las 6 reducciones logarítmicas que se plantearon en el protocolo de estudio. Ver tabla 2.

**Tabla 2.** Tiempos de sostenimiento en función de la temperatura.

I.T <sup>1</sup> (°C)	R.T <sup>2</sup> (°C)	Tiempo de Sostenimiento (Minutos)
5	116	34
5	117	30
5	118	26
5	119	24
5	120	21

<sup>1</sup> I.T: Temperatura de entrada del jamón

<sup>2</sup> R.T: set point – registro de temperatura

En el desarrollo de los experimentos se observó que el proceso de carga de la autoclave dado por condiciones como: configuración de llenado, área abierta de las canastillas y alimentación de la presión de entrada de vapor, afectaron los valores experimentales de CUT. Produciendo aumento o disminución de los tiempos de sostenimiento y CUT, que determinaron el tiempo del tratamiento térmico, de esta manera se determinó que los registros de temperatura 116, 118 y 120°C fueran tenidos en cuenta por ser representativos como valores extremos y medio en la escala de interés práctico en condiciones industriales.

Diversos estudios han establecido con base a criterios de optimización de tiempos de esterilización y pre tratamientos o subprocesos, basados siempre en cálculos de letalidad a  $F_0$  6 min, enormes ganancias económicas de rendimiento hasta del 20% y mejoramientos de capacidad de planta hasta del 65% [32], otros estudios se han enfocado en generar modelos matemáticos desarrollados para optimizar programas de procesos de esterilización unificados que utilizan productos de diversas presentaciones con requisitos de calidad específicos, estos demuestran una reducción de 20-25% en el tiempo entre la operación de la planta de operaciones simultáneas y no simultáneas [33]; esto de manera consecuente genera reducciones en los tiempos operativos de esterilización y de impacto tecnológico.

### 3.2 Perfil químico de aminoácidos mediante GC/MS

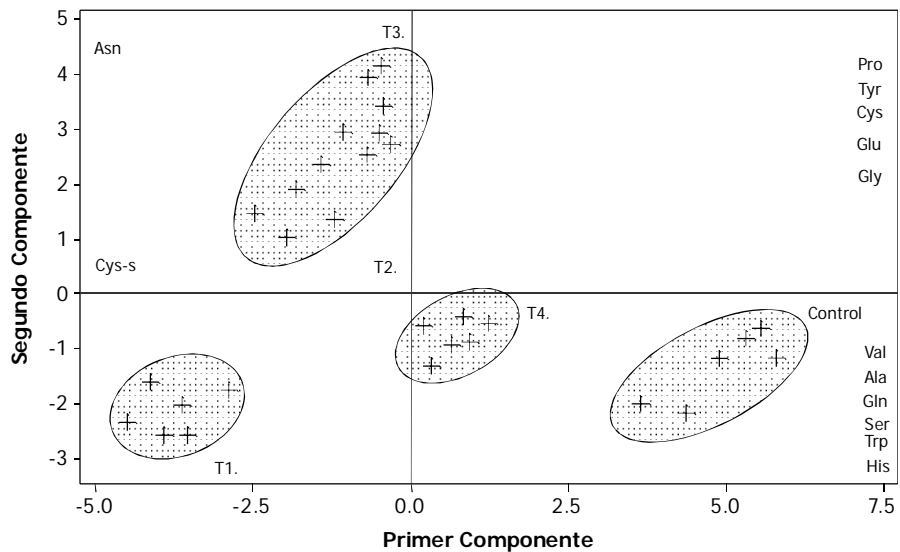
El análisis del grupo de aminoácidos libres reportó para el grupo de muestras control un contenido mayor de los aminoácidos Ala y Lys (en promedio 9.83 y 9.64 µg/100 gr de jamón, respectivamente), mientras que los aminoácidos Met y Asp presentaron un contenido traza en las muestras, inferior a 400 partes por

billón (0.4 µg/L). en este grupo de muestras no se identificó contenido de hidroxiprolina (OH-Pro) y cistina (Cys-s). En general los grupos de muestras de los tratamientos T1, T2, T3 y T4 presentaron alteración del contenido de la mayoría de los aminoácidos, ver Tabla 4.

La figura 3 presenta el gráfico biplot de la dispersión de muestras según componentes principales aminoácidos, en ella, se aprecia la formación de cuatro agregados de muestras, el grupo control se encuentra en un cuadrante caracterizado por la presencia de un grupo de aminoácidos (Val, Ala, Gln, Ser, Trp, His) que lo caracterizan por su mayor contenido entre el grupo de muestras. En este mismo cuadrante aparecen las replicas de las muestras pertenecientes al tratamiento T4, estas muestras por su cercanía estadística al grupo control reportó el menor nivel de diferenciación en la composición de aminoácidos, lo cual estuvo relacionado con una menor temperatura de tratamiento térmico y poca influencia del tiempo en la reactividad de los aminoácidos sujetos a disminución de contenido. Del lado contrario, los grupos antes mencionados, los tratamientos T1, T2 y T3 (cuadrantes 1 y 3) presentaron a su vez disminución en el contenido de los aminoácidos que definen mayoritariamente al grupo control, estos tres tratamientos presentaron un comportamiento definido por la mayor reactividad de los aminoácidos asparagina (Asn), lisina (Lys) y glutamina (Gln) principalmente en condiciones de retorta, se observó como al prolongar el tiempo de exposición al calor se obtienen mayor degradación de Lys, esto significó un efecto desfavorable y significativo en la calidad nutricional para las condiciones de operación T1.

Los tratamientos térmicos T2 y T3 se agruparon como un solo agregado de muestras, en este se observó un efecto moderado sobre el grupo de aminoácidos definidos por su reactividad al calor (Lys y Gln), mientras que en forma notable se produjo un aumento considerable en el contenido de Asn, probablemente por degradación de proteína soluble que produjo cantidades de este aminoácido en forma libre, y que no se consume en el tiempo de duración de estos tratamientos que son inferiores a T4.

**Figura 3.** Dispersión de muestras de jamón esterilizados, según componentes principales de aminoácidos libres.



En los tratamientos de retorta se presentó el aumento del contenido de Cistina (Cys-s) en relación con la temperatura y con tiempos de exposición prolongados, el cual consiste en un dímero de cisteína (Cys) formado en condiciones de oxidación para los grupos tiol de Cys. Cys-s no fue detectada en el grupo control y T4, por ello bajo condiciones experimentales esta sustancia se manifestó claramente como un marcador térmico de condiciones de retorta, encontrándose en mayor cantidad en muestras de condiciones T1 (1.12 µg/100 gr de jamón).

Se observó adicionalmente una disminución en el contenido de Cys en esta mismas muestras que está en una relación equimolar 1:2 respecto al aumento de Cys-s, lo cual significa que la formación de esta sustancia depende de cantidades de Cys libre y no de degradación de proteínas.

**Tabla 4.** Perfil químico de la fracción de aminoácidos libres de jamones de cerdo sometidos a auto clavado.

Item 1	Designación	SIM <sup>2</sup> (m/z)	L.D. (µg/L)	L.C (µg/L)	Contenido de aminoácidos libres (µg/100 gr ± SD; n:6)				
					Control	T1. 116/36	T2. 118/26	T3. 120/21	T4. 82/60
1	Ala	260, 232,158	0.20	0.4	9.83 ± 0.1	8.15 ± 0.1	8.61 ± 0.1	8.16 ± 0.1	8.85 ± 0.1
2	Gly	246, 218	0.20	0.4	4.69 ± 0.1	3.17 ± 0.1	3.91 ± 0.1	3.96 ± 0.1	4.10 ± 0.0
3	Val	288, 260, 186	0.20	0.4	1.20 ± 0.1	1.01 ± 0.1	0.88 ± 0.1	0.89 ± 0.1	0.95 ± 0.1
4	Leu	302, 274, 200	0.20	0.4	1.03 ± 0.1	0.94 ± 0.1	1.16 ± 0.1	1.27 ± 0.1	1.04 ± 0.1
5	lLe	302, 274, 200	0.20	0.4	0.38 ± 0.1	0.44 ± 0.1	0.35 ± 0.1	0.45 ± 0.1	0.36 ± 0.0
6	Pro	286,258, 184	0.20	0.4	1.62 ± 0.1	1.48 ± 0.1	1.57 ± 0.1	1.53 ± 0.1	1.56 ± 0.1
7	Met	320, 292, 218	0.20	0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4
8	Ser	390, 362	0.20	0.4	1.12 ± 0.1	0.95 ± 0.1	0.84 ± 0.1	0.81 ± 0.1	1.09 ± 0.1
9	Thr	404, 376, 303	0.20	0.4	0.79 ± 0.1	0.77 ± 0.1	0.80 ± 0.1	0.75 ± 0.1	0.75 ± 0.1
10	Phe	336,302, 234	0.20	0.4	0.59 ± 0.1	0.52 ± 0.1	0.56 ± 0.1	0.51 ± 0.0	0.56 ±
11	Asp	418, 390, 316	0.20	0.4	< 0.4	nd	< 0.4	< 0.4	< 0.4
12	OH-Pro	416, 388, 314	0.25	0.4	nd	nd	Nd	Nd	Nd
13	Cys	406, 378	0.22	0.4	2.38 ± 0.1	0.40 ± 0.1	1.55 ± 0.0	1.55 ± 0.1	0.39 ± 0.0
14	Glu	432, 330, 272	0.22	0.4	1.24 ± 0.1	1.02 ± 0.1	1.19 ± 0.1	1.10 ± 0.1	1.19 ± 0.0
15	Asn	417,302	0.22	0.4	< 0.4 0.0	Nd	0.65 ± 0.1	0.77 ± 0.1	0.53 ± 0.0

					<b>Contenido de aminoácidos libres (µg/100 gr ± SD; n:6)</b>					
16	Lys	431, 300	329,	0.22	0.4	9.64 ± 0.1	6.49 ± 0.1	8.90 ± 0.1	8.76 ± 0.1	9.47 ± 0.0
17	Gln	357, 299	329,	0.23	0.4	0.59 ± 0.1	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4
18	His	440, 196	338,	0.23	0.4	1.16 ± 0.1	1.15 ± 0.1	0.88 ± 0.1	0.89 ± 0.1	1.03 ± 0.0
19	Tyr	438, 302	364,	0.25	0.5	0.86 ± 0.1	< 0.5	0.63 ± 0.1	0.64 ± 0.1	0.67 ± 0.1
20	Trp	489, 244	302,	0.25	0.5	0.66 ± 0.1	nd	Nd	Nd	0.61 ± 0.0
21	Cys-s	537, 302	348,	0.25	0.5	Nd	1.12 ± 0.1	0.70 ± 0.1	0.75 ± 0.1	Nd

<sup>1</sup> Orden de lución de compuestos derivatizados bajo condiciones cromatográficas.

<sup>2</sup> (SIM, Single Ion Monitoring), lones selectos para identificación e integración de señales)

#### 4. CONCLUSIONES

Las variables relacionadas con el proceso de carga de la autoclave permitirán conseguir una optimización de los valores de sostenimiento y CUT que aumente la eficiencia de distribución y transferencia térmica generando así tratamiento más cortos, más rentables y de menor impacto nutricional.

GC/MS por su resolución, sensibilidad, eficiencia de la toma de muestra y en la facilidad de derivatizar la muestra representa ventajas definitivas a la hora de elegir el método de detección y cuantificación de aminoácidos libres en este tipo de matrices alimenticias.

La cistina se identificó como un neo compuesto que podría servir como marcador tecnológico propio de las condiciones de retorta a la que fue sometido el jamón.

Las reacciones de entrecruzamiento múltiple en el que intervienen: Lys – Asp – Gln, efectivamente se ven reflejadas en la matriz de jamón sometido a estos procesos de retorta, por lo se deduce, que la reducción del aminoácido libre lys, genera una considerable pérdida nutricional especialmente en tratamientos de esterilización con tiempos prolongados.

Aunque no haya una marcada diferencia en la cantidad de Lys en los tratamientos 2 y 3, se ve una tendencia de menor impacto generalizada en el tratamiento de 118°C - 26 min sobre los niveles aminoacídicos del jamón retortado.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] CATAURO, P.M. and M.H. PERCHONOK, Assessment of the Long-Term Stability of Retort Pouch Foods to Support Extended Duration Spaceflight EN: Journal of Food Science. January 2012. Vol. 77 no. 1, p. S29-S39.
- [2] ZAND, Nazanin, The Influence of Electromagnetic Field on Properties of Retort Flexible Pouches. EN: Annals of Biological Research. January 2012. Vol. 3 no. 1, p. 702-711.
- [3] JAY M., James; LOESSNER J., Martin and GOLDEN A. David. Modern food microbiology. 7 ed. New York. Springer Science + Business Media, Inc. 2005. 790 p.
- [4] FRAZIER, William C. and Westhoff, Dennis C. Food microbiology. 4 ed. India. McGraw-Hill Education, 2001. 539 p.
- [5] ZAND, Nazanin. Multi Layer Flexible Packaging and High Frequency Electromagnetic Field. En: Annals of Biological Research. XU, Tongwen. 2 ed. Hefei: University of science and Technology of China. 2011. p. 488-501
- [6] ZAND, Nazanin and MAILOVA, Eleonora E. Retort Flexible Pouch Substitute For Packaging Ready to Eat Meal. Germany. Lambert Academic Publishing AG & Co KG, 2011. 140 p.
- [7] DAVIDEK, Jiri; VELÍSEK, Jan. & POKORNÝ, Jan. Chemical Changes During Food Processing. En: Food Science. 1990. Vol. 21. 448 p.
- [8] DEMAN, Jhon M. Principle of Food Chemistry. 3 Ed. Gaitersburg: Aspen Publisher, Inc., 1999. 520 p.
- [9] FRANCIS, Frederick John. Encyclopedia of Food Science and Technology. 2 Ed. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 2000. 2768 p.
- [10] FRIEDMAN, Mendel. Food browning and its prevention. EN: Journal of Agricultural and Food Chemistry. March 1996. Vol. 3 no. 44, p. 631-653.
- [11] HIDALGO, Francisco J. and ZAMORA, Rosario. Interplay between the Maillard reaction and lipid peroxidation in biochemical systems. EN: Annals of the New York Academy of Sciences. Jun 2005. Vol. 1043, p. 319–326.
- [12] KLADIDLOVÁ, Helena, et al.. The effect of long-term storage on amino acid content of ready-to-eat entrées. EN: International Journal of Food Science and Technology. March 2010. Vol. 45 no. 5, p. 966-970.
- [13] GEANKOPLIS, C.J. Procesos de transporte y operaciones unitarias. Procesamiento térmico en estado no estacionario y esterilización de materiales biológicos. 3 ed. Colonia San Juan Tlihuaca, Mexico: Compañía editorial Continental, 2003. 1008 p.
- [14] BETANCORT, Juana Rosa. Determinación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución. Estudio cualitativo y cuantitativo de aminoácidos libres en

algas y su variación por condiciones de cultivo: Aminoácidos. Doctorado en química. Las palmas de gran canaria: Universidad de las palmas de gran canaria. Facultad de química. 2007, 153 p.

[15] QUITRAL, Vilma. Efecto de tratamientos térmicos sobre el contenido de lisina disponible en carne de jaiba mora (*Homalaspis plana*) [Online]. Venezuela: ALAN 2001, Vol. 51, n. 4 [Citado 2012-11-12], p 382-385.

[16] Eriksson C.E. Maillard Reaction in Food: Chemical, Physiological and Technological Aspects. EN: Progress in food y nutrition science. February 1981. Vol. 5. n° 1-6, p. 1-3.

[17] Pompei, C.; Rossi M.; y Maré F. Protein quality in commercial milk-based infant formulas. EN: Journal of Food Quality. February 1988. Vol. 10, n° 6, p. 375-391.

[18] Vhangani, L.N. and J. Van Wyk, Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose-lysine and ribose-lysine model systems. EN: Food chemistry. April 2013. Vol. 137, n° 1-4, p. 92-98.

[19] Delgado-Andrade, C.; Seiquer I.; Haro A.; Castellano R.; y Navarro, P.; Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. EN: Food Chemistry. September 2010 Vol. 122, n° 1, p. 145-153.

[20] T. Hofmann, W. Bors, y K. Stettmaier, Studies on radical intermediates in the early stage of the non-enzymatic browning of carbohydrates and primary amino acids. EN: Agricultural and food chemistry. January 1999. Vol. 47, n° 2, p. 379-390.

[21] Le Boucher, J.; Charret, C.; Coudray-Lucas, C.; Giboudeau, J.y Cynober L. Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A EN: Clinical chemistry. August 1997. Vol. 43, n° 8, p. 1421-1428.

[22] Pappa-Louisi, A.; Nikitas, P.; Agrafiotou, P. y Papageorgiou A. Optimization of separation and detection of 6-aminoquinolyl derivatives of amino acids by using reversed-phase liquid chromatography with on line UV, fluorescence and electrochemical detection EN: Analytica chimica acta. Jun 2007. Vol. 593, n° 1, p. 92-97.

[23] Lico Boogers; Wim Plugge; Yair Q. Stokkermans y Alexander L.L. Duchateau. Ultra-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in protein hydrolysates using an automated pre-column derivatisation method EN: Journal of chromatography A. May 2008. Vol. 1189, n° 1-2, p. 406-409.

[24] Armstrong M.; Jonscher, K.; y Reisdorph N. A. Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry EN: Rapid communications in mass spectrometry. August 2007. Vol. 21, n° 16, p. 2717-2726.

[25] Piraud, M.; Vianey-Saban, C.; Petritis, K.; Elfakir, C.; Steghens, J. P.; y Bouchu, D. ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of

inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. EN: Rapid communications in mass spectrometry. June 2003. Vol.17, n° 12, p. 1297-1311.

[26] de Person, M.; Chaimbault, P.; y Elfakir, C. Analysis of native amino acids by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry: comparative study between two sources and interfaces. EN: Journal of mass spectrometry. February 2008. Vol. 43, n° 2, p. 204-215.

[27] Langrock, T.; Czihal, P.; y Hoffmann, R. Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry EN: Amino acids. May 2006. Vol. 30, n° 3, p. 291-297.

[28] Soga, T.; Kakazu, Y.; Robert, M.; Tomita, M.; y Nishioka, T. Qualitative and quantitative analysis of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry EN: Electrophoresis. Jun 2004. Vol. 25, n° 13, p. 1964-1972.

[29] Husek, P.; Simek, P.; Hartvich, P.; y Zahradnickova, H. Fluoroalkyl chloroformates in treating amino acids for gas chromatographic analysis EN: Journal chromatography A. April 2008. Vol. 1186, n° 1-2, p. 391-400.

[30] Gronwald, W.; Klein, M. S.; Kaspar, H.; Fagerer, S. R.; Nurnberger, N.; Dettmer, K.; Bertsch, T.; y Oefner, P. J. Urinary metabolite quantification employing 2D NMR spectroscopy. EN: Analytical chemistry. December 2008. Vol. 80, n° 23, p. 9288-9297.

[31] KASPAR, Hannelore. Amino acid analysis in biological fluids by GC-MS: High-throughput analysis of free amino acids in biological fluids by GC-MS. Doktorgrades der Naturwissenschaften. Fürstenfeldbruck; Germany: der Universität Regensburg. Fakultät für Chemie und Pharmazie. 2009, p. 153.

[32] Almonacid S, Bustamante J, Simpson R, Urtubia A, Pinto M, Teixeira A. Commercially Sterilized Mussel Meats (*Mytilus chilensis*): A Study on Process Yield. EN: Journal of food science. June 2012. Vol. 77, n°6, p. 127-135

[33] Abakarov A.; Simpson R., Optimal scheduling for retorts of different capacities in food canneries EN: Journal of Food Process Engineering. December 2011. Vol. 34, n° 6, p. 2078-2104.