

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

RECRISTALIZACION DEL HIELO EN SISTEMAS MODELO Y
SU EXTENSION AL ALMACENAMIENTO CONGELADO DE CARNES

MIRIAM NORA MARTINO

Nº 823

• TESIS DOCTORAL

1987

Don. Autor

24-II-88

72738

53180

RECEBIDA

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

*A mis padres,
a mi tío, a mis tías
a Adriana,
a Hugo*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la asistencia económica aportada, ya sea por las becas que me fueron otorgadas como por los materiales e instrumental que fueron puestos a mi disposición a través del CIDCA, sin los cuales no hubiera sido posible la concreción de este trabajo de tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas por la formación científica y humana que me brindó.

Especialmente, a la Dra. Noemí E. Zaritzky por su sólido respaldo y dedicación en la dirección del presente trabajo de tesis y por estar allí, en todo momento, con su visión lúcida y concreta.

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

Al Dr. Jorge R. Wagner y al Agr. Hugo A. Méndez por su dedicación en el dibujo de las figuras del presente trabajo.

Al Ing. Juan A. Segura por su contribución en la reproducción de las micrografías de este volumen.

A las Sras. Marta Macías y Silvia A. Moya por su eficiente desempeño en la tarea de mecanografiado del manuscrito.

A los integrantes del CIDCA y a todos aquellos que, de una u otra forma, no sólo contribuyeron a que esta tesis pudiera realizarse, sino que me impulsaron a desarrollar mi potencial humano.

Unos ciegos se topan con un elefante y cada uno de ellos palpa a tientas una parte de su cuerpo.

— Este animal tiene forma de tapiz — dice el que toca la oreja.

— ¡No! — dice el que palpa la trompa — tiene forma de tubo.

— Ambos se equivocan, tiene forma de columna — dice el que se ha aferrado a una pata.

Así, la mayor parte de los hombres no ven más que una porción del Universo. Defienden su punto de vista y desprecian el ajeno, sin advertir que todos cometen el mismo error. No se dan cuenta que sus verdades, aparentemente contradictorias, una vez reconciliadas, conducirían al esclarecimiento de la Verdad.

Parábola sufi,
Sanai (adaptación Adriana Martino)

INDICE

CAPITULO 1	Página
INTRODUCCION	
1.1. Consideraciones generales	1
1.2. Sistema muscular	3
1.2.1. Estructura microscópica del músculo esquelético	3
1.2.2. Composición química de la carne	4
1.2.3. Sistema muscular después de la muerte del animal	7
1.3. Conservación de la carne por frío	7
1.4. Importancia económica de las carnes refrigeradas y congeladas en nuestro país	9
1.5. Efectos de la congelación en la calidad de las carnes	12
1.6. Cristalización del hielo	14
1.6.1. Nucleación	15
1.6.2. Crecimiento cristalino	18
1.6.3. Tamaño cristalino	19
1.6.4. Morfología de los cristales	21
1.6.5. Cristalización del hielo en tejidos musculares	27
1.6.5.1. Consideraciones acerca de la determi- nación de la velocidad de congelación en tejidos cárneos	30
1.6.5.2. Localización de los cristales de hielo en tejidos musculares	34
- Naturaleza del tejido y las células	34
- Velocidad de congelación	34
- Estado fisiológico	36
1.7. Cambios que ocurren en los cristales durante el almacenamiento. Recristaliza- ción del hielo	38
1.8. Objetivos	39

	Página
CAPITULO 2	
RECRISTALIZACION DEL HIELO EN SISTEMAS MODELO	41
2.1. Parte experimental	42
- Medición de cristales	45
- Definición de diámetros medios	45
2.2. Análisis y discusión de resultados	47
2.2.1. Distribución cristalina	47
2.2.2. Crecimiento de grano	51
2.2.3. Cinética de recristalización	58
2.2.4. Efecto de oscilaciones térmicas en el tamaño cristalino	72
- Ascensos de temperatura	72
- Descensos de temperatura	73
CAPITULO 3	
OPTIMIZACION DEL METODO DE OBSERVACION MICROSCOPICA DE TEJIDOS CARNEOS CONGELADOS	77
3.1. Técnica de sustitución a baja temperatura	79
3.1.1. Obtención de las muestras	79
3.1.2. Sustitución y fijación	79
3.1.3. Inclusión	81
3.1.3.1. Deshidratación	81
3.1.3.2. Impregnación por líquidos intermedia- rios	82
3.1.3.3. Impregnación con parafina	83
3.1.3.4. Inclusión definitiva	84
3.1.4. Corte	84
3.1.5. Observación microscópica de los cortes	85
3.1.5.1. Desparafinación	85
3.1.5.2. Tinción	85
3.1.5.3. Deshidratación y montaje	88
3.1.6. Soluciones empleadas en la técnica his- tológica	89
3.2. Análisis de las condiciones de fijación para la aplicación de la técnica de sus- titución a tejidos congelados	90
3.2.1. Procedimiento seguido para la congela- ción y determinación de historias tér- micas de las muestras cárneas	92
3.2.2. Método para la determinación del coefi- ciente de difusión de la solución fija- dora	93
3.2.3. Determinación de la influencia de la temperatura y del tiempo de fijación en la técnica histológica	93

	Página
3.3. Resultados obtenidos	94
3.3.1. Efectos de la temperatura de fijación sobre la estructura tisular de carne bovina congelada	94
3.3.2. Coeficiente de difusión del fijador de Carnoy en tejido cárneo congelado	97
3.3.3. Efectos de la recristalización duran- te la fijación	101
3.4. Discusión de resultados	103

CAPITULO 4

RECRISTALIZACION DEL HIELO EN TEJIDOS CARNEOS CONGELADOS

105

4.1. Materiales y métodos	108
4.1.1. Método de congelación	108
4.1.2. Efecto de la temperatura de almacena- miento sobre la velocidad de recrista- lización	108
4.1.3. Efecto del diámetro inicial sobre la recristalización de muestras almacena- das a temperatura constante	109
4.1.4. Almacenamiento con fluctuaciones de temperatura	109
4.2. Resultados y discusión	111
4.2.1. Influencia de la temperatura en la ci- nética de recristalización	119
4.2.2. Influencia del diámetro inicial en la cinética de recristalización	120
4.2.3. Determinación de la energía de activa- ción del fenómeno de recristalización en tejidos cárneos	120
4.2.4. Estimación teórica del diámetro límite	123
4.2.5. Cálculo del tiempo requerido para al- canzar el diámetro límite	125
4.2.6. Modificaciones estructurales del tejido cárneo como consecuencia de oscilaciones térmicas durante el almacenamiento con- gelado	126
4.2.7. Efecto de la recristalización en la des- naturalización de las proteínas miofi- brilares en tejidos cárneos	132
4.2.8. Efecto de la recristalización en la pro- ducción de exudado	137

	Página
CAPITULO 5	
CONCLUSIONES	140
BIBLIOGRAFIA	145
NOMENCLATURA	162
Letras griegas	167

CAPITULO 1

I N T R O D U C C I O N

1.1 Consideraciones generales

La provisión de alimentos ha sido una preocupación primaria para el hombre desde el comienzo de los tiempos. La producción, procesado y distribución de los mismos han evolucionado paralelamente a la civilización y al aumento de la población. Actualmente, esta población en continua expansión trae como consecuencia problemas de alimentación a nivel mundial, avizorándose tendencias a obtener el máximo aprovechamiento de los productos de origen tanto animal como vegetal, a reducir al mínimo las pérdidas de alimentos ocasionadas por microorganismos, roedores, procedimientos deficientes, etc., y a preparar, a partir de cereales, legumbres, concentrados de proteínas de pescado y, posiblemente, a partir de las proteínas de las hojas y de organismos unicelulares, alimentos suplementarios ricos en proteínas para emplearlos en conjunción con otros alimentos.

Estos avances suponen para el mercado de productos alimenticios de origen animal una agresiva competencia. Sin embargo, en vista del papel clave de la carne y de otros productos de esta procedencia en la dieta de la mayoría de las civilizaciones y de la importancia vital de estos alimentos en el aporte de proteínas de alta calidad, minerales y vitaminas, es indudable que la demanda de carne seguirá siendo alta. Por este motivo, la magnitud de las operaciones de la industria de la carne y su importancia para la economía argentina continuarán en vigencia por un largo tiempo.

A pesar de la relevancia del tema, muchas ramas de la industria alimenticia aún se basan más en el conocimiento empírico que en datos científicos y son pocas las industrias que incorporan tecnología para mejorar la calidad y ahorrar costos. Por estos motivos y con el fin de elevar el actual nivel de estas industrias es necesario un conocimiento profundo de los mecanismos físicos, químicos y bioquímicos que sustentan los diversos procesos y conversiones que tienen lugar durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos en general y en particular de la carne.

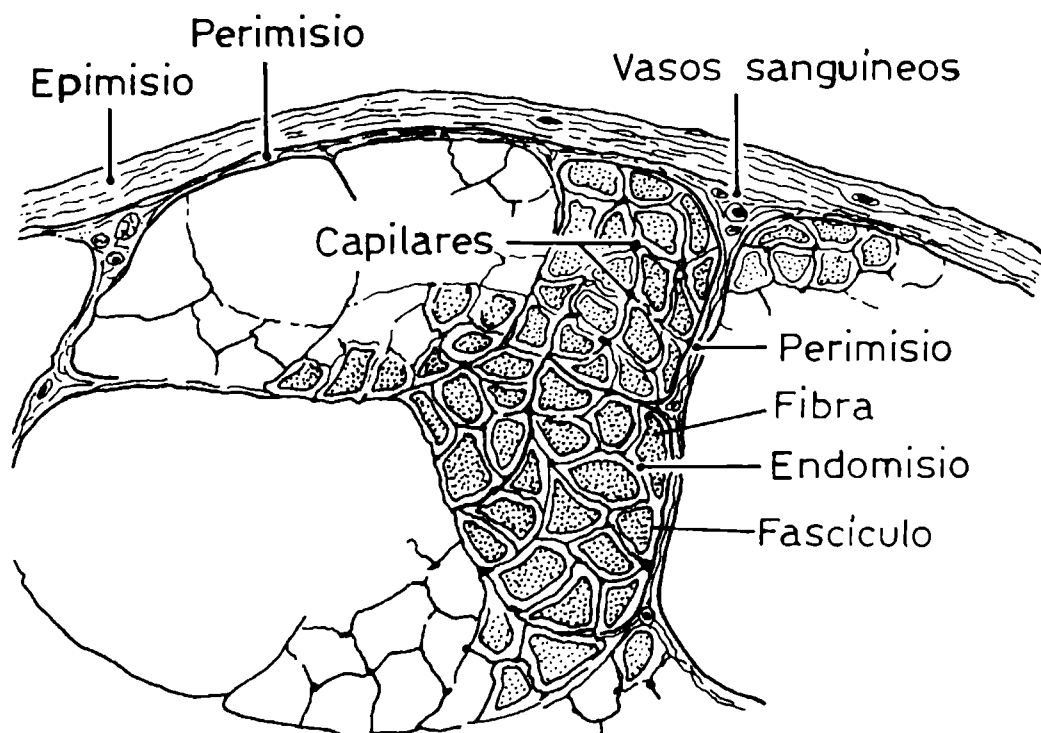


Figura 1: Esquema de una sección transversal de músculo esquelético. (Price y Schweigert, 1976).

1.2 Sistema muscular

El conocimiento de la estructura tisular, del sistema proteico, así como las reacciones bioquímicas que en el músculo se producen, a pesar de su complejidad, proporciona una base fundamental para dilucidar los efectos de los cambios que experimenta el músculo pre y post-mortem y los efectos de la temperatura y otros tratamientos sobre las propiedades nutricionales y de calidad de la carne como alimento. Por la orientación del presente trabajo, se hará una referencia sucinta de la estructura microscópica y composición química del músculo esquelético.

1.2.1 Estructura microscópica del músculo esquelético

El músculo está constituido esencialmente por fibras que se encuentran dispuestas en una forma característica debido a una serie de componentes del tejido conectivo que actúan tanto de envoltura como de elemento de separación (Fig. 1). Generalmente cada músculo está rodeado por una gruesa lámina de tejido conectivo que penetra en el músculo y recibe el nombre de **epimisio**. De éste parten elementos del tejido conectivo que penetran en el músculo, el **perimisio**. Este último divide al músculo a su vez en grupos de fibras denominadas **haces** o **fascículos**. Del tejido conectivo perimísico parten septos muy delicados que penetran en los haces y rodean a cada una de las fibras individuales denominados **endomisio**, que no debe confundirse con el sarcolema o verdadera membrana de la célula muscular.

La disposición del tejido conectivo permite el acceso al músculo de vasos y nervios; rodeando también las células adiposas. El tendón es un elemento más del tejido conectivo que une las fibras musculares a los huesos u otras estructuras.

Las fibras musculares de aspecto estriado al microscopio óptico son células multinucleadas, alargadas y tubulares. Sus extremos terminales pueden ser cónicos o redondeados, su diámetro osci

la entre 10 y 100 μm y su longitud varía considerablemente, pudiendo alcanzar algunas 35 cm. Cada célula está constituida por el **sarcolema**, delicada membrana situada inmediatamente debajo del endomisio y por el citoplasma denominado **sarcoplasma**. El sarcoplasma contiene numerosas miofibrillas paralelas, elementos contráctiles del músculo; los núcleos situados periféricamente, característica distintiva del músculo esquelético; las mitocondrias, organelos productores de energía; el retículo sarcoplásmico y sistemas tubulares transversales que intervienen en el mecanismo de acoplamiento excitación-contracción; complejos de Golgi en los polos de los núcleos; partículas y compuestos solubles como trifosfato de adenosina (ATP), creatina, mioglobina, enzimas glucolíticas, glucógeno, gotitas lipídicas, etc.

En la Fig. 2 pueden observarse los distintos niveles estructurales del músculo. A nivel microscópico, cada miofibrilla de aproximadamente 1 μm de diámetro, está compuesta por filamentos paralelos, alternativamente gruesos y delgados de miosina y actina, respectivamente. La disposición de estos filamentos es la que confiere a la miofibrilla su aspecto estriado; en el microscopio electrónico quedan delimitadas en forma bien visible las zonas oscuras (banda A) y las claras (banda I). Puede observarse también que una línea oscura, llamada línea Z, bisecciona la banda I y una zona clara en el centro de la banda A conocida como zona H. La Fig. 2 también representa esquemáticamente en sección longitudinal la estructura de un elemento de miofibrilla o **sarcómero**, y en sección transversal, la forma en que se interpenetran, filamentos delgados y gruesos deducida de los espectros de difracción de Rayos X, de imágenes logradas con microscopio electrónico y solubilización de algunos de los constituyentes proteicos.

1.2.2 Composición química de la carne

La composición química puede variar por diversos factores, entre ellos, el tipo de alimentación, raza, sexo, edad, localiza

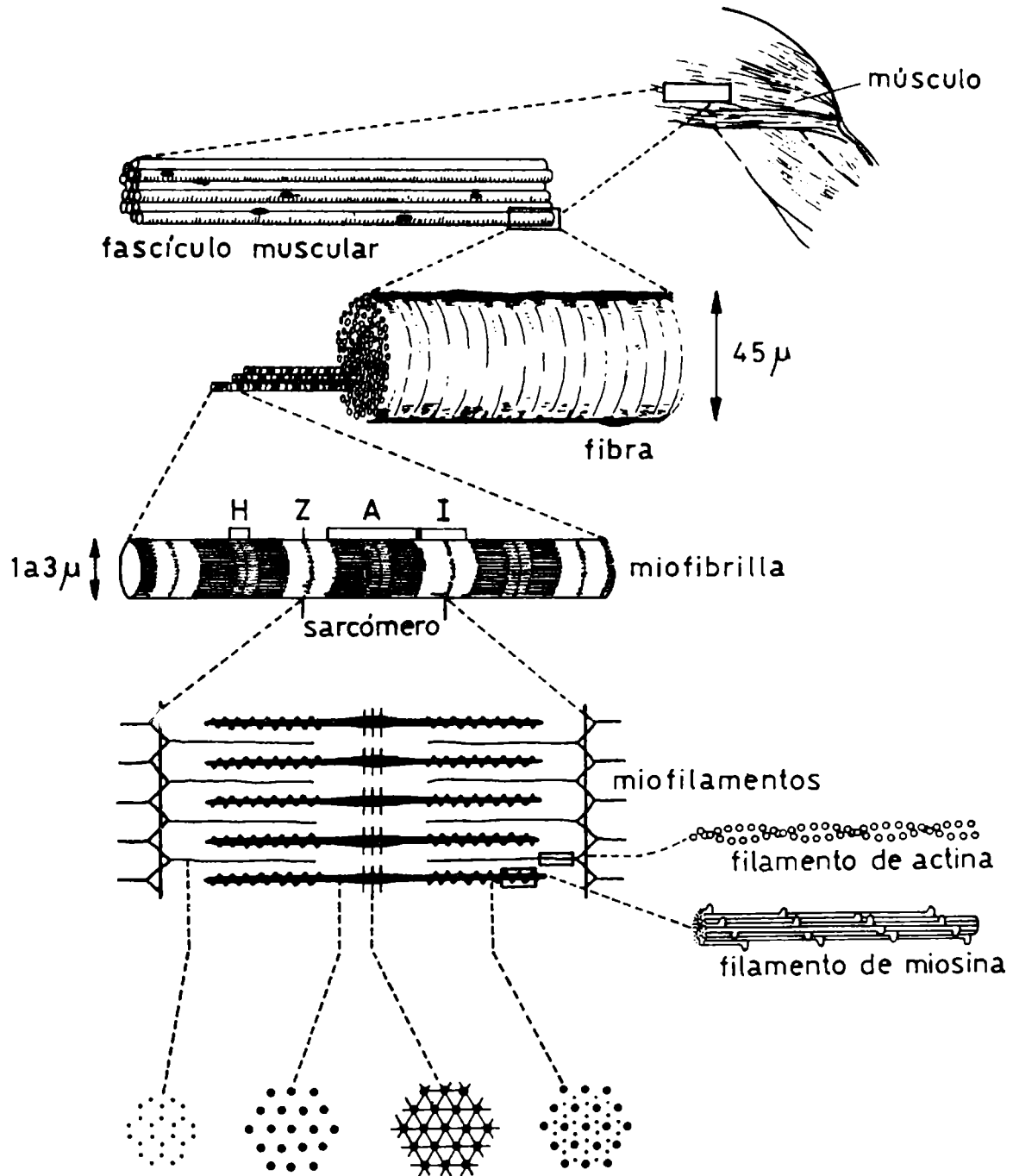


Figura 2: Organización estructural del músculo esquelético desde niveles macroscópicos a microscópicos (Fennema, 1973).

ción anatómica, ejercicio realizado por el animal durante su vida y la variabilidad entre animales (Lawrie, 1974; Cheftel y Cheftel, 1976).

La distribución de los principales constituyentes es la siguiente:

- Agua: 75,5 % con valores extremos entre 70 y 80%. Cuanto mayor es el contenido graso o la edad menor resulta la proporción de agua.
- Sólidos totales: 24,5% con valores extremos entre 20 y 30 %.
 - a - sólidos orgánicos: de 19,0 a 28,5 % con 18 a 20 % de proteínas, 3 % de lípidos de los cuales un 0,3 a 1 % son fosfolípidos y sustancias soluubles no proteicas 3,5 %.
 - b - Sólidos minerales: de 1,0 a 1,5 % de los cuales el 38 % son iones potasio intracelulares y 7 % iones sodio extracelulares.

Si se excluye el agua, las proteínas en conjunto constituyen la mayor parte del organismo animal. En el músculo vivo son los componentes más importantes por su función fisiológica y en la carne constituyen la principal fuente nutricional de alta calidad para la dieta humana. Los principales constituyentes proteicos del músculo se distribuyen en:

- proteínas sarcoplásmicas: 25 a 30 % con funciones muy diversas se encuentran las enzimas glucolítiucas, mioglobina, nucleoproteínas, prouteínas lisosómicas.
- proteínas miofibrilares : 50 %:de las cuales 54 % corresponde a miosina y 27 % a actina y en menores proporciones actomiosina, tropomiosunas, troponinas y actininas. Son las que imparten rigidez estructural al músculo y transforman la energía quíu

mica en energía mecánica durante la contracción.

- proteínas del tejido conectivo: 10 - 15 % entre las que se pueden citar el colágeno y la elastina que constituyen, junto con el armazón esquelético, el principal elemento de sostén del organismo animal.

1.2.3 Sistema muscular después de la muerte del animal

La muerte de un animal no necesariamente tiene un efecto inmediato sobre el tejido muscular, el cual por un tiempo continúa contrayéndose cuando se lo estimula. Sin embargo, los compuestos orgánicos fosfatados (ATP y derivados) que proveen la energía necesaria para la contracción se descomponen lentamente y debido a las reacciones que tienen lugar durante esta etapa el pH del músculo desciende. Una vez alcanzado cierto nivel crítico el músculo se contrae lentamente, una vez que se completa esta contracción se torna irreversible, entrándose en el estado conocido como rigor mortis. El tejido no responde más a la estimulación y se lo puede considerar "muerto". Quedan establecidos de esta manera los estados pre y post-rigor (Love, 1968; Cheftel y Cheftel, 1976).

1.3 Conservación de la carne por frío

El empleo de medios eficaces para conservar carne y sus derivados pretende retardar o evitar determinadas alteraciones que la inutilizan como alimento (cambios microbianos) o que reducen su calidad (cambios químicos y físicos).

La elección del procedimiento más adecuado debe tener en cuenta posibles fallas del método, riesgos sanitarios para trabajadores o consumidores, problemas relativos a la distribución y comercialización del producto, además de la evaluación económica e ingenieril para la aplicación comercial del método.

Varios son los procedimientos utilizados para la conservación de carnes. Algunos de ellos suelen aplicarse en forma combinada para aumentar los beneficios. El salado, ciertos conservadores químicos y la deshidratación están basados en la disminución de la actividad acuosa por debajo del nivel que permite el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos. Los tratamientos por calor, las radiaciones ionizantes y el agregado de sustancias químicas actúan por inactivación enzimática o por disminución de la cantidad de microorganismos viables (Urbain, 1976). Otro aporte importante a la conservación de alimentos lo constituyen los nuevos materiales y sistemas de envasado adecuados para cada tratamiento.

Actualmente, la refrigeración y la congelación son los métodos más usados para la conservación de la carne.

Ambos procedimientos retardan tanto el crecimiento microbiano como las reacciones químicas y enzimáticas causantes de las modificaciones deteriorativas debido a las bajas temperaturas aplicadas y en el caso de las carnes congeladas se suma el efecto de la disminución de la actividad acuosa por formación de hielo.

La congelación permite extender los períodos de almacenamiento de 5 a 50 veces con respecto a la refrigeración. Su utilización se torna significativa cuando la conservación debe sobrepasar de tres semanas a un mes (Ciobanu, 1976; Collin, 1977).

Otro método que emplea la técnica del frío y que ha comenzado a ser utilizado en pescado, es el de los productos semi-congelados, útil para períodos de almacenamiento del orden de 2 meses. Esta tecnología podría considerarse intermedia entre la refrigeración y la congelación. Consiste en elevar las temperaturas convencionales de almacenamiento congelado (-18°C) a temperaturas mayores (entre -3 y -8°C según el producto). Puede lograrse una apreciable reducción de la actividad bacteriana, los deterioros tisulares son mínimos por el reducido contenido de hielo, la desnaturalización proteica y la oxidación lipídica son bajas y se re

ducen grandemente los costos de consumo energético al compararlos con los de almacenamiento congelado. (Love, 1966a; Kato y col., 1974; Uchiyama y Kato, 1974; Fennema, 1975a, b; Bilinski y col., 1977; Gibbard y col., 1981/4).

1.4 Importancia económica de las carnes refrigeradas y congeladas en nuestro país

La estructura del comercio exterior argentino se caracteriza por una elevada participación de bienes de origen agropecuario en el total de las exportaciones. Tradicionalmente, el item carnes juega un papel muy importante en este aspecto e incluso en la economía interna del país.

Al respecto, debe mencionarse el alto consumo de carnes por habitante y por año mantenido por Argentina en los últimos años lo que nos convierte en uno de los países de más alto índice en el mundo (Tabla I). La Tabla II avala la importancia de esa actividad en el país con producciones del orden de los 3 millones de ton/año. La misma tabla muestra la importancia que tiene la carne bovina en relación al resto de la producción (88.2% promedio en el período 1980/83).

Tabla I Consumo anual de carne vacuna, ovina y porcina en kg. por habitante

PRODUCTO	1978	1979	1980	1981	1982	1983
Vacuna	90,5	84,8	85,8	85,3	70,3	67,2
Ovina	3,3	3,6	3,3	3,2	3,0	3,0
Porcina	7,9	9,4	9,5	8,9	8,0	7,0
TOTAL	101,7	97,8	98,6	97,4	81,3	77,2

Fuente: Junta Nacional de Carnes

Tabla II Producción de carne vacuna, ovina y porcina (tn. de carne peso playa)

PRODUCTO	1980		1981		1982		1983	
	tn.	%	tn.	%	tn.	%	tn.	%
Vacuna	2.839.248	88,3	2.939.205	88,9	2.550.142	88,2	2.383.573	88,2
Ovina	111.546	3,5	113.778	3,4	110.848	3,8	110,388	4,1
Porcina	263.280	8,2	253.663	7,7	230.316	8,0	206.657	7,7
TOTAL	3.214.074		3.306.646		2.891.706		2.700.618	

Fuente: Junta Nacional de Carnes

Desde el punto de vista de las exportaciones, la Tabla III presenta valores promedio del orden de 475.000 toneladas por valor de 920 millones de dólares en el período 1978/83 lo que indica el peso del rubro carnes, menudencias y extracto en el comercio argentino (la inclusión del rubro subproductos llevaría la cifra promedio a 1.360 millones de dólares, lo que significaría el 17,7 % del monto total de las exportaciones argentina en el período).

Las exportaciones de carnes bovinas enfriadas y congeladas en miles de dólares se muestran en la Tabla IV para el período 1978/1985. Los valores señalan un monto promedio de 697 millones de dólares para carne bovina en el período 1978/1981 lo que significa el 75.76 % de los montos correspondientes al total de carnes, menudencias y extractos presentados en la Tabla III. Como puede observarse, durante los años 1984, 1985 Argentina ha disminuído notablemente su actividad exportadora.

Hasta 1969 Argentina fue el primer exportador de carne vacuna. A principios de la década del 70, comenzó a retroceder en la lista de exportadores mundiales de carne quedando detrás de Australia; diez años más tarde fue desplazada por la Comunidad Económica Europea. Hacia 1983, Brasil la ha desplazado al cuarto

sitio y actualmente ocupa el sexto lugar.

Tabla III Exportaciones de carnes, menudencias, extractos

Año	Toneladas	Miles de U\$A
1978	603.062	783.946
1979	581.817	1.200.787
1980	377.384	943.869
1981	396.209	900.811
1982	420.080	778.763
1983	343.494	607.034
1984	223.060	398.034
1985	226.042(*)	374.843(*)

No incluye: ganado en pie, cueros, grasas y sebos.

Fuente: Junta Nacional de Carnes

(*) Datos provisorios

Tabla IV Exportaciones de carnes bovinas enfriadas y congeladas en miles de U\$A

	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985
Carnes	538.771	889.733	689.731	669.219	570.202	432.271	208.345	212.912
Vacunas								(*)

(*) Dato provisorio

Durante el período 1981/1983 los principales mercados de carnes refrigeradas y congeladas argentinas fueron: Mercado Común Europeo, Unión Soviética, Estados Unidos, países petroleros de Asia y Africa y países de la ALADI (Asociación Latinoamericana de Integración).

Las tendencias actuales muestran a nivel mundial la baja incidencia de las cotizaciones de los bienes de menor elaboración respecto de los de mayor valor agregado. Diversos son los orígenes de este fenómeno pero fundamentalmente se debe a la estrategia

gia de las naciones industriales orientadas hacia el autoabastecimiento de alimentos y su amplia base tecnológica y productiva (FIDE, 1985).

Esto ha permitido que países antiguamente compradores sean ahora nuestros competidores. Consecuentemente, la Argentina ha dirigido sus ventas hacia nuevos mercados. La satisfacción de los requerimientos que éstos plantean, así como el posible ingreso a otros mercados no tradicionales, conduce a la necesidad de nuevos desarrollos y nuevas tecnologías.

Las exportaciones de carnes argentinas muestran una consistente tendencia a incrementar el valor agregado. Es así que de las exportaciones de ganado en pie se pasó a las medias reses, cuartos y últimamente a cortes y porciones controladas envasadas.

1.5 Efectos de la congelación en la calidad de las carnes

Durante la congelación, ya sea de soluciones acuosas, suspensiones celulares o tejidos, el agua de la solución se transforma en cristales de hielo y prácticamente todos los componentes no acuosos se concentran en una menor cantidad de agua no congelada.

La morfología adoptada por el hielo en el tejido, el tamaño de los cristales formados y su distribución en el espacio intra o extracelular, dependen de la velocidad de congelación y revisten particular importancia en una serie de efectos macroscópicos que sufren las carnes congeladas. Estos incluyen a) cambios en la capacidad de retención de agua del músculo cuando éste es descongelado, b) cambios texturales, c) cambios en el color superficial. El primero de los efectos es el más importante, debido a las pérdidas de exudado y los cambios en las propiedades organolépticas de la carne cocida que producen.

Otros factores que influyen en la calidad de las carnes son el estado pre y post-rigor, el pH, el nivel microbiológico y los tratamientos previos a la congelación (inactivación enzimática, adición de agentes antioxidantes o crioprotectores).

Asimismo, las condiciones de almacenamiento (nivel térmico, fluctuación de temperatura, tipo de envase) influyen significativamente en el tiempo en que la calidad se mantiene en un nivel satisfactorio.

Durante el almacenamiento de carnes congeladas se producen una serie de alteraciones de tipo químico y físico. Los cambios de tipo químico involucran la aparición de olores y sabores desagradables que se originan en el deterioro de lípidos y proteínas del músculo cárnico (Jansen, 1969).

Las alteraciones lipídicas más importantes producidas son la autooxidación y la hidrólisis. Los ácidos grasos mono y poliinsaturados se autooxidan en presencia de O_2 a hidroperóxidos que luego se descomponen en aldehídos, cetonas y ácidos de bajo peso molecular responsables del olor rancio. El aumento de concentración de ácidos grasos libres se debe a la hidrólisis enzimática de fosfolípidos y en menor medida de triglicéridos. La liberación de ácidos grasos en músculo congelado se produce en general, en forma concurrente con la insolubilización de proteínas.

Cambios indeseables de color y apariencia (color marrón, pérdida de brillo, exudado) son debidos a transformaciones que ocurren en las proteínas del músculo, proteínas unidas a pigmentos o cambios en ciertas proteínas pigmentadas como por ejemplo el pasaje de mioglobina a oxi y metamioglobina.

Los cambios texturales como dureza, pérdida de jugosidad, textura gomosa y capacidad de retención de agua son atribuibles a la desnaturalización de proteínas, particularmente de las proteínas miofibrilares, que tienen lugar principalmente durante el almacenamiento congelado.

La deshidratación de las fibras provocada por la formación de hielo extracelular afecta el entorno de las proteínas al alterar las interacciones hidrofílicas-hidrofóbicas de éstas y causa así, modificaciones de sus estructuras tridimensionales, induce interacciones proteína-proteína y consecuentemente agregación .

Por otro lado, debido al aumento de fuerza iónica es esperable que, durante el almacenamiento, las proteínas miofibrilares se alteren, interactúen, formen compuestos insolubles y que la actividad enzimática de la miosina y de las proteínas sarcoplásmicas, se vea disminuída (Powrie, 1973; Partmann, 1977; Shenouda, 1980; Renerre, 1982; Wagner y Añón, 1985, 1986 a y b).

Los cambios físicos que pueden ocurrir durante el almacenamiento congelado incluyen la recristalización, el quemado por frío y la formación de eutécticos.

La recristalización del hielo, el más importante de los fenómenos físicos enunciados, conduce al aumento del tamaño cristalino sin que se modifique la masa total de agua congelada.

La quemadura por frío (freezer burn) que se presenta como superficies deshidratadas y opacas, se debe a la sublimación del hielo de la superficie del músculo cuando la presión de vapor del hielo es mayor que la correspondiente al aire circundante. Estudios histológicos revelan que la superficie tiene un aspecto esponjoso y que las cavidades microscópicas que la conforman son las responsables de la dispersión de la luz (Kaess y Weidemann, 1961). La forma de evitarla es proveyendo a las piezas cárneas de la protección necesaria para impedir las pérdidas de humedad por medio de películas plásticas adecuadas.

La formación de eutécticos requiere temperaturas inferiores a -20°C para producirse por lo que resulta de poca significación, en lo que respecta a la calidad organoléptica de productos alimenticios. Fennema (1973) hace referencia a trabajos de otros autores donde se menciona como temperatura eutéctica final para carne vacuna -52°C , hallada por métodos calorimétricos (Fennema, 1973; Powrie, 1973; Shenouda, 1980).

1.6 Cristalización del hielo

Como ya se ha mencionado, las transformaciones líquido-sólido son responsables de muchos de los cambios de calidad que expe

rimentan las carnes congeladas. Por lo tanto, la comprensión del fenómeno de cristalización cobra importancia en la búsqueda de métodos que minimicen los daños por congelación.

La cristalización es la formación de un sólido sistemáticamente organizado a partir de una solución, fundido o vapor. Tratándose de soluciones, se define la cristalización primaria a la formación de cristales del solvente puro (agua) y secundaria a la cristalización simultánea del soluto y solución restantes. Esta última requiere temperaturas muy bajas que no serán objeto del presente estudio.

Este fenómeno consta de dos etapas: nucleación y crecimiento. La nucleación involucra la combinación de moléculas que culminan en un ente ordenado, estable, denominado núcleo, sobre el cual se llevará a cabo el crecimiento cristalino. Este es simplemente el aumento de tamaño del núcleo al sumársele moléculas en forma ordenada. En un sistema policristalino ambos eventos pueden ocurrir simultáneamente. Sin embargo, es posible controlar sus velocidades relativas y por lo tanto encausar algunas de las características del sistema cristalino.

Resulta apropiado definir el término **grano**, que aparecerá en varias ocasiones, como constituyente de los sistemas policristalinos. Los granos no alcanzan su hábito natural debido a impedimentos estéricos durante el crecimiento como los causados por otros cristales o componentes de los tejidos.

1.6.1 Nucleación

Comunmente, cuando se quiere solidificar un líquido la temperatura debe disminuirse por debajo del punto de equilibrio para que ocurra la nucleación. Este subenfriamiento está vinculado a la energía de activación asociada a la nucleación, pudiéndose definir en base a los cambios en energía libre que acompañan la nucleación:

$$\Delta G = \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_p + 4 \pi r^2 \sigma \quad (1)$$

donde ΔG es el cambio de energía libre necesario para la formación de una partícula esférica ordenada, r es el radio de esa partícula, ΔG_p es la diferencia de energía libre entre las fases sólida y líquida al nivel de subenfriamiento en consideración y σ es la energía libre interfacial por unidad de área (Fig. 3).

La ecuación (1) presenta un primer término de "volumen", que es siempre negativo por debajo de la temperatura de equilibrio y que aumenta su negatividad al aumentar el tamaño de partícula. Este término se considera relacionado con la energía libre asociada a la formación de uniones hidrógeno.

El segundo es un término de "superficie" siempre positivo (desfavorable para la nucleación) que aumenta con el radio de la partícula y se lo asocia a la energía necesaria para formar una interfase, en este caso, hielo-agua (Fennema, 1973).

Como ambos términos son de signo opuesto y para radios pequeños predomina el término de energía superficial, la ecuación presenta un máximo con respecto a r (Fig. 3). Este máximo representa la energía libre de activación para la nucleación a la temperatura considerada. El radio correspondiente a este valor se denomina radio crítico (r^*) pues tiene igual probabilidad de crecer como de disminuir de tamaño. Las partículas menores que r^* se denominan embriones y tienden a desaparecer, las mayores se conocen como núcleos y tienden a crecer.

Chalmers (1977), basándose en estos conceptos, arribó a una expresión para la velocidad de nucleación en términos de número de núcleos formados por unidad de volumen y tiempo de la siguiente forma:

$$I = A T \exp - \left(\frac{B T_e^2}{\Delta T^2 T} \right) \quad (2)$$

siendo A y B constantes que sólo dependen del sistema,

$\Delta T = (T_e - T)$ el subenfriamiento y T_e la temperatura de equilibrio.

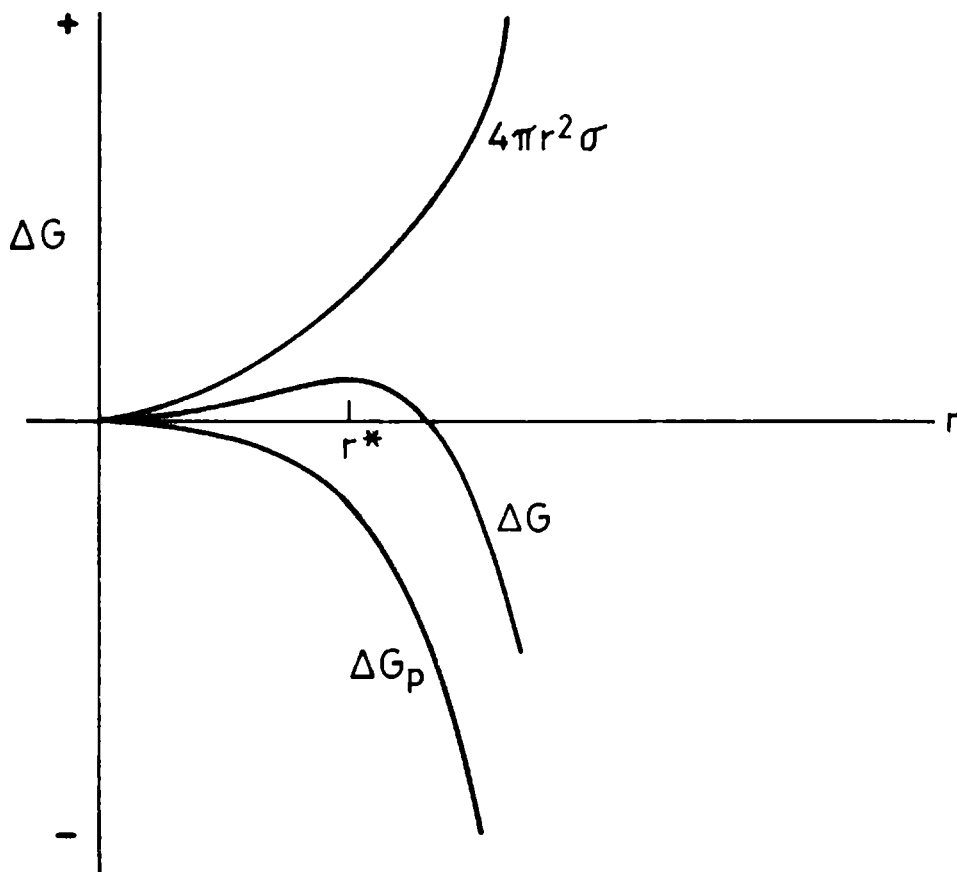


Figura 3: Cambios de energía libre durante la nucleación. (Chalmers, 1977).

La Ec. (2) es una expresión estadística donde puede apreciarse que a mayor subenfriamiento mayor será el número de núcleos formados por unidad de tiempo y volumen y que, para iguales velocidades de enfriamiento, cuanto menor sea el volumen del sistema mayor será el tiempo requerido para iniciar la nucleación.

La nucleación puede ser homogénea o heterogénea. Ambas requieren cierta energía de activación para producirse y se ven favorecidas por el subenfriamiento del sistema. La nucleación homogénea tiene lugar en sistemas puros y requiere grandes subenfriamientos para consumarse. La nucleación heterogénea, que predomina en alimentos, ocurre en presencia de cuerpos extraños llamados nucleantes que disminuyen la energía de activación, requiriendo por este motivo subenfriamientos menores.

1.6.2 Crecimiento cristalino

El crecimiento de los cristales se hace posible una vez que la nucleación ha tenido lugar y, a diferencia de ésta, sólo requiere un mínimo de subenfriamiento; en ciertos casos menos de $0,1^{\circ}\text{C}$ (Jackson y col., 1967; Chalmers, 1977; Reid, 1983).

Aún existen ciertas discrepancias acerca del mecanismo por el cual las moléculas se unen al cristal ya formado, si lo hacen en forma individual exclusivamente o por agregados o clusters de moléculas previamente formados. Obviamente, el primer caso es cuestionable y a él se refiere la mayor parte de la literatura sobre el tema (Kirwan y Pigford, 1969; Reid y col., 1970; Fennema, 1973; Chalmers, 1977).

La observación demuestra que difícilmente los cristales sean perfectos pues presentan una variedad de defectos. Estos suelen clasificarse como puntuales (vacancias, intersticiales, sustitución por impurezas), lineales (de borde o espiral) y de superficie (límite de granos o "twin boundaries"). La existencia de estos defectos cobra importancia a bajas velocidades de crecimiento al promover la existencia de sitios favorables. Cuando

la velocidad de crecimiento se hace más rápida, este aspecto pie de peso pues hay más moléculas que chocan contra la superficie cristalina con respecto a las que la dejan y por lo tanto mayor será la probabilidad de que existan moléculas con la orientación adecuada. Esto da lugar al crecimiento preferencial de ciertas caras cristalinas (Shumskii, 1964; Macklin y Ryan, 1966; Hobbs, 1974).

Según Jackson (1967) tres son los grandes factores que tie nen influencia en el crecimiento cristalino: (1) el proceso atómico de cambio de fase, (2) la energía superficial y (3) la transferencia de calor y materia. Los dos primeros factores se relacionan con la geometría de la interfase y el tercero determina la temperatura y composición del cristal.

En cuanto a que el control de velocidad de crecimiento sea por transferencia de calor o materia, Fennema (1973) concluye que en sistemas de soluciones relacionadas con alimentos, se da un control por energía ya que las moléculas de agua son pequeñas, de gran movilidad y están presentes en abundancia; excepto en las etapas finales donde cobra importancia la viscosidad del medio o cuando se enfrían piezas muy pequeñas a altas velocidades y bajas temperaturas.

1.6.3 Tamaño cristalino

El tamaño cristalino debe analizarse en términos del proceso global de cristalización. Al comparar las velocidades de crecimiento y nucleación en función del subenfriamiento (Fig. 4), según Fennema (1973), surge una explicación lógica al hecho de que alimentos rápidamente congelados contienen numerosos y pequeños cristales mientras que especímenes similares congelados lentamente contienen menor número de cristales de mayor tamaño. La Fig. 4 muestra que en un sistema no sembrado que se encuentra a una temperatura entre el punto de congelación y N^* , punto crítico en el cual la nucleación aumenta bruscamente, sólo un pequeño núme

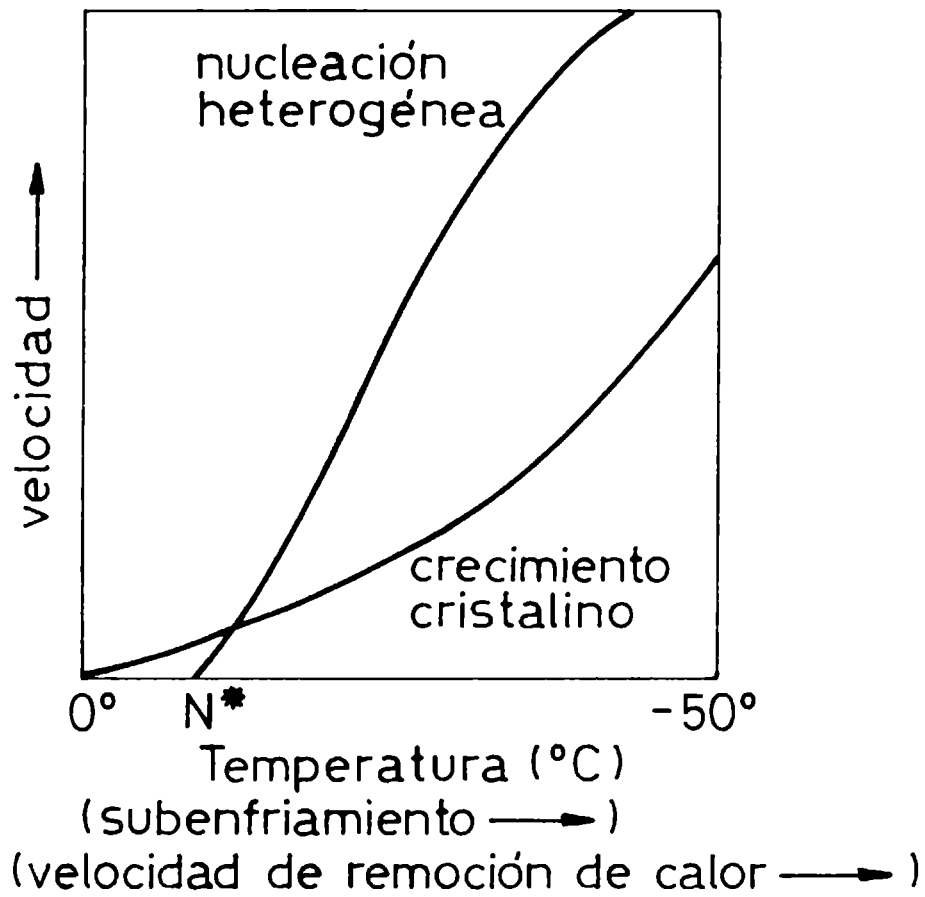


Figura 4: Esquema comparativo de las velocidades de nucleación y crecimiento del agua en función del subenfriamiento y la velocidad de remoción de calor. (Fennema, 1973).

ro de núcleos se formarán y por lo tanto crecerán mucho. Este caso corresponde a una congelación lenta durante la cual la temperatura de la muestra permanece cercana a la de equilibrio sólido-líquido. Por otro lado, un sistema enfriado rápidamente a una temperatura inferior a N^* presentará muchos núcleos, pero que sólo podrán crecer en forma limitada. Es decir, el tamaño de los cristales varía inversamente con el número de núcleos. (Grove y col., 1962; Fennema, 1973).

1.6.4 Morfología de los cristales

La apariencia externa o morfología de cristales individuales o agregados, se ve influenciada por todos aquellos factores que afecten la afluencia y la deposición de las moléculas a cristalizar sobre la interfase sólido-líquido. Entre estos factores pueden citarse: a) las condiciones térmicas como grado y uniformidad del subenfriamiento o velocidad y temperatura de enfriamiento; b) composición del medio a cristalizar: su naturaleza, grado de agitación, solutos, membranas celulares y compuestos celulares presentes; c) condiciones de superficie: curvatura de la interfase sólido-líquido, proximidad de otros cristales o superficies extrañas y d) características inherentes al crecimiento.

Con respecto a las condiciones térmicas, se ha definido la velocidad de congelación como aquella con que la temperatura desciende en un cierto punto en el sistema o la rapidez con que el frente de hielo avanza en el mismo. Por otro lado la velocidad de remoción de calor genera un gradiente de temperatura frente a la superficie de hielo que da lugar a distintas alternativas de crecimiento.

Si se considera, inicialmente, un líquido puro (agua) en contacto con una interfase sólida del mismo compuesto (hielo) bajo las condiciones que presenta la Fig. 5a, el crecimiento será estable, dando lugar a la formación de una interfase plana. De aparecer una protuberancia en la interfase, el extremo más sobresaliente

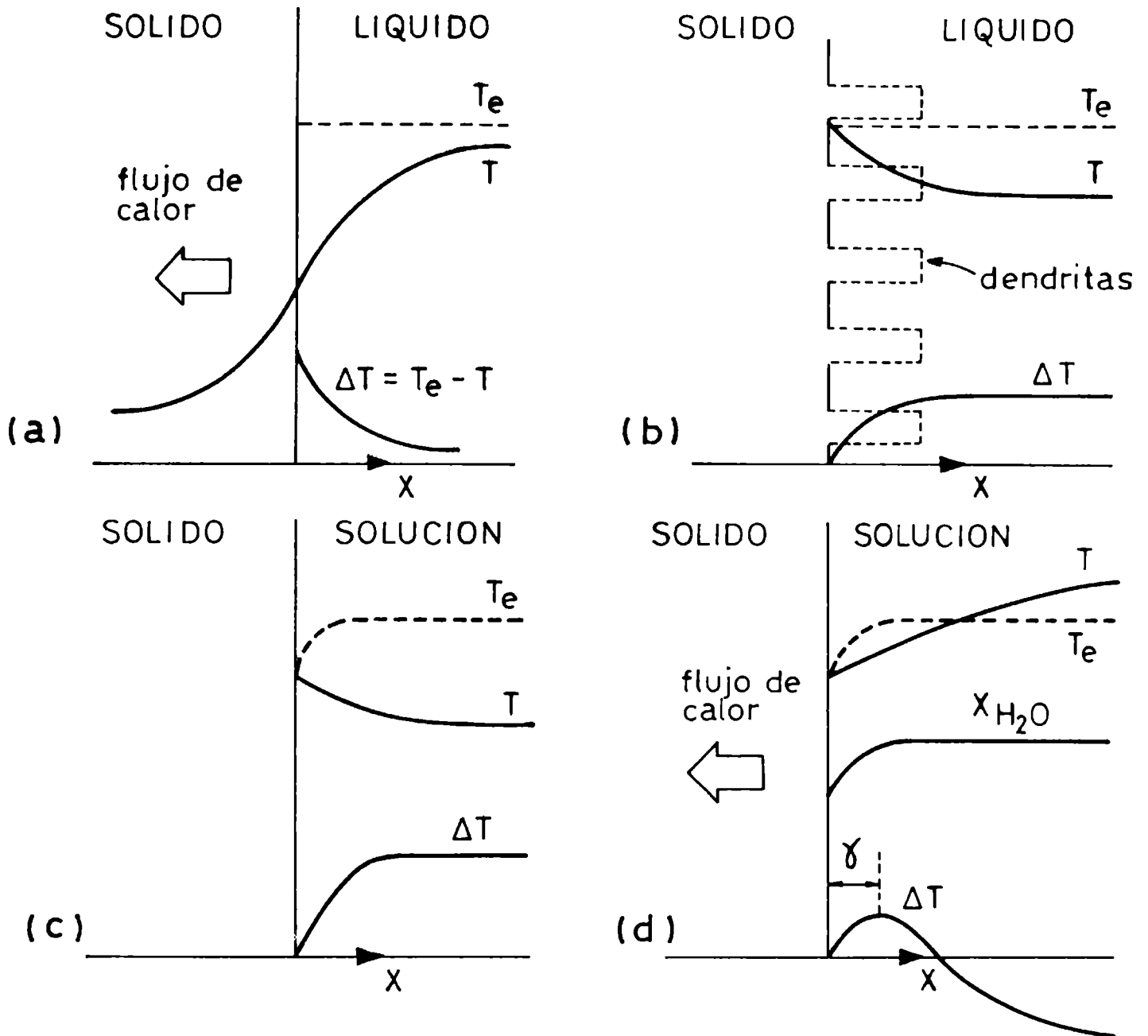


Figura 5: Condiciones alternativas que pueden presentarse para el crecimiento cristalino. a) crecimiento estable, b) crecimiento dendrítico, c) crecimiento de dendritas térmicas en solución y d) crecimiento de celdas o dendritas celulares. (Calvelo, 1981).

liente estaría menos subenfriado y crecería por lo tanto, más lentamente que el resto de la superficie; las protuberancias tienden de esta manera a desaparecer.

Si en cambio, la temperatura disminuye por delante de la interfase dando lugar a un subenfriamiento térmico, como aparece en la Fig. 5b, la formación de protuberancias se ve favorecida pues al avanzar éstas encontrarán subenfriamiento mayores. El crecimiento lateral de las protuberancias se retarda debido al calor latente de cristalización emitido hacia las zonas adyacentes. Como resultado se observa una superficie irregular con ramas normales a la interfase original y espaciadas a lo largo de ésta. Existe la posibilidad que el fenómeno se repita por formación de ramas secundarias sobre las puntas primarias y ramas terciarias sobre las secundarias, limitadas sólo por impedimentos estéricos. El cristal ramificado se conoce como **dendrita**, estructura arbórea, el crecimiento se denomina crecimiento dendrítico libre y se debe a la existencia de un gradiente de temperatura negativo delante de la interfase.

Este comportamiento puede extenderse al caso de soluciones. Al formarse un núcleo en una solución subenfriada se genera un perfil de temperatura como el que se observa en la Fig. 5c a raíz de la liberación del calor de cristalización. La variación de la temperatura de equilibrio se debe al aumento de concentración de la solución que se produce en el entorno de los cristales de hielo formados. Bajo estas condiciones se obtiene una superficie irregular con dendritas originadas en un subenfriamiento térmico, como el caso anterior.

Sin embargo, es posible generar una superficie de este tipo aún con un gradiente de temperatura positivo en la fase líquida (Fig. 5d). Como ya se ha mencionado, la acumulación de solutos frente a la interfase genera un gradiente de concentración de agua como el de la Fig. 5d que a su vez da lugar a la aparición de un gradiente en la temperatura de equilibrio (T_e). Puede ob

servarse que en ciertas situaciones (como las de la Fig. 5d) existe una condición de inestabilidad en un cierto espesor frente a la interfase (γ). Esto hace posible el avance de protuberancias que conducen a una estructura de celdas hexagonales adyacentes y superficies curvas, con segregación de solutos que concentran la solución existente entre ellas. Este es el denominado enfriamiento constitucional que tiene lugar cuando, en las cercanías de la interfase, el gradiente de temperatura de equilibrio es mayor que el flujo calórico ($\frac{\partial T}{\partial X} < \frac{\partial T_e}{\partial X}$).

La distancia (γ) en que las protuberancias permanezcan estables será tanto mayor cuanto mayor sea la concentración inicial de solutos, mayor sea la velocidad de remoción de calor y menor el gradiente de temperatura en la fase líquida. Para valores altos de γ se genera otro tipo de estructura: las células toman forma de pirámide cuadrada y crecen en la dirección dendrítica característica. Se las conoce como dendritas celulares; éstas producen una segregación de solutos diferente a la correspondiente a las celdas.

Al avanzar ambas, celdas y dendritas celulares, están sujetas a un mecanismo de selección donde prevalecen los cristales cuyo eje de máximo crecimiento coincide con la dirección del gradiente térmico.

Cuando a una solución de multicomponentes se le quita calor por uno de sus extremos, solidifica desde el borde y al presentar diferentes historias térmicas a lo largo de la misma pueden postularse zonas con distinta morfología del hielo como esquematiza la Fig. 6a y b.

Zona de nucleación: la cantidad de núcleos formados es proporcional al subenfriamiento.

Zona de crecimiento dendrítico libre: al existir un subenfriamiento de origen térmico existe la posibilidad que se de un crecimiento dendrítico libre en torno a los núcleos formados (Fig. 5c). La liberación de calor que se produce impide la formación de nue-

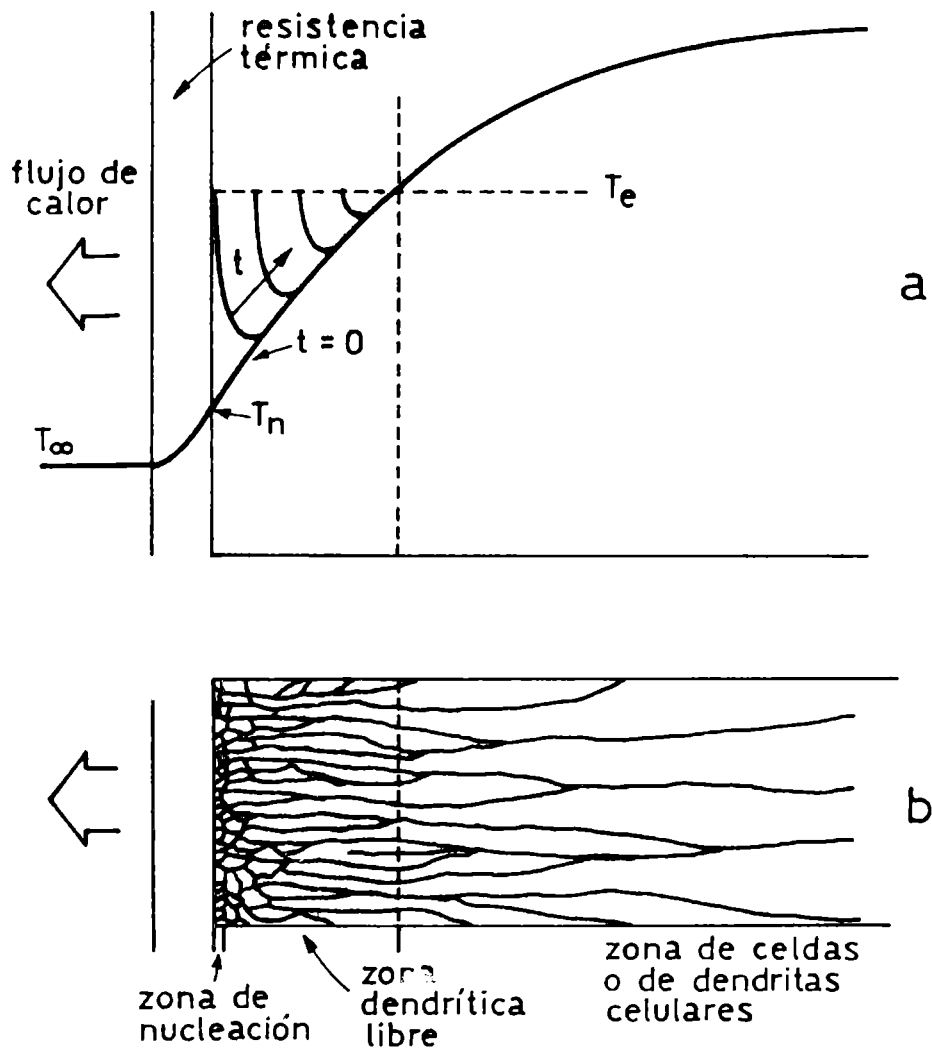


Figura 6: Morfología del hielo durante las etapas iniciales de la congelación. (Calvelo, 1981).
 a) distribución de temperaturas, T_e : temperatura de equilibrio; T_n : temperatura de interfase y T_∞ : temperatura de la fuente.
 b) morfología de los cristales.

vos núcleos. Las dendritas crecen desplazándose hacia el punto donde el subenfriamiento es nulo.

Zona columnar: la separación de hielo puro genera gradientes de concentración de soluto, provocando un subenfriamiento constitucional que da lugar al desarrollo de celdas o dendritas celulares (Fig. 5d). Al existir un crecimiento selectivo que favorece el desarrollo de los cristales orientados en la dirección del flujo calórico, las formas resultantes son columnas que crecen en longitud y diámetro.

El grado de subenfriamiento recibido por la solución determina el tipo de morfología que pueda presentarse. Macklin y Ryan (1966) afirmaron que no existen diferencias esenciales entre los hábitos del hielo formado a partir de agua subenfriada y aquellos provenientes de una solución acuosa. Así, bajo las condiciones térmicas de la Fig. 5a y bajas velocidades de congelación se presentarán superficies continuas y lisas, por ejemplo formas de disco con caras planas, difíciles de obtener pues requieren diferencias con respecto al punto de congelación de hasta $0,6^{\circ}\text{C}$ (Lusena y Cook, 1953, 1954; Williamson y Chalmers, 1967).

Con subenfriamientos térmicos moderados (Fig. 5b, c) o subenfriamientos constitucionales (Fig. 5d) y velocidades de enfriamiento mayores ($15^{\circ}\text{C}/\text{cm}$), según Harrison y Tiller (1963) pueden obtenerse superficies continuas e irregulares de tipo dendrítico celular con simetrías hexagonales (Holmes y col., 1957; Plaskett and Winegard, 1959; Tiller, 1964), o irregulares con subenfriamientos del orden de 5 a 30°C (Knight, 1967; Mackenzie, 1975).

La presencia de interfases discontinuas, por nucleación de muchos cristales simultáneamente, también en los casos de las Figs. 5b, c y d, se debe a velocidades de enfriamiento grandes y bajas temperaturas, generalmente logradas en especímenes de reducido tamaño. Luyet y sus colaboradores (Luyet y Rapatz, 1958; Perdsidsky y Luyet, 1960) al estudiar distintas soluciones acuosas congeladas encontraron las siguientes estructuras: formas

hexagonales (placas, estrellas, rosetas), dendritas irregulares, esferulitas, esferulitas evanescentes, rosetas irregulares lobuladas y formas intermedias. Resulta destacable que las esferulitas evanescentes, obtenidas a muy altas velocidades de enfriamiento, sólo demuestran su carácter cristalino en estudios de Rayos X, ya que por observación al microscopio óptico resultan transparentes y bajo luz polarizada presentan la Cruz de Malta característica de las esferulitas. Son estructuras de cristalización incipiente que pueden completarse por recristalización irruptiva. (Luyet, 1966).

De las morfologías cristalinas enunciadas en alimentos congelados o especímenes biológicos de más de 1 cm^3 , aún rápidamente congelados, sólo podrán presentarse las estructuras hexagonales, debido a las velocidades de remoción de calor y subenfriamientos que pueden lograrse. Al respecto Partmann(1975) señala que los subenfriamientos registrados en tejidos musculares no superan $6,5^{\circ}\text{C}$ y en frutas 9°C .

1.6.5 Cristalización del hielo en tejidos musculares

Dada la complejidad que presentan los tejidos musculares, los equilibrios sólido-líquido se representan a través de curvas tiempo-temperatura, ya que resulta dificultoso hacerlo a través de los diagramas de fase convencionales. Además, es de destacar que sólo las velocidades de congelación lenta permiten observar el comportamiento en condiciones cercanas al equilibrio en sistemas naturales.

La relativa simplicidad de las curvas de congelación de materiales biológicos puede observarse en la Fig. 7 donde se presentan tres casos correspondientes a distintas velocidades de enfriamiento.

La característica más notable de estas curvas es la ausencia de mesetas correspondientes a los eutécticos provenientes de los diversos solutos presentes, probablemente esto se deba a la

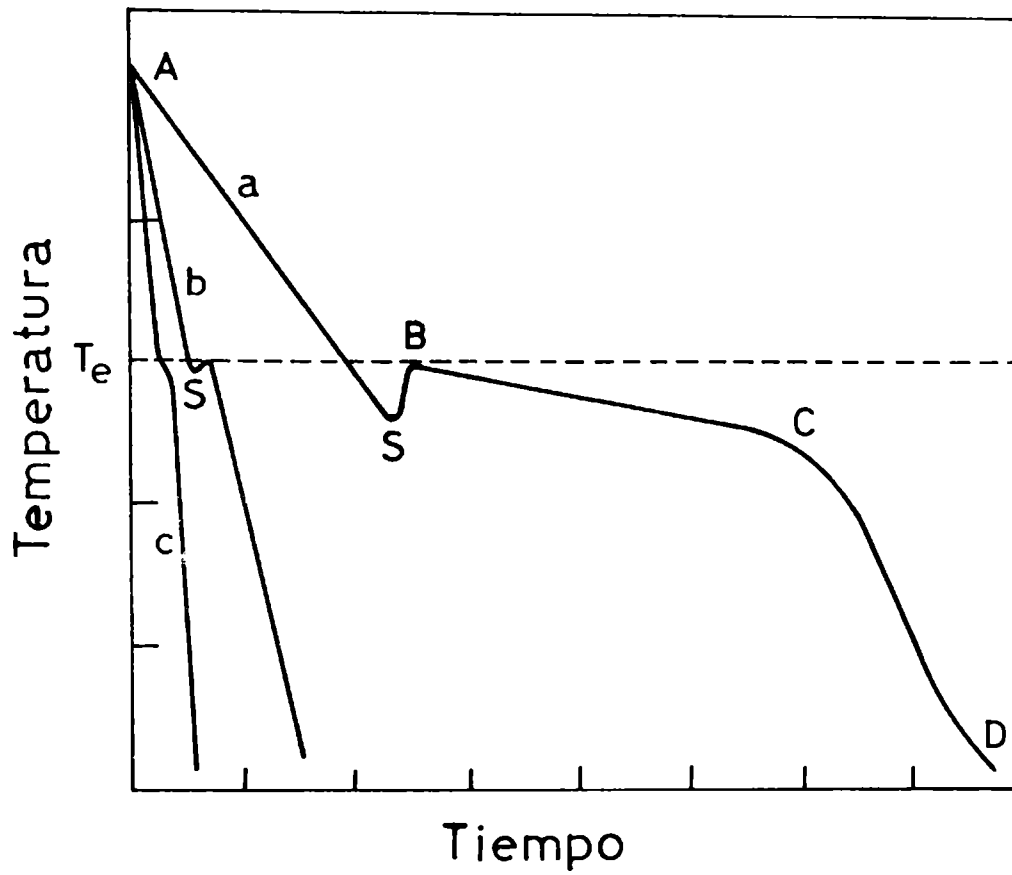


Figura 7: Curvas esquemáticas de congelación de alimentos y material biológico. La velocidad de enfriamiento aumenta de la curva a) a la c). (Fennema, 1973).

baja concentración inicial de los solutos, y por otro lado a que algunos de éstos permanecen en condiciones de sobresaturación y no cristalizan (Fennema, 1973).

La forma aparente de la curva para sustancias complejas es es tá influenciada por el tipo y cantidad de solutos, su solubilidad en los sistemas multicomponentes, su tendencia a formar soluciones metaestables y la uniformidad de temperatura en la muestra, generalmente baja en especímenes de ciertas dimensiones donde los gradientes térmicos son importantes.

En la Fig. 7, la curva (a) representa una situación cerca na al equilibrio. El enfriamiento desde el punto A al S involucra sólo la remoción de calor sensible. El subenfriamiento indicado por el punto S, aunque no siempre es detectable, ocurre en prácticamente todas las piezas. Su visualización en la curva depende de la sensibilidad, tiempo de respuesta y ubicación del dispositivo de medición de temperatura. La liberación del calor de cristalización que se produce en S hace aumentar la temperatura a valores cercanos al del punto de congelación inicial, B. La sección B-C representa el período durante el cual se produce la cristalización de la mayor cantidad de agua y aparece como una meseta con una leve pendiente negativa. Esto es debido a que el calor generado por la cristalización debe ser removido durante la congelación y a que el hielo formado conduce a un aumento de concentración de solutos en la fase líquida.

A partir del punto C el aumento de masa de hielo implica un sustancial y cada vez mayor aumento de la molalidad de la fase líquida. Al existir menor proporción de agua congelable la remoción de calor conduce a una mayor reducción de la temperatura de la muestra durante C-D que durante B-C. Luego de alcanzarse el punto D aún las muestras contienen cierta cantidad de agua congelable, a menos que se haya alcanzado el punto eutéctico final de la muestra.

Cuando la velocidad de remoción de calor aumenta, las disis

tintas etapas de enfriamiento y congelación pueden tornarse indistinguibles como ocurre en la curva (C). (Fennema, 1973).

Como se ha mencionado, la transformación del agua del tejido en hielo no es un proceso instantáneo y completo, progresa a medida que desciende la temperatura. Varios son los autores que han determinado la cantidad de hielo presente a distintas temperaturas (Moran, 1930; Riedel, 1957; Love, 1966b; MacKenzie, 1975) algunos por métodos calorimétricos, otros dilatométricos o histológicos (Fig.8).

En tejidos musculares, cerca del 80 % del agua congelable se convierte en hielo entre -1 y -7°C . Al disminuir la temperatura continúa aumentando la fracción de agua congelada en forma relativamente menor. Sin embargo, existe una cierta proporción de agua no congelable, ligada a proteínas, que no es removible aún en las cercanías del cero absoluto. Love (1968) hizo referencia a trabajos de otros autores donde se señala que el agua ligada corresponde al 9,5 % del agua total; mientras que Moran (1930) concluyó que este valor no superaba el 6 %.

Por lo antes mencionado, resulta difícil definir un punto final de congelación con claridad, sumado a las discrepancias que al respecto presentan diversos autores (Powrie, 1973; Brennan y col., 1980). Love (1968) señaló que probablemente esto se deba a que pequeños errores de medida tienen gran influencia en resultados correspondientes a la última zona de la curva de fracción de agua congelada.

1.6.5.1. Consideraciones acerca de la determinación de la velocidad de congelación en tejidos cárneos

La cristalización del hielo en tejidos cárneos ha sido estudiada en su mayor parte por criobiólogos en relación con la congelación de microorganismos y su posibilidad de supervivencia (Mazur, 1966). Estos estudios fueron realizados en sistemas pequeños donde no había gradientes térmicos significativos. Sin em

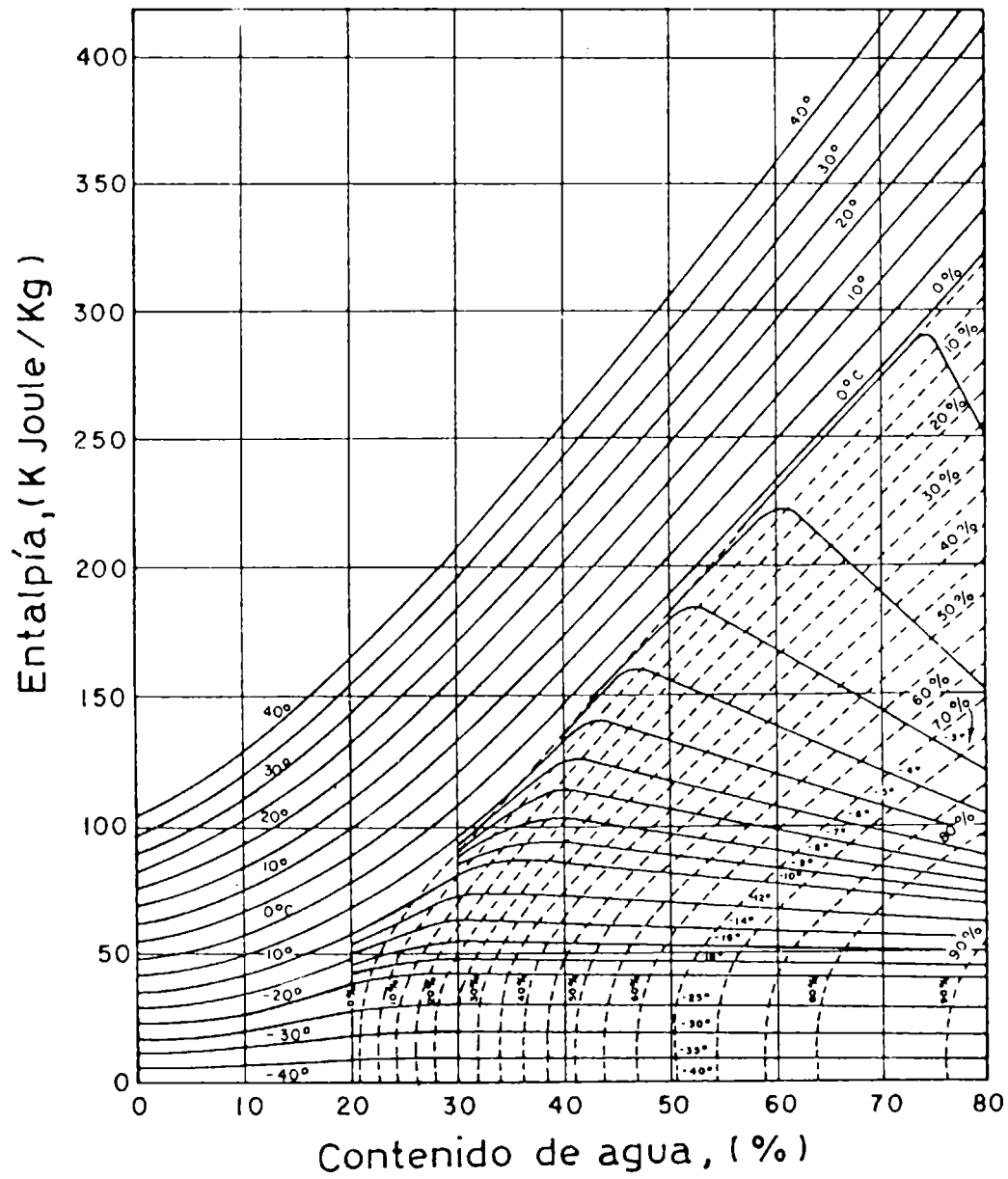


Figura 8: Diagrama entalpía - contenido de agua para músculo bovino. (Riedel, 1957).

bargo, la congelación de carne bajo condiciones industriales conduce a importantes gradientes térmicos y esto hace que la velocidad local de congelación en el borde de la pieza sea muy diferente a aquella del centro de la misma.

Bevilacqua y col. (1979) y Añón y Calvelo (1980), frente a la diversidad de criterios para definir el término de velocidad de congelación adoptaron al tiempo característico (t_c) como medida de velocidad de congelación local. Este se define como el tiempo transcurrido para que la temperatura del punto bajo análisis descienda de $-1,1^{\circ}\text{C}$ a -7°C . Estas temperaturas fueron elegidas pues $-1,1^{\circ}\text{C}$ es el punto de congelación de la carne vacuna y a -7°C ha congelado el 80% del agua del sistema, ya mencionado.

Como a nivel industrial el conocimiento de la velocidad local no resulta práctico y dado que la predicción y el control del tiempo de congelación tienen gran importancia, no sólo por motivos de calidad sino porque ese tiempo determina la capacidad de producción de un determinado equipo y, por lo tanto, la economía del proceso, se hace necesario definir tiempos y velocidades globales de congelación.

La definición del término "tiempo de congelación" presenta algunas dificultades; su utilización hace necesario establecer previamente los momentos inicial y final de la congelación. Como ya se ha señalado, tratándose de piezas relativamente grandes, la temperatura varía en función del tiempo y la posición del punto de medida. Industrialmente, el centro térmico, punto del producto donde se registra la mayor temperatura, es utilizado usualmente para seguir la historia térmica durante la congelación.

Un criterio para definir tiempo de congelación, empleado en lo referente a calidad, es el tiempo requerido para que se forme la mayor cantidad de hielo en el producto. El Instituto Internacional del Frío (1972) define el tiempo de congelación nominal como aquel que transcurre entre el momento en que la superficie del producto alcanza el 0°C y el instante en que

el centro térmico se encuentra a 10°C por debajo de la formación inicial de hielo en dicho punto.

Otro criterio, utilizado para conocer el tiempo que un producto debe permanecer en el equipo de congelación, conduce a la definición del tiempo efectivo de congelación. Este es el tiempo necesario para reducir la temperatura inicial del producto hasta un valor dado en el centro térmico.

A partir de los tiempos de congelación y en forma similar a éstos, pueden definirse velocidades globales de congelación, las cuales dependen no sólo de la masa de la carne, en este caso, y de sus propiedades térmicas (calor específico y conductividad térmica) sino también de la temperatura del medio refrigerante, del procedimiento de refrigeración y de la naturaleza del material envolvente si lo tuviera (Lawrie, 1974).

La velocidad de congelación lineal puede definirse como:

$$v = \frac{dl}{dt} \quad (3)$$

donde l es el espesor de la zona congelada y t el tiempo de congelación. Como ésta varía con la posición puede considerarse una velocidad lineal promedio (nominal), Ciobanu y col. (1976) la definen como:

$$\bar{v} = \frac{l_0}{\tau_0} ; \text{ (cm/h)} \quad (4)$$

donde l_0 es la menor distancia en cm entre el centro térmico y la superficie y τ_0 es el tiempo nominal desde una temperatura uniforme inicial (p. ej. punto de congelación) a la temperatura final del centro 10°C por debajo de la primera.

Otra expresión utilizada es la velocidad efectiva que tiene en cuenta el descenso de la temperatura desde un dado valor inicial hasta un valor determinado en el centro térmico. Esta última, junto con el tiempo efectivo sólo tienen sentido si se especifican claramente condiciones iniciales y finales (Ciobanu y col., 1976).

Otra definición (Fennema, 1973) es la que considera la velocidad con la cual la pieza cambia de temperatura durante la última etapa de la congelación (en la Fig. 7 a partir del punto C de la curva (a)). Esta definición resulta apropiada ya que es durante ese período donde se producen la mayor cantidad de daños por congelación. Se expresa generalmente en grados/min.

1.6.5.2. Localización de los cristales de hielo en tejidos musculares

Al analizar la localización de los cristales de hielo y los efectos que éstos tienen en la estructura tisular deben considerarse las influencias que ejercen la naturaleza del tejido y las células, la velocidad de congelación y el estado fisiológico del tejido.

Naturaleza del tejido y las células

Como el tejido cárneo es un sistema de multicomponentes constituido por espacios intra y extracelulares, los mecanismos de congelación previamente descritos deben analizarse en términos de compartimientos. Comúnmente se acepta que la membrana celular o sarcolema actúa como barrera, impidiendo el libre crecimiento de los cristales, aunque aún persisten discrepancias en la literatura acerca de la función de la membrana a este respecto (Mazur, 1966).

Velocidad de Congelación

En términos generales, se acepta que la nucleación ocurre únicamente en el espacio extracelular cuando se emplean velocidades de congelación lentas (Meryman, 1966; Love, 1968; Bevilacqua y col., 1979).

Bajo condiciones de cristalización extracelular se obtiene como resultado grandes cristales de hielo, máxima cantidad de agua desplazada y por lo tanto tejidos distorsionados con células comprimidas.

En cambio, a velocidades de congelación altas, la nuclea-

ción ocurre no sólo en los espacios extracelulares sino también en los intercelulares. El espacio extracelular sólo ocupa una fracción muy pequeña respecto al volumen total. Para que esto ocurra son necesarias bajas temperaturas y velocidades de congelación muy altas, mayores que $1^\circ/\text{min}$ según Fennema (1973) o 20 min de tiempo característico según Calvelo (1981). Histológicamente se observa gran número de cristales pequeños, mínimo desplazamiento de agua y una apariencia similar a la del tejido fresco. La calidad de estos tejidos es generalmente superior a los congelados lentamente, tratándose de alimentos. Sin embargo, cuando se trata de conservar viabilidad, la congelación intracelular puede contribuir al aumento del porcentaje de letalidad. (Levitt, 1966; Mazur, 1966).

Bajo las condiciones usuales de congelación en la industria cárnica la zona de cristalización intracelular es muy reducida (1-2 cm). Por lo tanto, la mayor parte de los cortes industrialmente congelados se caracterizan por poseer hielo extracelular, fibras de formas irregulares y parcialmente deshidratadas (Calvelo, 1981). Cuando menor sea la velocidad de congelación (mayor tiempo característico) tanto mayor será el tamaño de los cristales formados (Bevilacqua y col., 1979).

Los cristales de hielo formados crecen hacia el centro del corte por alguno de los mecanismos descritos en la sección 1.6.5 (crecimiento dendrítico libre, celdas, o dendrítico celular). La zona de crecimiento dendrítico libre es muy reducida y su extensión ha sido calculada por Menegalli y Calvelo (1979). Por lo tanto, la mayor parte del corte presenta crecimiento de celdas o dendritas celulares, prevaleciendo las de orientación preferencial y mayor tamaño.

Algunas de las teorías que explican la relación entre velocidades lentas de congelación y cristalización extracelular se basan en la diferencia existente entre los líquidos intra y extracelular, con respecto a propiedades tales como punto de congela

ción, nucleantes disponibles y tamaños capilares (Levitt, 1966; Love, 1966b; Mazur, 1966; Meryman, 1966). Dentro de las células existe mayor concentración iónica, con respecto al fluido exterior a la misma, pero dada la característica semipermeable de la membrana que la rodea sustancias tales como proteínas no difunden. Por este motivo es esperable un menor punto de congelación dentro de la célula que fuera de ella (Koonz y Ramsbotton, 1939; Love, 1966b).

Durante la congelación extracelular, el hielo se forma primeramente fuera de la célula por lo anteriormente señalado, y crece a expensas del agua intracelular que difunde a través de la pared celular para igualar actividades acuosas. La temperatura del fluido intracelular no alcanza la correspondiente al punto de fusión, ya que continuamente se pierde agua de la célula con la correspondiente reducción de la temperatura de equilibrio. En consecuencia, las fibras deshidratadas aparecen rodeando a los cristales de hielo y la estructura se distorsiona.

Al aumentar la velocidad de enfriamiento se minimiza la oportunidad de deshidratación celular, presentándose una situación diferente. La teoría más aceptada propone la formación primeramente de hielo extracelular como en el caso anterior, pero dada la elevada velocidad de remoción de calor las células no tienen tiempo de deshidratarse completamente y cierta cantidad de agua congelable permanece en la célula. La célula podrá así alcanzar el subenfriamiento necesario para que se produzca la nucleación dentro de ella. A altas velocidades de congelación prácticamente no hay intercambio de agua a través de la membrana y los cristales de hielo aparecen igualmente distribuidos en todo el tejido (Love, 1968; Luyet, 1968).

Estado Fisiológico

Los efectos de la congelación en los distintos miosistemas

son considerablemente diferentes según el músculo se encuentre en estado de pre o post-rigor (Partmann, 1973).

Además de la diferencia de contractibilidad que presentan los estados pre y post-rigor pueden diferenciarse por la humedad que exhiben los cortes de tejido post-rigor frente a los otros. La humedad se debe a la contracción de las células en forma individual que se presenta luego del rigor mortis y la exudación hacia el espacio extracelular de un fluido acuoso (Love, 1968; Voyle, 1974).

El bajo contenido de agua fuera de las fibras en el estado pre-rigor explicaría la formación de hielo intracelular, aún con velocidades de enfriamiento que corresponden a congelación extracelular en tejido post-rigor. Según Love (1968) existen dos posibles mecanismos que lo interpretan: a) al existir altas concentraciones de solutos de las fibras el punto de congelación resulta menor que el correspondiente al interior de las fibras y es allí donde daría comienzo la cristalización, y b) el hielo se formaría inicialmente, en el espacio extracelular pero las células no se deshidratarían pues los fluidos celulares en estado pre-rigor están fuertemente unidos a proteínas y por lo tanto disminuiría la difusividad del agua intercelular.

El comportamiento del músculo pre-rigor depende de las velocidades de congelación y descongelación. En las peores condiciones una vez descongelado sufre un fuerte acortamiento. Morfológicamente este músculo es una masa contraída, fisiológicamente ha perdido su contractibilidad y microscópicamente no presenta su regular estructura estriada (Partmann, 1973), a diferencia del músculo post-rigor congelado y descongelado, lenta o rápidamente, que aún presenta su característica estructura estriada. (Luyet, 1968; Partmann, 1975).

1.7 Cambios que ocurren en los cristales durante el almacenamiento.

Recristalización del hielo.

Durante el almacenamiento congelado se producen ciertos cambios metamórficos agrupados bajo la denominación **recristalización**, originados en la inestabilidad de los cristales de hielo ya formados. El término recristalización involucra todos aquellos cambios en número, tamaño, forma, orientación o perfeccionamiento de los cristales o granos que puedan producirse una vez que la solidificación se ha completado, es decir, cuando ya no existan variaciones en la masa cristalina. Estos cambios se producen, pues los sistemas tienden a su estado de equilibrio donde la energía libre es mínima y se igualan los potenciales químicos de las distintas fases.

Fennema (1973) ha clasificado el fenómeno de recristalización en a) iso-masa, b) migratoria, c) por aglomeración o adherencia ("accretive"), d) inducida por presión y e) irruptiva, siendo b) y c) las que más probablemente se produzcan en alimentos congelados. Todas tienen en común su tendencia a disminuir la energía superficial de la fase cristalina. La recristalización de tipo iso-masa ocurre cuando un cristal de forma irregular y alta relación superficie a volumen como en el caso de las dendritas adopta una estructura más compacta (Moran y Hale, 1932; Shumskii, 1964). Este es el caso típico de las transformaciones polimórficas, aunque difíciles de observar en condiciones comunes de comercialización.

La migratoria o crecimiento de grano implica la tendencia de los cristales más grandes, en sistema policristalinos, a crecer a expensas de los menores. Este tipo de recristalización será más extensamente desarrollado en los capítulos siguientes. La aglomeración ocurre cuando cristales en contacto se unen para formar uno nuevo de mayor tamaño, consecuentemente, existirá una disminución del número de cristales y una disminución de la energía libre de toda la fase cristalina. Este tipo de recristalización,

frecuente en especímenes vivientes y alimentos congelados, ha recibido otros nombres aunque no muy apropiados como sinterizado pues implica calentamiento, refusión ("regelation") que implica presión externa y agregación.

La recristalización inducida por presión conduce a un crecimiento preferencial de los cristales cuyos planos basales están alineados en la dirección de la fuerza aplicada, a expensas de los otros con orientaciones desfavorables.

La recristalización irruptiva se presenta cuando ciertos sistemas han solidificado en un estado parcialmente no cristalino y al ser calentados a determinadas temperaturas, características de los solutos presentes, cristalizan abruptamente (Luyet, 1960).

Cualquiera sea el tipo de recristalización las bajas temperaturas y la constancia de éstas minimizan los efectos que este fenómeno pueda ocasionar a los tejidos.

1.8 Objetivos

El objetivo general del presente trabajo de tesis es el estudio del fenómeno de recristalización del hielo en sistemas modelo, su extensión a carnes congeladas y almacenadas y el análisis de los efectos de las fluctuaciones de temperatura en el tamaño cristalino.

Este objetivo general involucra alcanzar una serie de objetivos específicos que consisten en:

- Analizar el fenómeno de recristalización en soluciones que permitan visualizar microscópicamente el comportamiento de los cristales individuales, con el fin de establecer las modificaciones que sufren las distribuciones cristalinas, postular una cinética de recristalización y estudiar el efecto de las oscilaciones térmicas.
- Optimizar las técnicas de observación microscópica indirecta de tejidos congelados, específicamente la de sustitución a

baja temperatura para su utilización en un amplio rango de temperatura por debajo del punto inicial de congelación del tejido, lo cual la hace aplicable al estudio de tejidos congelados y de los denominados semicongelados.

- Aplicar la técnica histológica previamente mencionada al análisis del fenómeno de recristalización en tejidos cárneos congelados y almacenados durante períodos prolongados, estableciendo comparación con ecuaciones cinéticas postuladas en estudios llevados a cabo durante cortos tiempos de almacenamiento.

CAPITULO 2

RECRISTALIZACION DEL HIELO EN SISTEMAS MODELO

El aporte que introduce el estudio de soluciones simuladas de sistemas complejos, está directamente ligado con la simplificación con que pueden ser tratados los principios básicos involucrados en procesos reales. Tanto biólogos como científicos en alimentos, se han valido de este recurso, siendo los primeros los que proveen mayor información al respecto.

Luyet, junto con otros investigadores, ha dedicado grandes esfuerzos a esclarecer el comportamiento, frente a temperaturas de congelación, de soluciones acuosas relacionables con sistemas biológicos. Se han empleado distintos solutos, como glicerol, etilenglicol, gelatina, dextrina, sacarosa, glucosa, entre otros y concentraciones variables de los mismos (Luyet, 1957, 1960, 1966, 1968; Luyet y Rapatz, 1958; Luyet y col., 1958). Sin embargo, la mayoría de las contribuciones de la literatura acerca de la recristalización del hielo, son descripciones cualitativas del fenómeno, siendo la información cuantitativa muy escasa (Jellinek y Gouda, 1969).

Según la disciplina, el fenómeno en estudio recibe distintos nombres: recristalización, si se trata de material biológico, alimentos y sistemas acuosos; crecimiento de grano (grain growth), de tratarse de metales puros o aleaciones y materiales cerámicos. En estos dos últimos casos se han hecho importantes contribuciones teóricas. Los fenómenos relacionados con el desplazamiento de interfases en materiales sólidos, llevan asociados cambios en propiedades físicas, mecánicas, eléctricas, de cohesión de fases dispersas, en porosidad, etc., resultando de interés práctico, ya que, el conocimiento de estos procesos, conduce al control de las características indeseables de un producto (Beck, 1954; Kingery, 1960a; Burke, 1966; Brook, 1976).

Obviamente, la matriz cristalina específica proveniente de una solución, diferirá de una fina estructura inicial, típica de metales sometidos a deformaciones en frío o de una estructura de tamaños de partículas grandes e importante porosidad, carac-

terística de materiales cerámicos obtenidos de polvos compactados. Pero las interfases cristalinas se comportan en forma similar por lo que su estudio representa un aporte interdisciplinario.

Con el objeto de analizar la naturaleza del fenómeno de recristalización del hielo en solución modelo salina, se propuso: a) determinar tamaños y formas cristalinas por observación microscópica directa. b) cuantificar los efectos de la temperatura en la cinética del proceso, por medio del análisis de las distribuciones cristalinas y c) evaluar la influencia de las oscilaciones térmicas.

2.1 Parte experimental

Los ensayos fueron realizados con un sistema modelo, constituido por solución acuosa de NaCl 0,28N. Este sistema presenta una variación de fracción de agua congelada (ω), con la temperatura similar a la del tejido cárneo. Esto puede confirmarse en la Fig. 9, donde la curva de congelación de la solución 0,28N de NaCl obtenida a partir del diagrama de equilibrio agua - NaCl (Woolrich, 1965), está representada junto con los valores hallados por Riedel (1957) calorimétricamente, para la fracción de agua congelada, a distintas temperaturas, de carne vacuna con un contenido de agua en base seca de 75%.

El equipo utilizado (Fig. 10a y b) constaba de un intercambiador de acrílico, donde se colocaba la muestra a ser observada por medio de un microscopio Leitz Ortholux II con cámara fotográfica incorporada y dos criostatos que se encontraban a diferente temperatura, los cuales suministraban el líquido refrigerante (etilenglicol - agua, 3:1 en volumen) que, por medio de un adecuado sistema de llaves de 2 y 3 vías, permitían realizar las fluctuaciones de temperatura en el mismo portamuestras. El sistema de mangueras y llaves estaba provisto de aislación térmica. Las llaves de 2 vías permitían la recirculación del líquido refrigeran

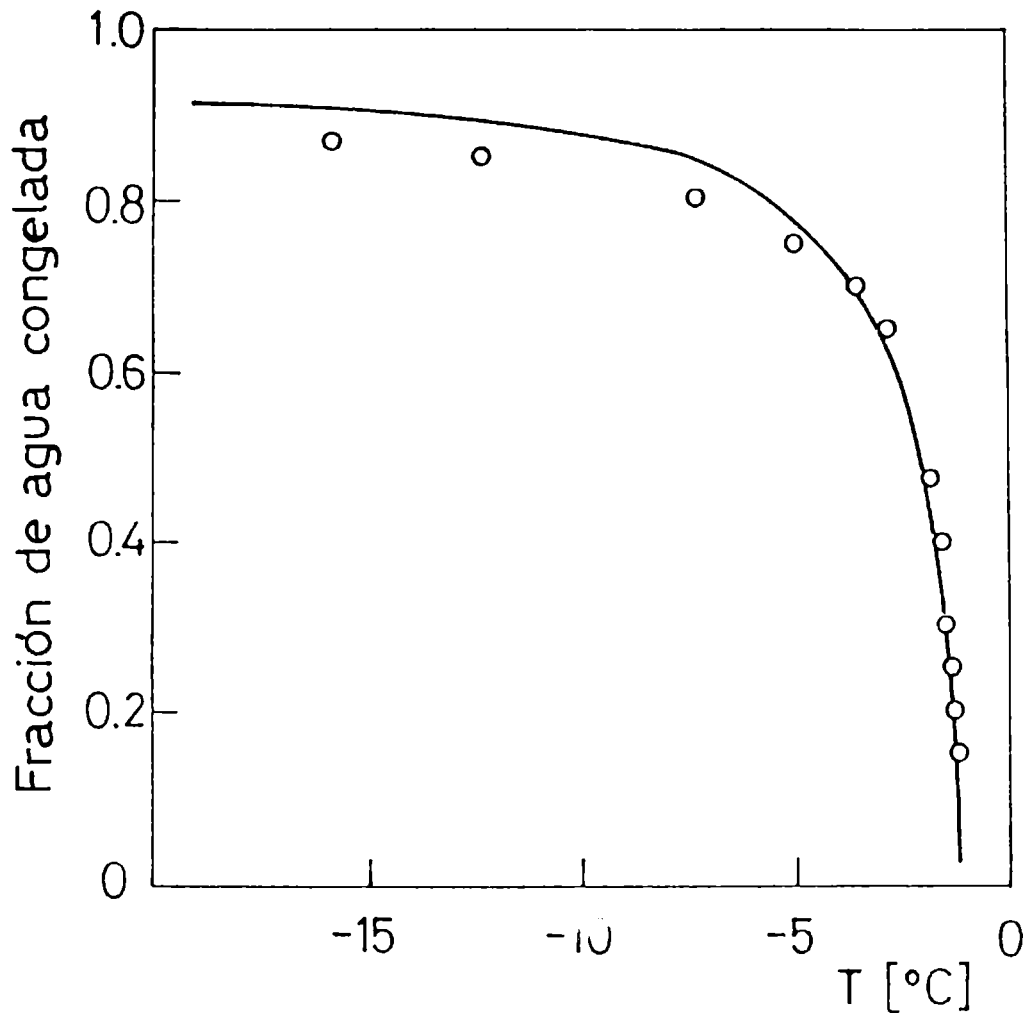


Figura 9: Curva de congelación para solución 0,28 N de NaCl. (Woolrich, 1965)
○ Fracción de agua congelada para tejido bovino con 75% de agua en base seca. (Riedel, 1957).

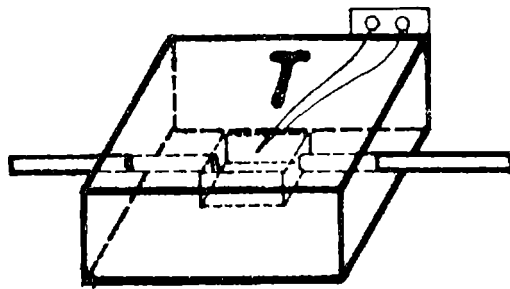
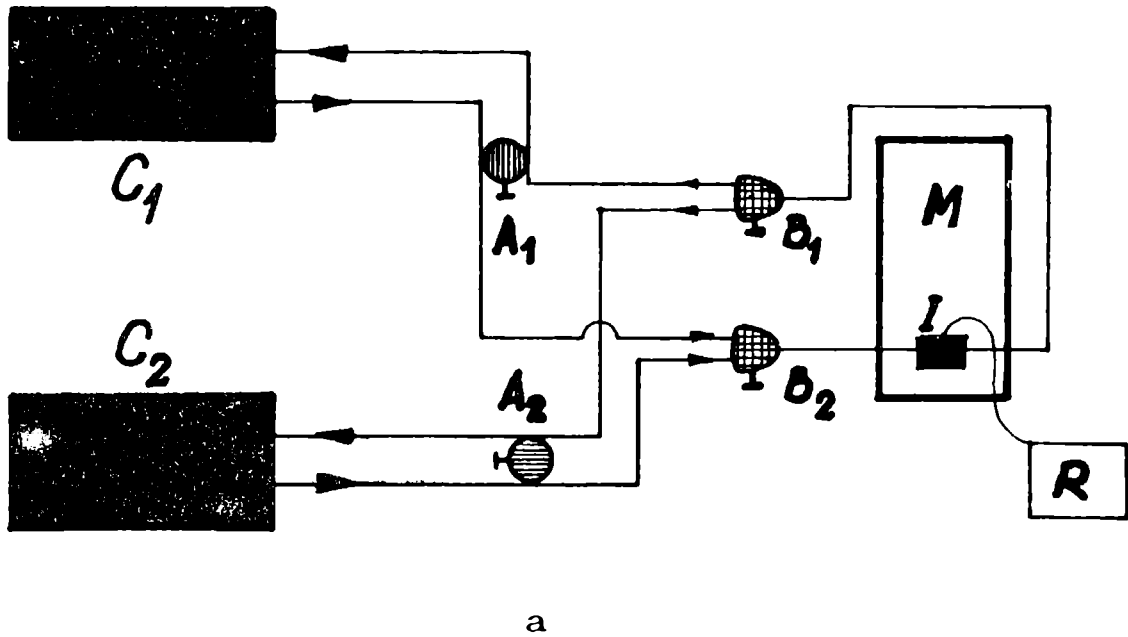


Figura 10 a) Esquema del sistema experimental utilizado, b) Detalle del intercambiador por tamuestras (I). A_1 , A_2 : llave de 2 vías; B_1 y B_2 : llave de 3 vías; C_1 y C_2 : criostatos; M: microscopio; I: celda portamuestras; R: registrador; T: termocupla.

te correspondiente al criostato que no se hallaba conectado al intercambiador, con el objeto de impedir que el líquido permaneciera estanco y aumentara su temperatura. Una gota de solución era colocada sobre el intercambiador, esparcida con ayuda de un cubre objetos y su historia térmica seguida por una termocupla de cobre-constantán conectada a un registrador (Tohsin Electron - Rikadenki Group). La evolución de los cristales era seguida a través del análisis de las micrografías correspondientes a experiencias realizadas a temperatura constante y bajo oscilaciones térmicas. La amplitud de dichas oscilaciones, tanto ascendentes como descendentes, variaba entre 5 y 10°C. Las temperaturas ensayadas fueron: -5, -6.5, -8.5, -13, -14.5 y -16.5°C.

Medición de cristales

Las micrografías fueron analizadas con un procesador de imágenes semiautomático, Zeiss Morphomat 30, cuyo principio de trabajo es la medición de coordenadas a través de la cuantificación del tiempo de propagación de ondas magnéticamente inducidas. Por medio de un adecuado programa interno del equipo se obtuvieron los siguientes datos: diámetros máximos ($D_{\text{máx}}$), diámetros mínimos (D_{min}) y diámetros equivalentes (D_{eq}). El último corresponde al diámetro del círculo que tiene la misma área que la del cristal medido. También se obtuvieron los histogramas, diámetros medios y sus correspondientes desviaciones standard, analizando un promedio de 90 cristales por micrografía. Cada cristal fue individualizado con el propósito de correlacionar el número de lados, con las mediciones de tamaño correspondientes.

Definición de diámetros medios

Para determinar el diámetro medio cristalino que mejor representara el modelo cinético propuesto, se emplearon las siguientes expresiones:

a- Diámetro medio en función de frecuencias numéricas

$$\bar{D}_1 = \frac{N}{\sum f_i D_i} \quad (5)$$

donde f_i es la fracción numérica relativa, definida como:

$$f_i = \frac{N_i}{N} \quad (6)$$

N_i es el número de cristales con diámetro D_i y N es el número total de cristales.

b- Diámetro medio superficial

$$\bar{D}_2 = \frac{N}{\sum w_i D_i} \quad (7)$$

donde w_i es la fracción superficial, definida como:

$$w_i = \frac{N_i D_i^2}{\sum N_i D_i^2} \quad (8)$$

Reemplazando la Ec. (8) en la (7) resulta:

$$\bar{D}_2 = \frac{N \sum N_i D_i^3}{\sum N_i D_i^2} \quad (9)$$

c- Diámetro medio basado en el área media por unidad de volumen

(\bar{a}_v)

siendo:

$$\bar{a}_v = \frac{N}{\sum f_i a_{vi}} \quad (10)$$

donde a_{vi} es el área por unidad de volumen de los cristales con diámetro D_i . Considerando que $\bar{a}_v = \frac{e}{\bar{D}_3}$ y $a_{vi} = \frac{e}{D_i}$, siendo e

una constante que depende de la forma de los cristales, resulta:

$$\bar{D}_3 = \left[\sum \frac{f_i}{D_i} \right]^{-1} \quad (11)$$

d- Diámetro medio cuadrático

$$\bar{D}_4 = \left[\sum_{i=1}^N f_i D_i^2 \right]^{1/2} \quad (12)$$

e- Diámetro medio logarítmico

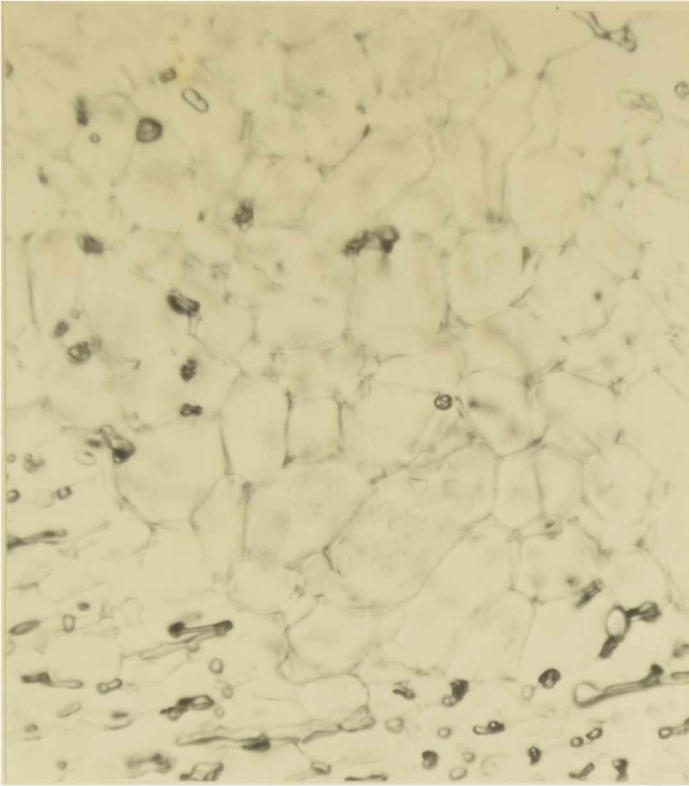
$$\bar{D}_5 = \exp \left[\sum_{i=1}^N f_i \ln D_i \right] \quad (13)$$

2.2 Análisis y discusión de resultados

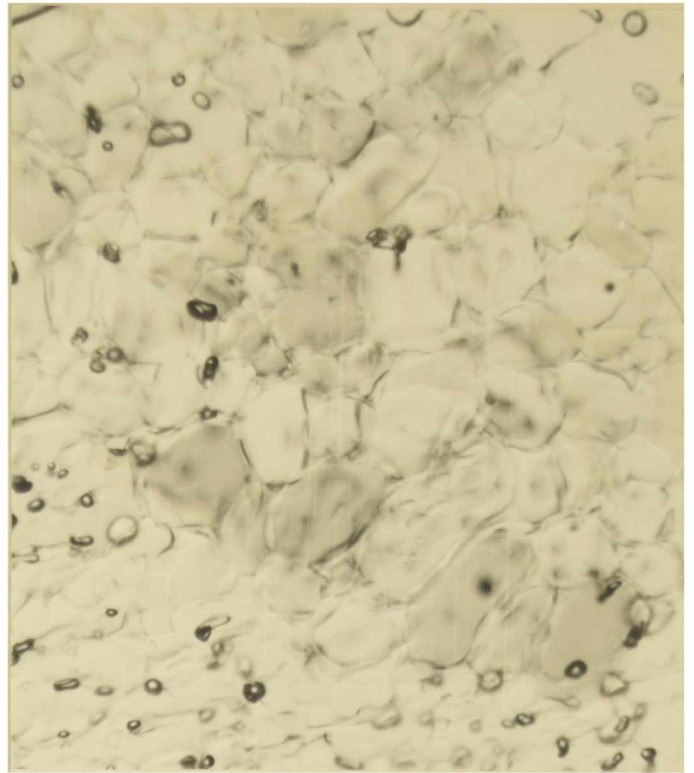
2.2.1 Distribución cristalina

El crecimiento de grano en hielo policristalino y el efecto de oscilaciones térmicas en el tamaño del cristal, fue analizado mediante micrografías como las que se muestran en la Fig.11 que corresponden a una experiencia que ha sido tomada como ejemplo. La historia térmica de la misma se encuentra representada en la Fig. 12, donde están indicados los tiempos en que fueron tomadas las micrografías.

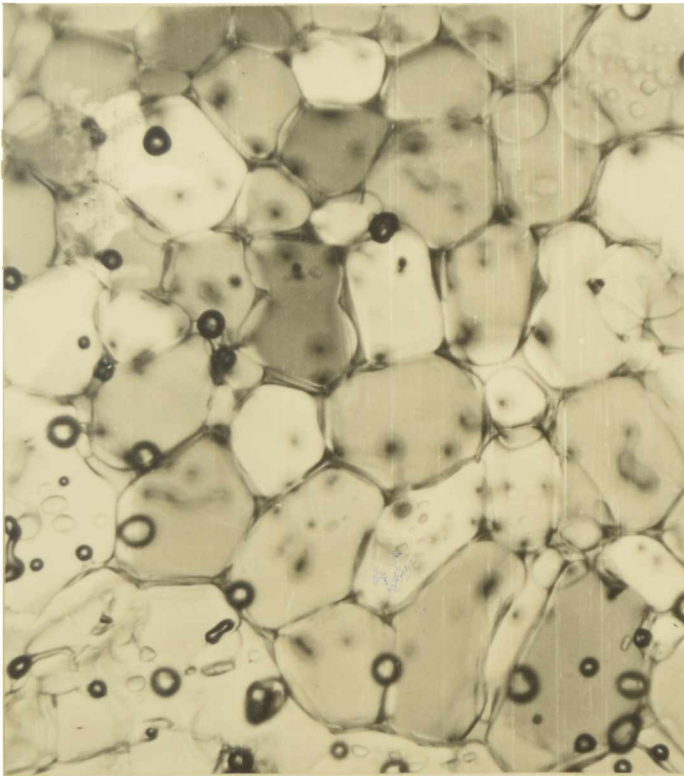
En lo referente a las distribuciones cristalinas, Feltham (1957) empleó un ajuste normal logarítmico, tanto para sus datos como para los de Beck (1954), quien previamente había propuesto una distribución normal e invariante en su forma con el tiempo. Himmelblau (1970) señaló que las distribuciones que involucran tamaño de partículas suelen ser normal logarítmicas, pues las medidas son siempre positivas y se aproximan a cero. Basándose en estas afirmaciones y con el propósito de determinar si las distribuciones cristalinas respondían a una distribución normal o normal logarítmica, se aplicó el ensayo estadístico Chi-cuadrado (χ^2) de bondad de ajuste (Himmelblau, 1970). Los histogramas ensayados correspondían a las distintas expresiones de tamaño: D_{max} , D_{min} y D_{eq} y sus respectivos logaritmos naturales, con el objeto de determinar, además, cuál de los tres parámetros



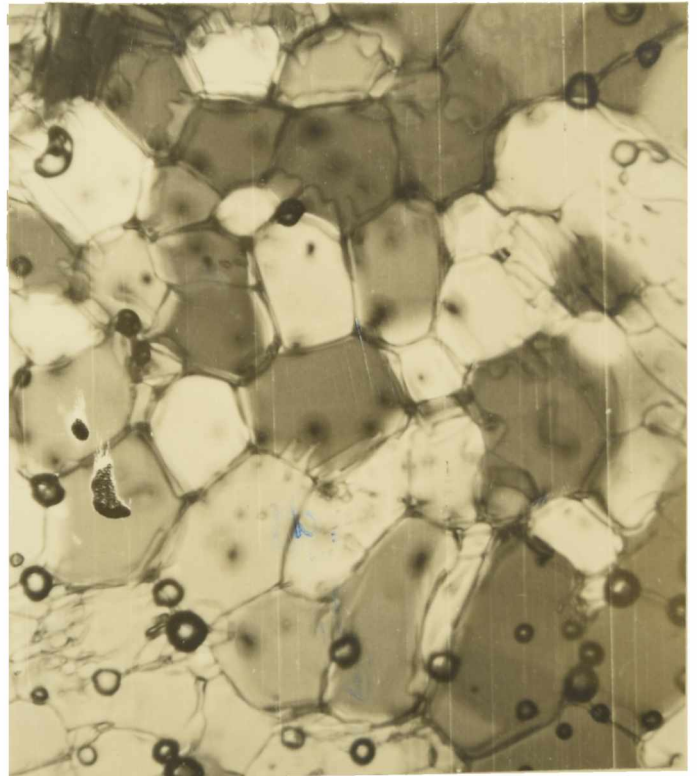
a



b



c



d

100 μm

Figura 11: Cristales de hielo formados a partir de solución 0,28 N de NaCl con las siguientes historias térmicas:

a) 175 minutos a -13°C

b) 175 minutos a -13°C , 2 minutos a -5°C

c) 175 minutos a -13°C , 80 minutos a -5°C

d) 175 minutos a -13°C , 80 minutos a -5°C , 1 minuto a -13°C

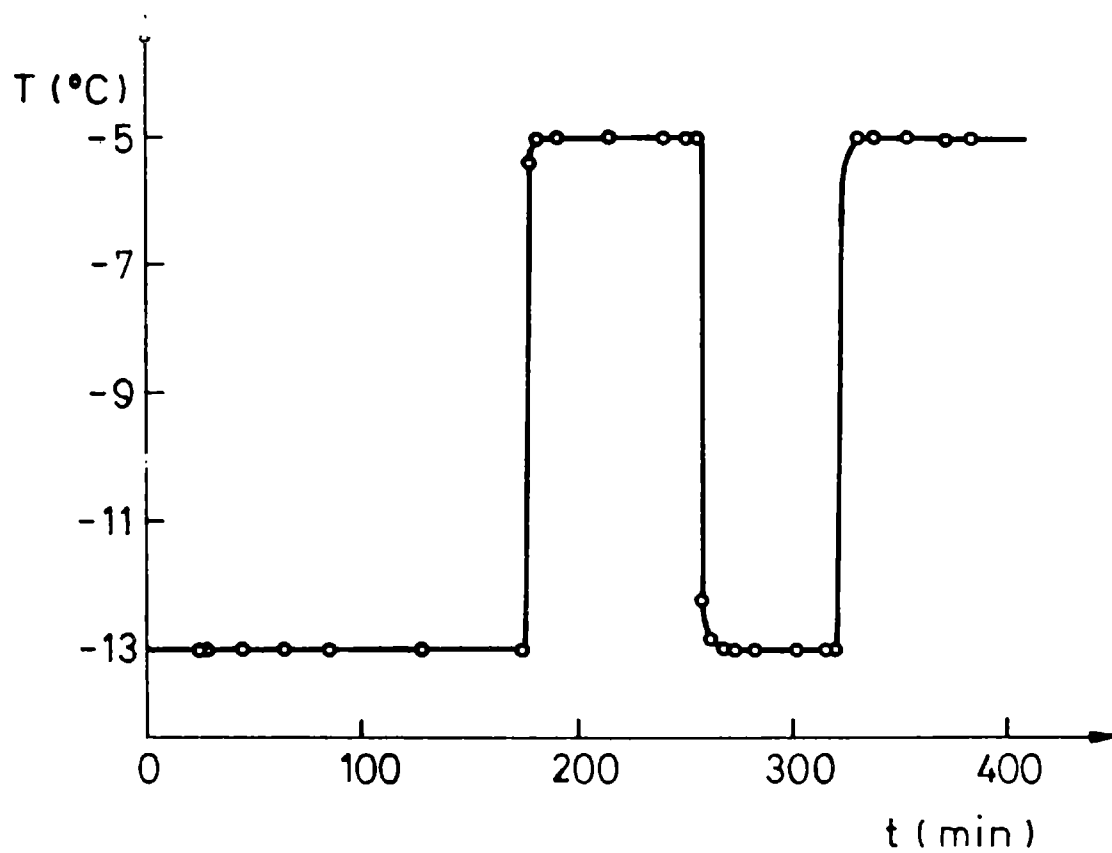


Figura 12: Historia térmica de una experiencia tipo. Los puntos indican las condiciones tiempo-temperatura de las micrografía analizadas.

representaba más satisfactoriamente la distribución teórica.

El estadístico χ^2 fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^s \frac{(m_i - m_i^*)^2}{m_i^*} \quad (14)$$

donde las m_i corresponden a las frecuencias absolutas observadas de la variable D_i , las m_i^* a las frecuencias teóricas de la distribución normal (calculadas en base al total obtenido al sumar las frecuencias observadas) y s es el número de intervalos del histograma.

Los cálculos de las frecuencias teóricas se realizaron por medio de un programa de computadora empleando las siguientes funciones:

la distribución normal $P(x)$ definida como:

$$P(x) = \int_{-\infty}^x Z(x) dx \quad (15)$$

con

$$Z(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-x^2/2} \quad (16)$$

fue calculada por la siguiente ecuación (Zelen y Severo, 1972):

$$P(x) = 1 - Z(x) (a_1 y + a_2 y^2 + a_3 y^3) + \epsilon(x) \quad (17)$$

donde

$$y = \frac{1}{1 + p_1 x} \quad (18)$$

siendo: $p_1 = 0,33267$

$a_1 = 0,4361836$

$a_2 = -0,1201676$

$a_3 = 0,9372980$

con error $|\epsilon(x)| \leq 1 \times 10^{-5}$

La bondad de ajuste fue determinada a través del valor del estadístico χ^2 obtenido de la Ec. (14) y su comparación con el teórico hallado en la tablas de χ^2 para un nivel de significación de 0,05 con los grados de libertad correspondientes a cada distribución.

La hipótesis nula establecía que la distribución de frecuencias relativas experimentales, coincidía con la distribución normal. Esta fue rechazada cuando el valor calculado de χ^2 excedía el teórico.

De los resultados obtenidos, la distribución de Deq fue la que mejor ajustaba a la distribución normal ($P > 0.05$). Por este motivo, se utilizó en los cálculos subsiguientes esta distribución como representativa de la correspondiente a los tamaños cristalinicos del sistema bajo estudio. La Fig. 13 muestra histogramas de distintas distribuciones.

2.2.2 Crecimiento de grano

Las Fig. 11, b y c junto con los histogramas de las Figs. 14b y c y las distribuciones de frecuencias acumuladas de fracción superficial (w_i) de la Fig. 15 correspondientes a condiciones isotérmicas, permiten visualizar el fenómeno de recristalización. Como puede observarse, a medida que transcurre el tiempo se produce el aumento de los cristales mayores a expensas de los menores.

Comúnmente, se acepta que la fuerza impulsora del proceso, es la diferencia de energía entre el sistema con cristales pequeños y con cristales de mayor tamaño, resultando en una disminución de área interfacial y energía superficial totales.

Tanto los histogramas como las distribuciones acumuladas, permiten observar la disminución de las frecuencias relativas (f_i) y la fracción superficial (w_i) de los cristales de menor tamaño y un corrimiento de la frecuencia máxima hacia zonas de diámetros mayores. Es de destacar que, a pesar de este corrimiento

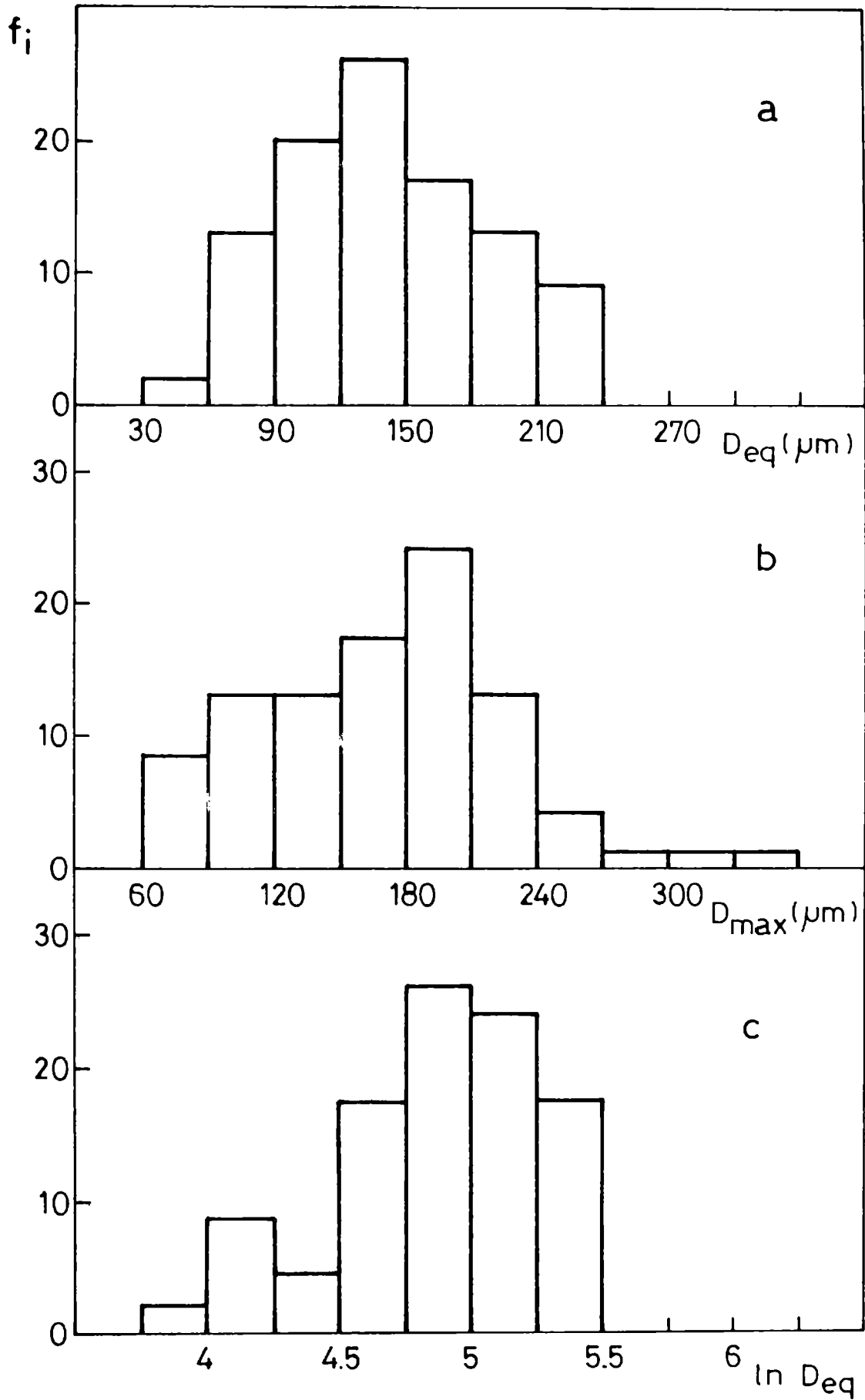


Figura 13: Distintas distribuciones cristalinas correspondientes a una muestra que permaneció 65 minutos a $-5^{\circ}C$, en términos de a) D_{eq} ; b) D_{max} y c) $\ln D_{eq}$.

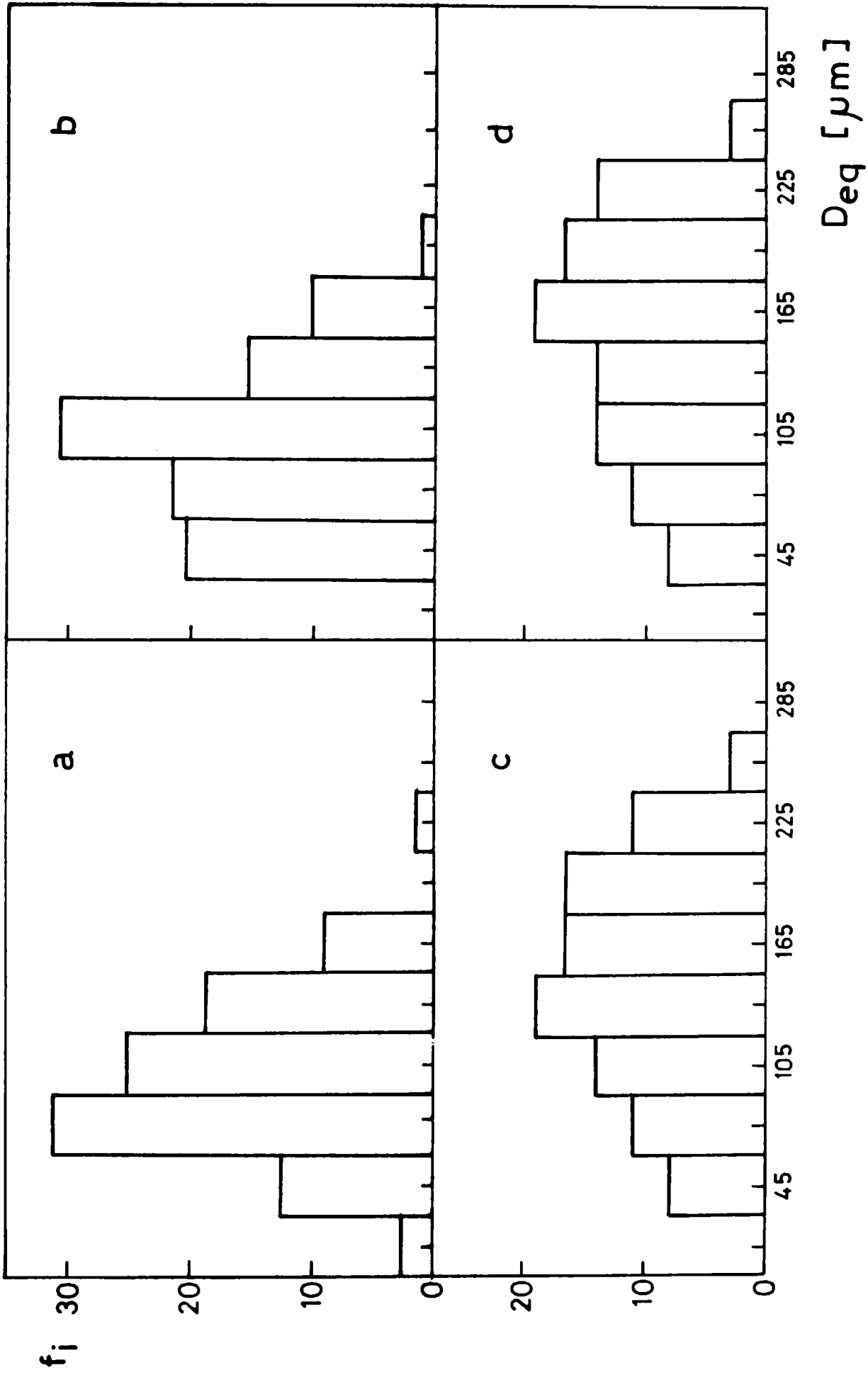


Figura 14: Histogramas de diámetros equivalentes (D_{eq}), correspondientes a las micrografías de la Fig. 11a, b, c y d respectivamente. f_i : frecuencia relativa.

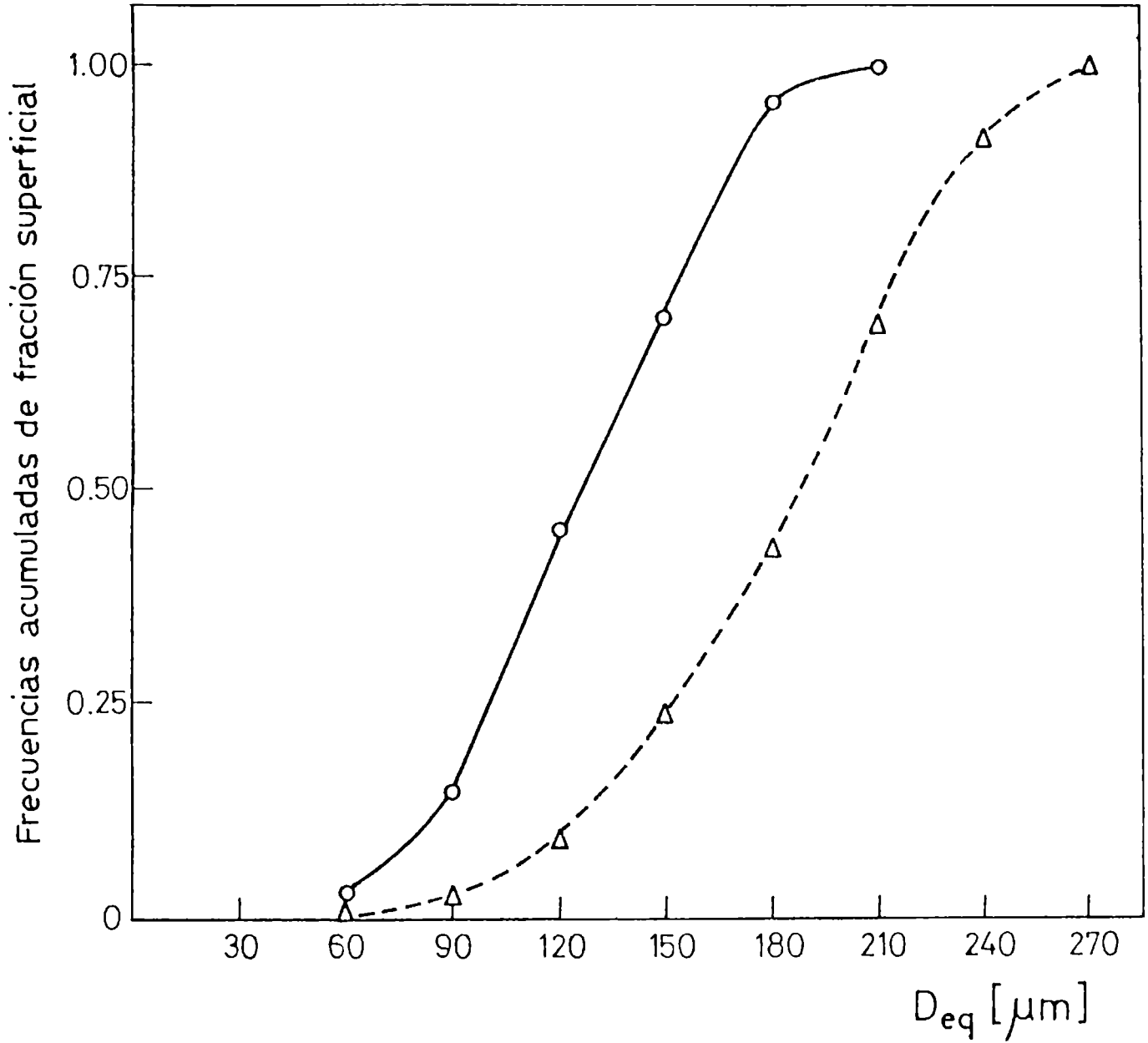


Figura 15: Curvas de distribución de frecuencias acumuladas de fracción superficial (W_i).

— corresponde a la Fig. 11b

--- corresponde a la Fig. 11c

del diámetro medio y un achatamiento de los histogramas a mayores tiempos, la distribución cristalina sigue siendo normal (prueba de bondad de ajuste χ^2 , sección anterior). Se observó, también, la disminución del número total de cristales con el transcurso del tiempo, debido a la desaparición de los cristales de menor tamaño.

Un arreglo cristalino ideal, es decir, el que presente la mayor estabilidad, estaría constituido por cristales de seis la dos planos, cuyos ángulos de intersección serían de 120° (Burke y Turnbull, 1952). En la realidad, se presentan sistemas energéticamente más inestables, con cristales de menos y más de seis lados, siendo éstos curvos, como se observa en la Fig. 11. Esto motivó el estudio simultáneo de las modificaciones observadas en función de la forma de los cristales.

Las Figs. 16 a y b, correspondientes a una experiencia llevada a cabo a temperatura constante, ejemplifica la clasificación de los cristales realizada en función de número de lados. Este estudio, extendido a toda la población, junto con el realizado a través del seguimiento de los cristales individuales, convenientemente identificados, demostraron que los cristales que desaparecían o disminuían de tamaño eran los de 3 y 4 lados, mientras que aumentaba la cantidad relativa de cristales de número de la dos mayores.

Los cristales pequeños, de 3 ó 4 lados presentan superficies cóncavas; su disminución de tamaño puede interpretarse tomando en cuenta que las moléculas del lado cóncavo están menos rodeadas que sus vecinas del otro lado de la interfase y por lo tanto siendo energéticamente más inestables, tienden a escapar. Como consequencia, el límite de grano se desplaza hacia su centro de curvatura y disminuye el tamaño del cristal (Fig. 17).

La aparente relación entre número de lados y tamaño cristalino, se analizó para cada micrografía, reuniéndose la información en la Fig. 18 , donde se han representado para cada número de la dos (n), rangos de Deq dados por los valores máximos y mínimos.

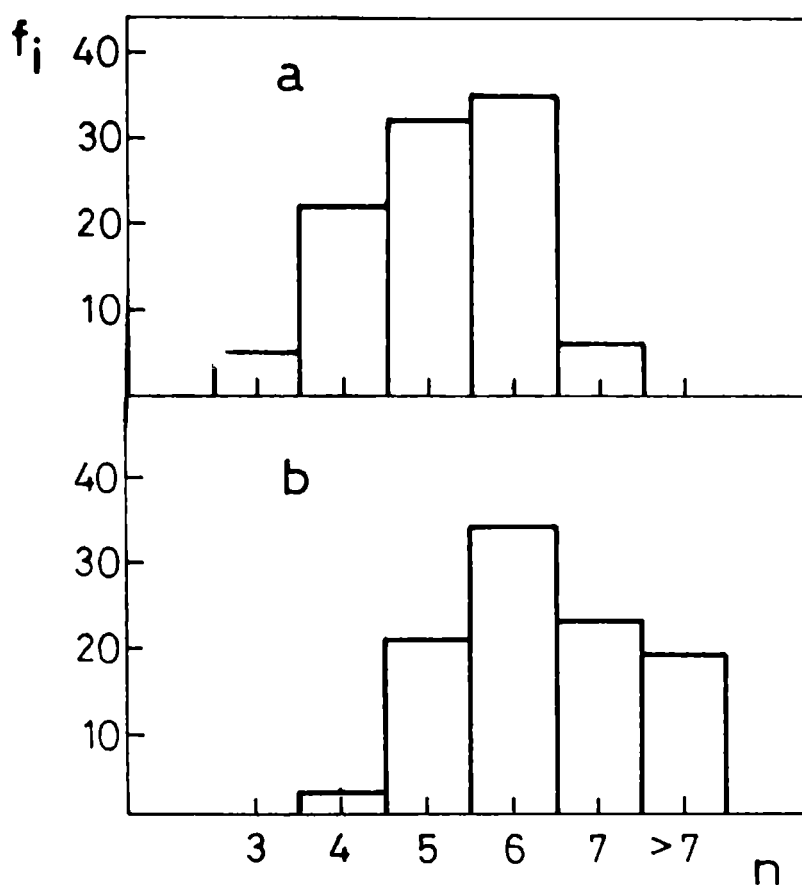


Figura 16: Histogramas de número de la dos (n) para muestras mantenidas a -5°C durante a) 6 minutos, b) 80 minutos.

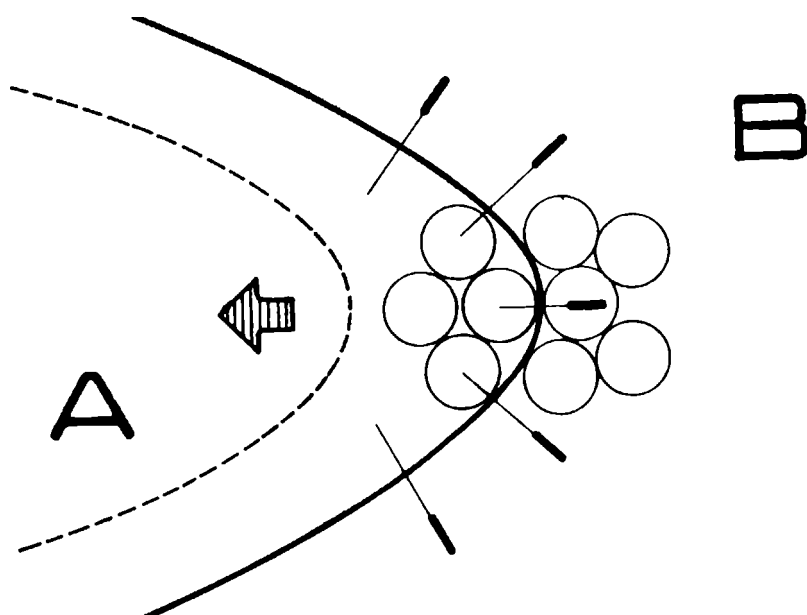


Figura 17: Representación esquemática del des plazamiento del límite de grano. A y B cris- tales adyacentes.

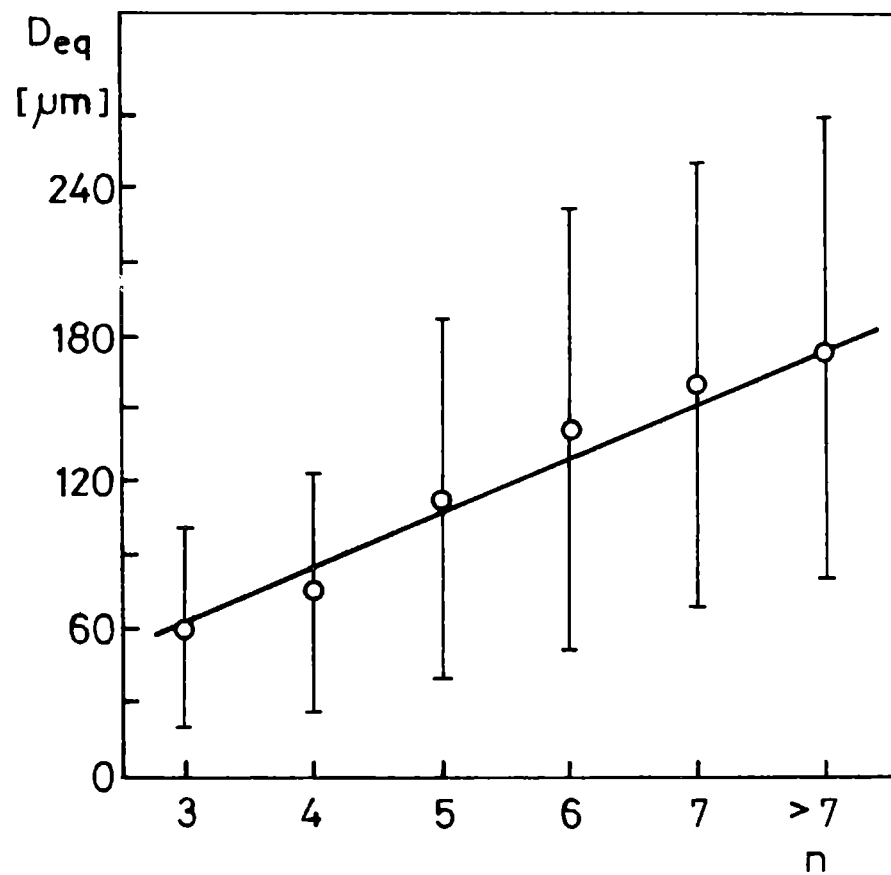


Figura 18: Relación entre el diámetro equivalente (D_{eq}) y el número de lados del cristal (n). Las barras verticales indican el rango de variación entre el valor máximo y mínimo.

○ diámetro equivalente medio.

Puede observarse que los cristales con mayor número de lados, involucran Deq mayores. Además, al considerar el valor medio de los rangos de Deq en función de n , se encontró una relación lineal entre ambos, similar a la hallada por Feltham (1957) en sistemas metalúrgicos.

En la Fig. 16a y b, puede observarse que la frecuencia máxima corresponde a $n = 6$. Coincidentemente, Burke y Turnbull (1952) y Feltham (1957), señalaron que, en una distribución plana, 6 es el número de lados más probable.

2.2.3 Cinética de recristalización

Cada cristal lleva asociada cierta energía interfacial y debido a la existencia de límites curvos, se genera una diferencia de energía libre, para dos granos adyacentes, que puede definirse como (Kingery, 1960a):

$$\Delta G = \sigma V \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad (19)$$

donde ΔG es el cambio en energía libre a través de la interfase curva, σ es la energía interfacial, V es el volumen molar y r_1 y r_2 son los radios de curvatura. Esta energía libre a ambos lados del límite de grano, es la fuerza impulsora que desplaza el límite hacia su centro de curvatura, disminuyéndola. La velocidad a la cual se desplaza la interfase, resulta proporcional a su curvatura y a la movilidad con que los átomos puedan transpasar este límite (Fig. 17).

Aplicando la teoría de velocidades absolutas, la frecuencia de saltos atómicos a través de la interfase en sentido directo (f_{AB}) viene dada por:

$$f_{AB} = \frac{RT}{N_A h} \exp \left(- \frac{\Delta G^\#}{RT} \right) \quad (20)$$

y la frecuencia en sentido opuesto (f_{BA}) por:

$$f_{BA} = \frac{RT}{N_A h} \exp \left(- \frac{\Delta G^\# + \Delta G}{RT} \right) \quad (21)$$

donde N_A es el número de Avogadro, h la constante de Plank, R la constante de los gases, T temperatura absoluta, $\Delta G^\#$ energía libre de activación y ΔG energía libre entre el estado inicial y final.

El proceso global está entonces dado por:

$$Q = \lambda f_{neta} \quad (22)$$

donde Q es la velocidad neta, λ la distancia de salto y f_{neta} frecuencia neta dada por la diferencia entre la frecuencia directa e inversa. Así:

$$Q = \frac{RT}{N_A h} (\lambda) \exp \left(- \frac{\Delta G^\#}{RT} \right) \left(1 - \exp \frac{\Delta G}{RT} \right) \quad (23)$$

y como $\left(1 - \exp \frac{\Delta G}{RT} \right) \approx \frac{\Delta G}{RT}$

conocido ya ΔG por la Ec. (19) y recordando que:

$$\Delta G^\# = \Delta H^\# - T \Delta S^\# \quad (24)$$

con $\Delta H^\#$ entalpía de activación y $\Delta S^\#$ entropía de activación, resulta:

$$Q = \frac{RT}{N_A h} (\lambda) \left[\frac{\sigma V}{RT} \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \right] \exp \frac{\Delta S^\#}{R} \exp \left(- \frac{\Delta H^\#}{RT} \right) \quad (25)$$

y agrupando las constantes en Q_c se obtiene:

$$Q = Q_c \exp \left(- \frac{\Delta H^\#}{RT} \right) \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad (26)$$

Esta velocidad de desplazamiento de interfase a nivel atómi

co se encuentra directamente relacionada con la velocidad de re cristalización.

El término de entalpía de activación para el desplazamiento de la interfase ($\Delta H^\#$), suele reemplazarse por el de energía de activación (E_a).

La Ec. (26) muestra la dependencia exponencial de la velocidad de desplazamiento de interfase con la temperatura.

Para postular la cinética de recristalización, hay que contemporar el crecimiento de los cristales mayores y la disminución de los menores. Esto puede describirse en términos de un valor de tamaño crítico, para el cual la ecuación de velocidad se anula, (Hillert, 1965), siendo:

$$\frac{dD}{dt} = \alpha M \sigma \left(\frac{1}{D_{cr}} - \frac{1}{D} \right) \quad (27)$$

con M: movilidad de la interfase, σ : energía superficial, α : constante adimensional relacionada con la geometría del sistema, D: diámetro cristalino, D_{cr} : diámetro crítico correspondiente al cristal que no presenta tendencia ni a aumentar ni a disminuir de tamaño.

Con el fin de extender esta definición a toda la distribución cristalina, se puede realizar una serie de cambios de variables, enunciados a continuación.

$$\text{Introduciendo como tamaño relativo } u = \frac{D}{D_{cr}} \quad (28)$$

y operando en la Ec. (27) resulta:

$$\frac{dD^2}{dt} = 2 \alpha M \sigma (u - 1) \quad (29)$$

Luego, para expresarla en función de diámetro relativo:

$$\frac{du^2}{dt} = \frac{1}{D_{cr}^2} \left[\frac{dD^2}{dt} - \left(\frac{D}{D_{cr}} \right)^2 \frac{dD_{cr}^2}{dt} \right] \quad (30)$$

$$\frac{du^2}{dt} = \frac{1}{D_{cr}^2} \left[2 \alpha M \sigma (u - 1) - u^2 \frac{d D_{cr}^2}{dt} \right] \quad (31)$$

Dividiendo por $\frac{d D_{cr}^2}{dt}$:

$$\frac{du^2}{dD_{cr}^2} = \frac{1}{D_{cr}^2} \left[2 \alpha M \sigma \frac{dt}{dD_{cr}^2} (u - 1) - u^2 \right] \quad (32)$$

Al introducir las variables:

$$\Omega = \ln D_{cr}^2 \quad (33)$$

$$\phi = 2 \alpha M \sigma \cdot \frac{dt}{dD_{cr}^2} \quad (34)$$

La expresión queda de una forma muy simple:

$$\frac{du^2}{d\Omega} = \phi (u - 1) - u^2 \quad (35)$$

La variable Ω representa el tiempo, pues D_{cr} aumenta monótonamente con éste. Coincidiendo con otros autores, como ocurre en el proceso de coalescencia, la variable ϕ , al acercarse al estado estacionario, tiende a un valor constante, independientemente de la distribución de tamaños iniciales. Para hallar este valor asintótico, Hillert se valió de la representación de $du^2/d\Omega$, en función del diámetro relativo (u), para tres valores constantes de ϕ , Fig. 19. Valores de ϕ inferiores a ϕ_0 no podrían mantenerse, ya que todos los cristales, al cabo de cierto tiempo, desaparecerían. Para los $\phi > \phi_0$, habría cristales que crecerían indefinidamente, los mayores de u_1 , mientras que otros desaparecerían. Por lo tanto, para el estado estacionario sólo puede darse ϕ_0 .

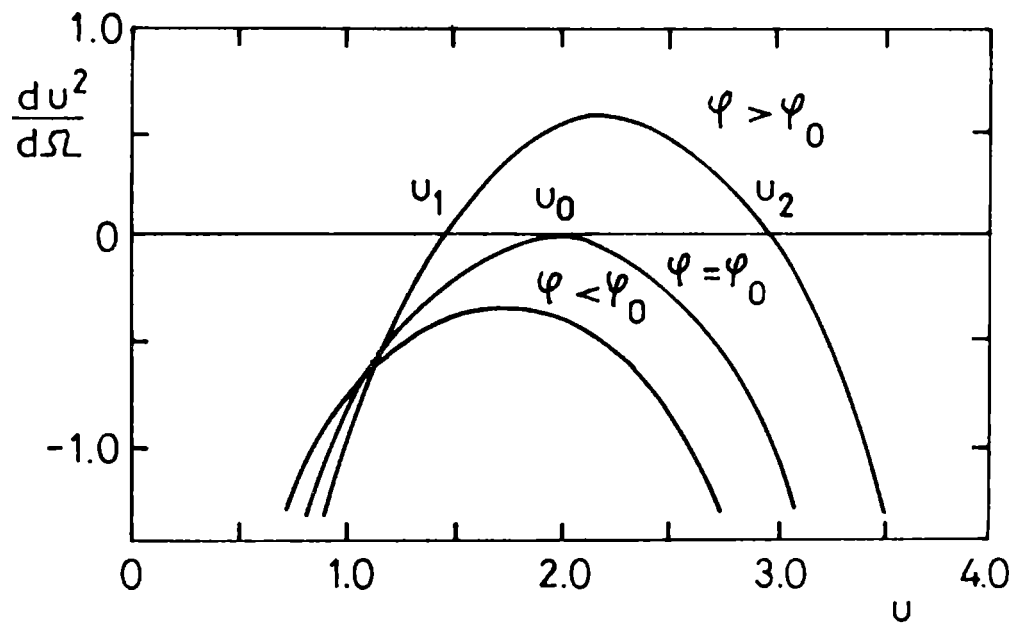


Figura 19: Relación de la velocidad de recrystalización ($du^2/d\tau$) con el tamaño cristalino relativo ($u = D/D_{cr}$). (Hillert, 1965).

Para hallar el valor de $\phi = \phi_0$ que hace coincidentes las raíces de la Ec. (35), ésta se iguala a 0 y resulta:

$$u = \frac{1}{2} \phi \pm \sqrt{\frac{1}{4} \phi^2 - \phi} \quad (36)$$

para que se cumpla que:

$$u_1 = u_2 = u_0 \quad (37)$$

debe ser: $\phi = \phi_0 = 4$ y por lo tanto: $u_0 = 2$

Reemplazando este valor en la Ec. (34), se obtiene la velocidad de recristalización para el estado estacionario:

$$\frac{dD_{cr}^2}{dt} = \frac{1}{2} \alpha M \sigma \quad (38)$$

A partir de la curva para $\phi = \phi_0$ de la Fig. 19, se advierte que diámetros relativos mayores que u_0 crecerían indefinidamente, lo que es físicamente imposible.

Este argumento le permitió a Hillert arribar a la conclusión que posteriormente se conocería como "criterio de Hillert" que dice: una vez establecido el estado estacionario, no habrá cristales cuyo diámetro sea mayor que el doble del diámetro crítico.

Además, queda así definido el tipo de recristalización, llamándose recristalización normal, a aquella que cumple el criterio antes mencionado y recristalización anormal, cuando existen ciertos cristales cuyos tamaños muy grandes, se apartan del resto de la distribución y crecen en forma preferencial (Hillert, 1965).

Las distribuciones de Deq obtenida en el presente estudio (Fig. 14), permiten asegurar que se está en presencia de recristalización normal, pues se verifica que ningún diámetro individual es mayor que el doble del diámetro medio en cada distribución.

El diámetro crítico puede vincularse al diámetro medio de la

distribución (\bar{D}) a través de las siguientes consideraciones:

a) según los resultados de von Neumann y Mullins citados por Hillert (1965), en un sistema de dos dimensiones, la velocidad de desplazamiento de la interfase en torno a cualquier cristal puede definirse como:

$$\frac{dD}{dt} = \frac{M\sigma}{D} \left(\frac{n}{6} - 1 \right) \quad (39)$$

siendo n el número de lados del cristal, donde se ha tenido en cuenta la estabilidad energética de los cristales de 6 lados de un arreglo bidimensional.

Al comparar Ec. (39) con Ec. (27) y operando se obtiene:

$$\alpha \left(\frac{D}{D_{cr}} - 1 \right) = \frac{n}{6} - 1 \quad (40)$$

despejando n de la Ec. (40) resulta:

$$n = 6 \left[\alpha \left(\frac{D}{D_{cr}} - 1 \right) + 1 \right] \quad (41)$$

y teniendo en cuenta que el número promedio de lados (\bar{n}) en el sistema se calcula como:

$$\bar{n} = \frac{\sum_{i=1}^N n_i}{N} \quad (42)$$

y el diámetro promedio como:

$$\bar{D} = \frac{\sum_{i=1}^N D_i}{N} \quad (43)$$

con N : número total de cristales, al aplicar sumatoria sobre to dos los cristales a la Ec. (41), se llega a:

$$\sum_{i=1}^N n_i = 6 \alpha \sum_{i=1}^N \left(\frac{D_i}{D_{cr}} - 1 \right) + 6 N \quad (44)$$

dividiendo ambos miembros de la Ec. (44) por N y aplicando las definiciones de \bar{n} y \bar{D} resulta:

$$\bar{n} = 6 + 6 \alpha \left(\frac{\bar{D}}{D_{cr}} - 1 \right) \quad (45)$$

Aceptando la regla topológica que establece que el valor promedio del número de lados (\bar{n}), en una distribución plana, es igual a 6, confirmado por la Fig. 16, se puede demostrar que, para $\alpha = 1$:

$$D_{cr} = \bar{D} \quad (46)$$

b) La otra forma de llegar a una conclusión similar, es tener en cuenta que, durante el proceso de recristalización, no hay cambios en la masa total del sistema. Por lo tanto, si dicha invariancia se expresa en términos de superficie, debe cumplirse que:

$$\sum_{i=1}^N D_i \frac{dD_i}{dt} = 0 \quad (47)$$

Multiplicando la Ec. (27) por D y realizando la suma sobre los N cristales, se tiene:

$$\sum_{i=1}^N D_i \frac{dD_i}{dt} = \alpha M \sigma \sum_{i=1}^N \left(\frac{D_i}{D_{cr}} - 1 \right) \quad (48)$$

teniendo en cuenta Ec. (47) y Ec. (48) resulta:

$$\sum_{i=1}^N \frac{D_i}{D_{cr}} = N \quad (49)$$

Recordando la definición de valor medio (\bar{D}) (Ec. (43)), la Ec. (49) conduce también a que $D_{cr} = \bar{D}$.

Estas dos deducciones confirman la estrecha relación hallada experimentalmente, entre número de lados y diámetros cristalinicos, al arribar a la misma conclusión. Además, conducen a una simplificación del tratamiento de datos, permitiendo utilizar el \bar{D} como parámetro característico de la distribución cristalina.

Reemplazando este valor en la Ec. (38) se puede expresar la cinética para crecimiento de grano como:

$$\frac{d\bar{D}^{-2}}{dt} = \frac{1}{2} \alpha M \sigma \quad (50)$$

o en forma equivalente:

$$\frac{d\bar{D}}{dt} = \frac{\alpha M \sigma}{\bar{D}} \quad (51)$$

donde se observa que la velocidad de recristalización puede evaluarse en términos de variación de \bar{D} , siendo éste inversamente proporcional a la curvatura media del sistema.

Esta expresión integrada y considerando que a $t = 0$ $\bar{D} = \bar{D}_0$, conduce a:

$$\bar{D}^{-2} - \bar{D}_0^{-2} = \frac{1}{2} \alpha M \sigma t \quad (52)$$

y agrupando las constantes en k resulta:

$$\bar{D}^{-2} - \bar{D}_0^{-2} = k t \quad (53)$$

El efecto de la temperatura en el crecimiento de grano está presente en la constante cinética (k), que puede expresarse a través de una dependencia tipo Arrhenius como:

$$k = k_0 e^{-Ea/RT} \quad (54)$$

Siendo k_0 el factor pre-exponencial, Ea energía de activación, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta.

Distintos diámetros medios, en función de frecuencias numéricas Ec. (5), superficial Ec. (9), área por unidad de volumen Ec. (11), cuadrático Ec. (12) y logarítmico Ec. (13), fueron empleados con el fin de determinar cuál de ellos representaba mejor la cinética propuesta.

Sobre una experiencia realizada a -13°C se analizó el

ajuste de los datos experimentales según $(\bar{D}^2 - \bar{D}_0^2)$ vs. t calculándose, por cuadrados mínimos, las pendientes de las rectas de cada tipo de diámetro y la correspondiente a la recta que incluye todos los valores en forma conjunta y sus respectivos límites de confianza (Tabla V).

Tabla V : Pendientes correspondientes a la cinética de recristalización, calculada a partir de distintos diámetros medios por cuadrados mínimos.

Tipo de diámetro medio utilizado	$b \pm t S (b)$
\bar{D}_1	26,38 \pm 3,57
\bar{D}_2	36,94 \pm 5,50
\bar{D}_3	17,49 \pm 4,34
\bar{D}_4	29,37 \pm 2,89
\bar{D}_5	26,04 \pm 5,74
General	27,24 \pm 7,27

b : pendiente. $S(b)$: desviación standard para la pendiente, t : estadístico "t" student para 95% de probabilidad y 4 grados de libertad, excepto para la recta general que corresponde a 24 grados de libertad.

Al comprobarse que los datos se ajustaban al modelo propuesto, Ec. (53), independientemente de la forma de calcular el diámetro medio y que las diferencias en las pendientes halladas no eran significativas ($P > 0,05$), se seleccionó, por la sencillez de su cálculo, el diámetro medio definido en la Ec. (5) para establecer la cinética.

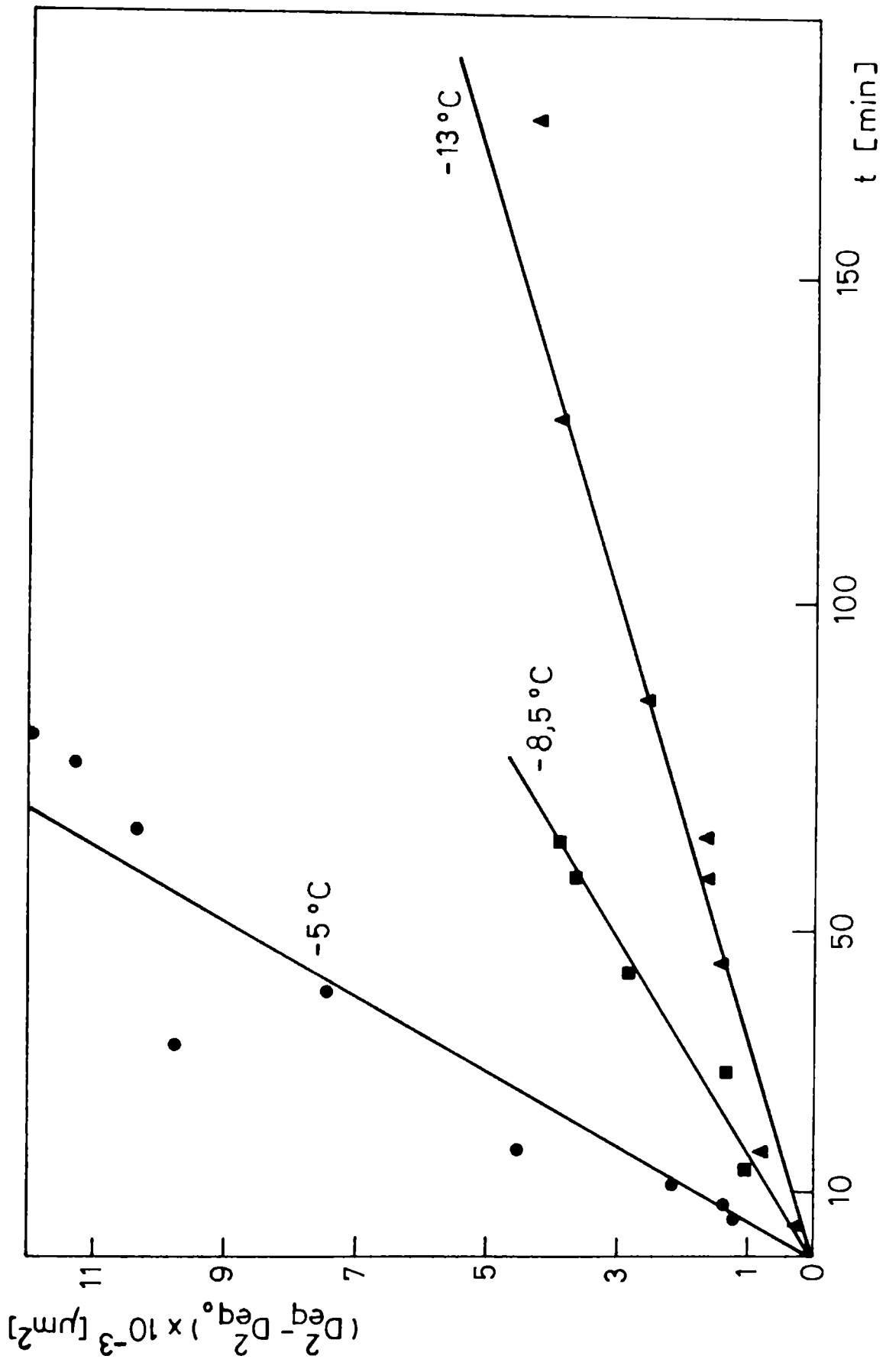


Figura 20: Efecto de la recrystalización en solución modelo sobre el diámetro equivalente a distintas temperaturas. Los D_{eq} presentaron una desviación standard máxima $S_{\bar{D}} = 9,40 \mu m$.

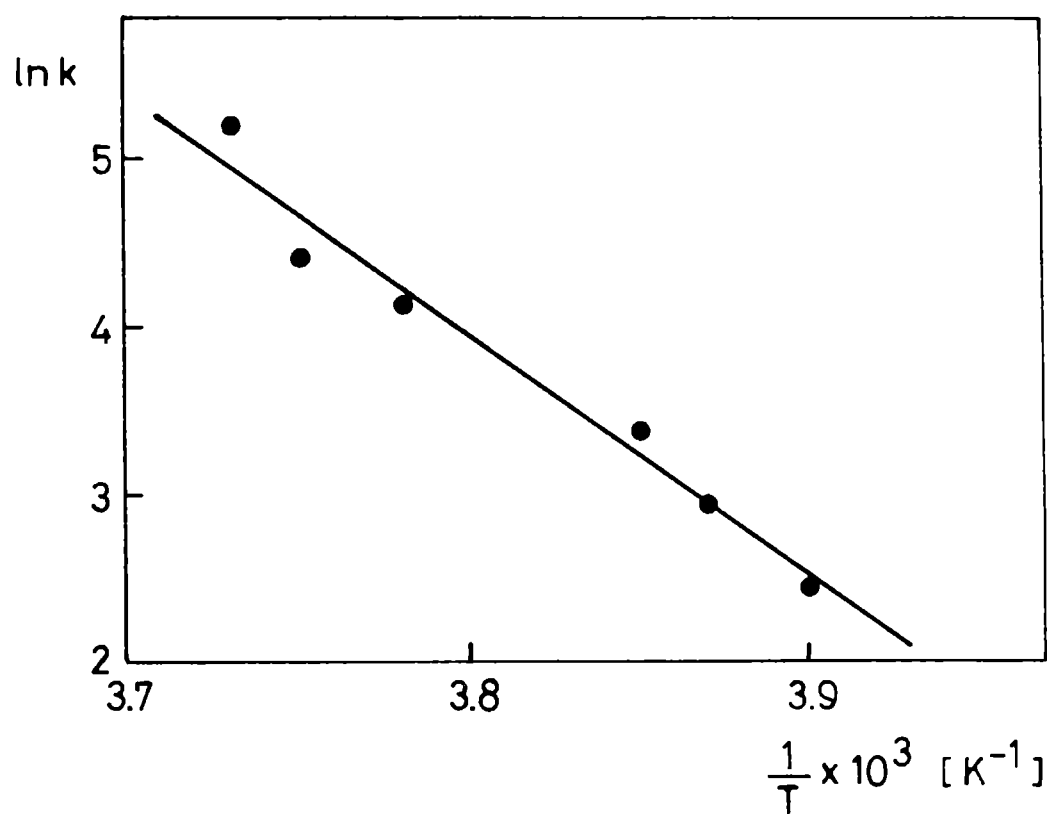


Figura 21: Efecto de la temperatura sobre la constante cinética (k) de recristalización en solución modelo.

La Fig. 20 ejemplifica el ajuste de los datos experimentales, representados por diámetros equivalentes medios calculados según Ec. (5), a la cinética propuesta para distintas temperaturas. La energía de activación del fenómeno de recristalización se determinó a partir de la Ec. (54), representando los logaritmos naturales de las constantes cinéticas vs. la inversa de la temperatura absoluta, a las distintas temperaturas de trabajo (-5; -6,5; -13; -14,5 y -16,5°C). El valor hallado fue $E_a = 11,64 \times 10^4 \pm 1,31 \times 10^4$ Joule/mol (Fig. 21).

Un valor similar de energía de activación ($11,50 \times 10^4$ Joule/mol) fue hallado por Kingery (1960b) al estudiar el sintetizado de partículas esféricas de hielo, entre -2 y -25°C. Este proceso al igual que la recristalización, tiende a disminuir la energía interfacial del sistema y depende fuertemente del tamaño de partícula (Mazur, 1966; Jellinek y Gouda, 1969).

Siendo la recristalización un proceso difusional cabe la comparación también, con estudios de autodifusión de agua (Adamson, 1960; Bevilacqua y Zaritzky, 1982). Sin embargo, existen discrepancias entre los valores informados en literatura (Wang, 1965; Itagaki, 1967; Hobbs, 1974). Una posible explicación para este hecho sería la hallada por Itagaki (1964), quien realizando experiencias de autodifusión de agua tritiada observó un efecto del tiempo en los valores de energía de activación, resultando de $10,11 \times 10^4$ Joule/mol a las 24 horas de experiencia y disminuyendo a $6,56 \times 10^4$ Joule/mol al séptimo día. Al respecto, Drost - Hansen (1967) atribuyó esta variación al efecto del tiempo en la creación de la microestructura cristalina.

En cuanto a la interpretación cinética del crecimiento de grano, algunos investigadores en diversas disciplinas (Burke y Turnbull, 1952; Burke, 1966; Jellinek y Gouda, 1969; Red-Hill, 1972) emplearon cinéticas del tipo:

$$D = K t^m \quad (55)$$

con K y m constantes, considerando despreciable el diámetro inicial D_0 de los cristales.

Sin embargo, este tipo de expresión cinética no se ajusta satisfactoriamente a todos los datos experimentales, ya que se han observado desviaciones de la linealidad en la representación de $\ln D$ vs. $\ln t$ y apartamientos del coeficiente m del valor teórico de 0,5.

Burke (1966), señaló que dichas discrepancias en el exponente m y en la energía de activación del fenómeno, determinadas a partir de la Ec. (55) eran atribuibles a posibles apartamientos de la distribución normal con el tiempo. Al respecto, cabe recordar que en el presente trabajo pudo verificarse que la distribución cristalina permanecía normal durante el tiempo de ensayo.

Por otro lado, ciertos investigadores destacaron la importancia de considerar el valor inicial del diámetro cristalino en la expresión cinética (Beck, 1948; Hobbs y Mason, 1964; Kingery, 1960a). Con relación a esto, pueden analizarse las experiencias de Jellinek y Gouda (1969) en hielo policristalino formado a partir de agua bidestilada y solución de NaCl 0,017 M a partir de las cuales se determinaron energía de activación del fenómeno. Estos valores sensiblemente menores a los hallados en el presente trabajo así como coeficientes m de 0,3 y 0,25 pueden atribuirse al hecho de no haber considerado el D_0 en la cinética utilizada por los autores.

La relevancia del diámetro inicial pudo verificarse en el presente trabajo ya que la aplicación de expresiones como la correspondiente a la Ec. (55) a los datos experimentales obtenidos, ha conducido a imprecisiones tales como valores de m variables en rangos muy amplios y de K dependientes de los niveles de diámetros cristalinos con los cuales se trabaja.

Esto permite concluir que expresiones cinéticas fenomenológicas del tipo de la Ec. (55) no debieran ser aplicadas a sistemas donde los tamaños iniciales de grano no son comprobadamente

despreciables, siendo más correctas expresiones como la de la Ec. (53).

2.2.4 Efecto de oscilaciones térmicas en el tamaño cristalino

Los estudios realizados a temperatura constante, se complementaron con experiencias que involucraban oscilaciones de temperatura, durante los cuales debe tenerse en cuenta que se producen cambios en la fracción de agua congelada (Fig. 9)

Ascensos de temperatura

Como puede observarse en las micrografías de las Figs. 11a y b, donde se produjo un ascenso de temperatura (-13 a -5°C), desaparecieron o por lo menos fundieron parcialmente los cristales más pequeños, aquellos con 3 ó 4 lados, pues son energéticamente más inestables. Esto se ve confirmado por los histogramas correspondientes (Figs. 14a y b) al observar la disminución de las frecuencias relativas de los cristales de menor tamaño y el corrimiento de la frecuencia máxima hacia la zona de diámetros mayores. La disminución de tamaño de los cristales más pequeños durante un ascenso de temperatura, puede explicarse si se tiene en cuenta la relación existente entre energía superficial y curvatura expresada por la ecuación de Kelvin:

$$T_e - T_r = \frac{2V \sigma_{SL} T_e}{L_f r} \quad (56)$$

donde T_e es la temperatura de equilibrio para una superficie plana ($r = \infty$); T_r : temperatura de equilibrio del cristal con radio r ; V : volumen molar del agua; σ_{SL} : tensión interfacial sólido-líquido; L_f : calor latente de fusión.

Así, los cristales de radio de curvatura r tienen una temperatura de equilibrio sólido-líquido distinta de la correspondiente a una superficie plana. Los cristales pequeños, cuyo centro de

curvatura se encuentra del lado sólido de la interfase, tienen un punto de fusión tanto menor cuanto menor sea su radio de curvatura y son los primeros en fundir cuando la temperatura se eleva, como se deduce de la Ec. (56) (Mazur, 1966; Chalmers, 1977).

Descensos de temperatura

Las muestras sometidas a descensos de temperatura, evidenciaban un aumento de la fracción de agua congelada, como se ejemplifica en las Figs. 11c y d que corresponden a experiencias donde la temperatura varió de -5 a -13°C . Este aumento de ω , pudo cuantificarse sobre las micrografía a través del siguiente análisis:

Para una dada temperatura, la superficie (A_i) ocupada por un número de cristales (N_i) con diámetro D_i puede expresarse como:

$$A_i \propto N_i D_i^2 \quad (57)$$

y si se toma en consideración los resultados experimentales que demuestran que, un descenso de temperatura no altera el número total de cristales, pues no se verifica formación de nuevos cristales (nucleación) puede aceptarse que:

$$A_i \propto f_i D_i^2 \quad (58)$$

El área bajo la curva que se obtiene al graficar A_i vs. D_i resulta proporcional a la masa de hielo en equilibrio a esa temperatura. Así, la Fig. 22 representa la masa de hielo correspondiente a las micrografías de las Fig. 11c ($T = -5^{\circ}\text{C}$) y Fig. 11d ($T = -13^{\circ}\text{C}$) y sus correspondientes histogramas (Figs. 14c y d).

La relación de las áreas bajo las curvas a estas dos temperaturas, resultó ser de 1,11, valor cercano a la relación de fracción de agua congelada en equilibrio a -13 y -5°C obtenidas de la Fig. 9 que es de 1,16, confirmando la aplicabilidad del método fotográfico utilizado.

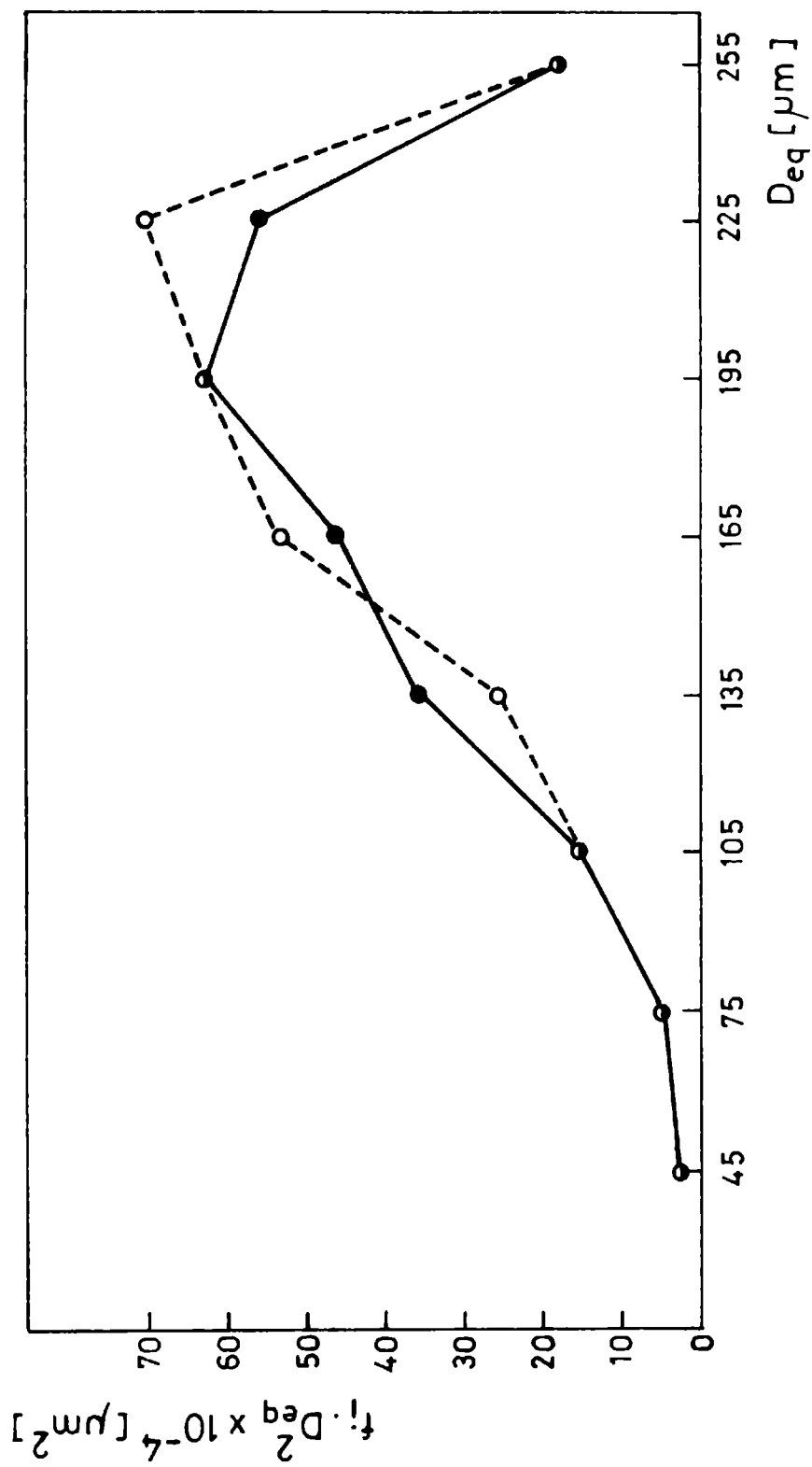


Figura 22: Relación entre el área que ocupan los cristales de hielo y su correspondiente diámetro equivalente durante un descenso de temperatura.
 — corresponde a $-5^{\circ}C$
 --- corresponde a $-13^{\circ}C$

Es de destacar que, durante los descensos de temperatura, la masa de hielo adicional no se distribuyó de manera uniforme, ya que no se originó el mismo incremento de diámetros para todos los cristales. A partir de la Fig. 22 y los histogramas de las Figs. 14c y d, se observa que el hielo se agrega sobre los cristales de mayor tamaño, manteniéndose constante el número total de los mismos.

Un estudio más detallado, realizado sobre cristales individuales, convenientemente identificados pertenecientes a las experiencias anteriormente descritas, permitió comparar antes y después del descenso de temperatura la fracción relativa de los cristales mayores y menores que el diámetro medio. Pudo observarse que luego del salto térmico aumentó significativamente ($P < 0,05$) la frecuencia relativa de los cristales cuyos diámetros eran superiores al diámetro medio.

Este crecimiento preferencial de los cristales de hielo de mayor tamaño, durante un descenso de temperatura, evidencia una diferencia de fuerza impulsora que depende del tamaño cristalino. Sin embargo, el problema de la predicción de la velocidad de crecimiento en función de la fuerza impulsora no ha sido aún totalmente aclarado (Chalmers, 1977). No obstante, tratándose de soluciones diluídas puede aceptarse que el avance de la interfase no está controlado por un proceso de transferencia de masa sino por transferencia energética (Fennema, 1973). De esta manera, el crecimiento cristalino resulta proporcional al subenfriamiento.

El subenfriamiento puede dividirse en tres partes, cada una responsable de una etapa del proceso, siendo : a) la diferencia de temperatura entre la fuente fría y la interfase, fuerza impulsora para la conducción de calor, b) la diferencia de temperatura de la interfase y la de equilibrio, fuerza impulsora de la cinética del proceso de interfase y c) la diferencia entre la temperatura de equilibrio de la superficie real respecto de la que correspondería a una superficie plana, fuerza impulsora que tiende a incrementar el radio de curvatura. En forma global, el subenfriamiento estará

determinado por la diferencia entre la fuente fría (T_{∞}) y la temperatura de equilibrio del cristal (T_r).

En forma genérica la velocidad de crecimiento puede expresarse como:

$$\frac{dD}{dt} = C (T_r - T_{\infty})^q \quad (59)$$

con C y q constantes.

Como T_r depende de la forma y tamaño cristalinos, por la Ec. (56) puede demostrarse que los cristales más grandes, al tener valores superiores de T_r , presentan un subenfriamiento mayor que los más pequeños y crecen en forma preferencial.

De esta manera, al existir una distribución de tamaños cristalinos, también existe una distribución de fuerzas impulsoras y por lo tanto, un crecimiento cristalino selectivo que se ve reflejado en el aumento de diámetro medio que se obtiene a consecuencia de un descenso de temperatura.

En conclusión, tanto ascensos como descensos de temperatura producen un aumento del diámetro medio cristalino, sumándose al efecto producido por la recristalización a temperatura constante.

CAPITULO 3

OPTIMIZACION DEL METODO DE OBSERVACION MICROSCOPICA DE TEJIDOS CARNEOS CONGELADOS

La observación microscópica de tejidos congelados requiere una técnica adecuada para el análisis de las alteraciones en la estructura tisular provocadas por el hielo, formado durante la congelación y sus modificaciones durante el almacenamiento. Esta puede realizarse a través de:

- a) observación directa de los cristales formados en el tejido.
- b) observación indirecta de los huecos dejados por el hielo en el tejido, involucrando las técnicas de sustitución y de liofilización.

La técnica directa implica el corte y la observación de las muestras a bajas temperaturas y requiere para tal fin sistemas con control de temperatura tales como micrótomo y microscopio refrigerados (Van Hulle y col., 1965; Ulrich y Nguyen, 1967; Nguyen, 1969a; Partman, 1973) o ambiente refrigerado (Woodroof, 1939; Nguyen, 1969b). En lo referente al tejido, por falta de una masa de sostén, los detalles estructurales tienden a modificarse ligeramente durante el corte y el manipuleo de las muestras. Por otra parte las secciones histológicas de carne congelada, con los cristales de hielo presentes, no permiten una buena observación de los efectos de la congelación sobre la estructura de las fibras (Van Hulle y col., 1965).

En la técnica indirecta, las muestras se fijan y se incluyen en parafina, la que otorga la dureza transitoria necesaria para realizar los cortes, los cuales se tiñen y montan, posibilitando su mejor observación.

Esta última técnica permite realizar las observaciones microscópicas a temperatura ambiente y conservar los cortes para posteriores estudios. Además, ya en 1908, Richardson y Scherubel, al comparar ambos métodos afirmaron que las mismas características observadas en cortes congelados (técnica directa) aparecían en los cortes preparados por la técnica de sustitución. Posteriormente, Van Hulle y col. (1965) al realizar observaciones de cortes

adyacentes , unos congelados y los otros fijados y teñidos, encontraron los mismos detalles estructurales, demostrando que los huecos existentes en los cortes tratados por la técnica in directa eran provocados por el hielo y que dicha técnica no cau saba alteraciones a la estructura tisular original.

De ambas técnicas indirectas mencionadas, la de liofiliza ción consiste esencialmente en la sublimación del hielo en cáma ra de vacío a bajas temperaturas, en general inferiores a -30°C , y requiere por lo tanto equipos adecuados (Koonz y Ramsbottom, 1939; Rebhum, 1972; Sy y Fennema, 1973; Voyle, 1974).

La técnica de sustitución difiere de la anterior al reem plazarse el hielo de las muestras por solventes de bajo punto de fusión, que a su vez fijan la estructura tisular. Ambas técnicas tienen en común las etapas de impregnación en parafina, corte, teñido y montaje. La técnica de sustitución ha sido utilizada a muy bajas temperaturas, llegando en algunos casos a -196°C (Feder y Sidman, 1958; Fernández-Morán, 1960; Van Harreveld y Crowell, 1964; Van Harreveld y col., 1965; Rebhum, 1972). Asimismo, puede llevarse a cabo a temperaturas cercanas a las del punto de fusión del hielo en el tejido, confiriéndole mayor ver satilidad respecto a la liofilización.

Este hecho, junto con el menor requerimiento instrumental, motivaron la elección en el presente trabajo de la técnica de sustitución para estudiar las modificaciones de la estructura tisular provocadas por el hielo durante el alam cenamiento conge lado.

Siendo que comúnmente la técnica de sustitución para la observación de tejidos congelados se utiliza a muy bajas tempe raturas, resulta de interés extender su rango de aplicación, a niveles térmicos más elevados (entre temperaturas cercanas al punto inicial de congelación del tejido y -20°C), que correspon den a los que se emplean en la industria de alimentos congelados. Por tal motivo, se encaró el estudio de la optimización de las

condiciones de fijación, con el propósito de minimizar los errores que el método pudiera introducir en las mediciones histológicas de los cristales de hielo.

3.1 Técnica de sustitución a baja temperatura

3.1.1 Obtención de las muestras

Las muestras de carne congelada de aproximadamente 0,5 cm de diámetro y de 1 cm de altura se obtenían mediante sacabocados de piezas de músculo bovino semitendinoso, post-rigor, de historia térmica conocida en cámaras a bajas temperaturas.

3.1.2 Sustitución y fijación

A pesar de tratarse de dos procesos distintos y separables, actualmente existe la tendencia a combinarlos en un solo paso. Según Feder y Sidman (1958), en todos los casos ensayados con solvente y fijador juntos, se obtuvieron mejores resultados en cuanto a preservación estructural que con el solvente solo.

El objeto del proceso de fijación es lograr que las muestras puedan resistir tratamientos sucesivos con varios reactivos, tanto hipo como hipertónicos, sin pérdida, distorsión o descomposición importantes. La mayoría de los agentes fijadores actúan a través de la introducción de nuevas uniones inter e intramoleculares, que conduce a la desnaturalización o precipitación de proteínas formando una red que inmoviliza el resto de los constituyentes del tejido.

Convencionalmente se las divide en dos categorías: a) fijadores químicos como formol, cloruro mercurico y algunos compuestos de cromo y b) fijadores físicos como calor, alcohol etílico y acetona. Los fijadores químicos participan directamente en las nuevas uniones proteicas. Estas uniones fuertes, generalmente son de tipo covalente o de coordinación. La configuración global de la proteína no se ve necesariamente alterada. Por el contrario

los fijadores físicos desnaturalizan las proteínas, cambiando la configuración de las mismas al destruirse uniones débiles, de tipo Van der Waals o puente de hidrógeno, y formarse otras. Pero los fijadores convencionales probablemente desnaturalicen y fijen químicamente las proteínas no presentando un comportamiento bien definido (Feder y Sidman, 1958).

La elección del fijador debe contemplar que éste posea una rápida penetración en el tejido, una acción inmediata, cause mínimas pérdidas y alteraciones químicas y físicas en las células y sus componentes. Debe, en lo posible, ser económico, estable y de fácil manejo.

Un efecto de la mayoría de los fijadores es producir cierto endurecimiento del tejido, facilitando de esta manera el corte, reforzado, además, por la acción de los alcoholes en la deshidratación posterior. Algunos fijadores actúan también como mordientes para ciertos colorantes. Favorecen generalmente la diferenciación óptica de las estructuras tisulares aumentando los efectos del proceso de tinción.

Frente a la elección de un fijador debe tenerse en cuenta que no existe uno ideal. La misma dependerá del tipo de células o tejido a estudiar.

A partir de los datos bibliográficos (Feder y Sidman, 1958; Lynch y col., 1965; Goma y Biro, 1970; Cerella y Zaritzky, 1974; Bevilacqua y Zaritzky, 1980, 1982; Bello y col., 1981) y de experiencias previas realizadas, se analizó en forma comparativa la efectividad de distintos fijadores: ácido pícrico 1%, cloruro mercúrico 1% y Carnoy. El Carnoy y el ácido pícrico desnaturalizan rápidamente y precipitan las proteínas. El último, según Bello y col. (1981) causa gran distorsión del tejido. El cloruro mercúrico, que actúa principalmente sobre los grupos carboxílicos de las proteínas y forma combinaciones con radicales sulfuro, no causa tanta distorsión como el ácido pícrico, pero su penetración en el tejido es muy lenta más allá de los 2 ó 3 primeros

milímetros. La solución de Carnoy tiene las ventajas de tener bajo punto de fusión y gran poder de penetración, propiedad importante cuando se emplean temperaturas bajas, razones por las cuales se la seleccionó para el presente trabajo.

Las muestras previamente congeladas eran sumergidas en un volumen de solución fijadora por lo menos 10 veces el de éstas. La fijación se lleva a cabo normalmente a la temperatura final de congelación del tejido. Sin embargo, cuando estas temperaturas son elevadas (cercanas al punto de congelación), la elección del nivel térmico al que se lleva a cabo la fijación depende de diversos factores que son objeto de los estudios realizados en el presente capítulo.

3.1.3 Inclusión

La finalidad de esta etapa es obtener bloques plásticos que contengan las muestras, proporcionando a estas últimas la consistencia necesaria para realizar cortes de pocos micrones de espesor, sin provocar distorsión ni alterar las relaciones espaciales del tejido.

Previamente se requiere llevar a cabo los siguientes procesos:

- deshidratación por alcoholes de graduación creciente.
- impregnación con un disolvente de la parafina, que actúa como intermediario entre ésta y el alcohol.
- impregnación con parafina.
- inclusión definitiva.

3.1.3.1 Deshidratación

Una vez transcurrido el período de fijación a baja temperatura, las muestras pueden manipularse a temperatura ambiente.

El agua de los tejidos debe eliminarse para ser reemplazada por parafina. Un paso previo es el intercambio del agua

por una sustancia afin a ella, de manera que pueda penetrar fácilmente entre las células del tejido, debido a la inmiscibilidad del agua y la parafina. El solvente más indicado para este propósito es el alcohol etílico. La deshidratación se lleva a cabo por pasajes sucesivos por soluciones de concentración creciente de etanol. El pasaje directo del fijador a etanol absoluto provoca distorsión de los tejidos. Este proceso se realiza según los siguientes pasajes:

- etanol 70% (12 a 24 hs)
- 2 pasajes por etanol 96% (1 h cada uno)
- etanol 100% (1 h 30 min)

Una mala deshidratación conduce a problemas de disgregación del material al ser cortado.

3.1.3.2 Impregnación por líquidos intermediarios

Esta etapa permite el reemplazo del alcohol de los tejidos por un líquido que disuelva la parafina con la cual el tejido va a ser impregnado. También recibe el nombre de **aclaramiento** ya que muchas de estas sustancias tienen la propiedad de volver transparentes los tejidos al tener índice de refracción aproximadamente igual al de éstos. Sin embargo no todos los agentes intermediarios actúan como aclarantes y viceversa. La mayoría de las sustancias verdaderamente aclarantes son aceites esenciales (esencia de clavo, de bergamota, terpineol, etc.).

Un buen agente aclarante debe eliminar rápidamente el alcohol y aclarar sin endurecer las muestras. Además no debe evaporarse demasiado rápido en el baño de parafina.

Los que ofrecen mayores ventajas y resultan menos costosos son el benceno y el tolueno. El xileno endurece las piezas y las torna quebradizas. Se eligió en este trabajo el benceno, a pesar de no ser un verdadero agente aclarante, pues los cortes obtenidos son de buena calidad y no endurece los tejidos, aunque ofrece la desventaja de ser más volátil e inflamable. La impregnación se lle

vaba a cabo por un pasaje de 15 minutos en benceno al cabo del cual se observaba cierta transparencia de las muestras.

3.1.3.3 Impregnación con parafina

Durante este proceso, la parafina llena todas las cavidades e intersticios tisulares y aun los espacios intercelulares. Esta operación se realiza en recipientes termostáticos que mantienen la parafina fundida sin que sobrepase los 60°C lo que dañaría las piezas, endureciéndolas y tornándolas quebradizas. Se utilizó parafina para uso histológico, purificada por filtración, cuyo rango de fusión era de 55 a 58°C pues las parafinas blandas no permiten realizar cortes finos y las muy duras pueden quemar el material o cortarlo por fragilidad.

Para asegurar la eliminación total del benceno y por consiguiente una buena inclusión, deben realizarse 3 pasajes de por lo menos 30 minutos cada uno.

Las etapas de deshidratación, impregnación con líquidos intermedarios y con parafina, se llevaban a cabo en un dispositivo automático, Histokinette tipo E 7326 (British American Optical Co. Ltd.) basado en el principio de un huso central rotatorio que porta un canasto suspendido del extremo de un brazo horizontal. Un sistema de relojería eléctrico, siguiendo un programa de intervalos de tiempo determinado, controlaba el sistema que transporta el canasto con las muestras a la solución siguiente. Una ventaja importante de este tipo de equipos es el movimiento oscilatorio que se imprime al canasto, lo que provoca una agitación continua de las soluciones, que acelera los intercambios entre los agentes químicos y los tejidos, reduciendo considerablemente los tiempos de operación.

Se observó que las etapas de impregnación en benceno y en menor medida la impregnación con parafina, conducen en general a un encogimiento de las muestras procesadas. Con el fin de evitar los errores que dicho encogimiento introduce en las mediciones sólo se

procesaron aquellas muestras que experimentaban un encogimiento relativo menor que el 5%. Se define el mismo como:

$$\frac{\text{diámetro inicial} - \text{diámetro después de la impregnación}}{\text{diámetro inicial}} \times 100$$

3.1.3.4 Inclusión definitiva

Para obtener los bloques de parafina se retiraban del último baño los soportes metálicos perforados con las muestras y se las trasladaba por medio de una pinza, a moldes de papel identificados de 2 x 1,5 x 1,5 cm³ llenos de parafina líquida. Cada pieza era colocada en la posición conveniente para obtener los cortes en la orientación deseada. Por medio de una aguja histológica se elimina el aire y una vez que la parafina había solidificado parcialmente, se colocaba el molde sobre una placa metálica apoyada sobre hielo granizado. El enfriamiento debía ser rápido para obtener bloques de consistencia uniforme.

Una vez que los bloques habían endurecido se los acondicionaba sobre tacos de madera para ser cortados en el micrótomo.

3.1.4 **Corte**

Los cortes de las muestras incluídas en parafina se efectuaban en un micrótomo rotatorio 820 American Optical, cuya cuchilla, de filo en cuña, tenía una inclinación apropiada con el propósito de obtener cortes seriados de espesor parejo. El filo de la cuchilla se restituía periódicamente con un afilador automático American Optical que utiliza una placa de vidrio y suspensiones abrasivas para tal fin.

El espesor de los cortes fue de 10 μm. La cinta obtenida, constituída por varios cortes consecutivos, se extendía en un baño de flotación de agua destilada a 37°C. Posteriormente se la colocaba sobre un portaobjetos, sobre el cual se había extendido una delgada capa de albúmina de Mayer como adhesivo. Los portaobjetos así preparados se colocaban en estufa a 45°C durante aproximada

mente 45 min. para que coagulase el adhesivo.

3.1.5 Observación microscópica de los cortes

El objeto de la tinción de los cortes es mejorar la visualización de las características físicas de los tejidos, pues si se examinan al microscopio por luz transmitida, sólo se aprecian los límites de las células y los núcleos. La técnica está basada en la distinta afinidad que presentan los diversos tejidos y los componentes de las células frente a diferentes colorantes. Estas diferencias de tinción pueden explicarse por variaciones de estructura fisicoquímica y de composición de las células y los tejidos.

3.1.5.1 Desparafinación

Como los colorantes utilizados son solubles en agua se hace necesaria la rehidratación de los cortes. Esta se lleva a cabo siguiendo el camino inverso que condujo a la inclusión en parafina. Es decir, se tratan los cortes con líquidos intermediarios que disuelven la parafina, en este caso xileno, luego alcohol absoluto y así siguiendo con alcoholes de concentración decreciente, hasta sumergirlos en agua. Las etapas seguidas fueron las siguientes:

- 2 pasajes por xileno de 10 minutos cada uno.
- 2 pasajes por alcohol 100% de 2 minutos cada uno.
- 1 pasaje por alcohol 90% de 2 minutos.
- 1 pasaje por alcohol 70% de 2 minutos.
- 2 pasajes por agua de 2 minutos cada uno.

3.1.5.2 Tinción

Durante esta etapa, las células y los componentes de los tejidos forman una unión molecular con el agente colorante activo tal que no se ve ninguna partícula de colorante, conservando éstos cierta transparencia. En este estudio se utilizaron dos colorantes de contraste: la hematoxilina, que tiñe las estructur

turas finas del núcleo y la eosina, que permite distinguir detalles del citoplasma de las células.

La hematoxilina, colorante básico (la parte activa es la base combinada con un radical ácido incoloro) se extrae del duramen del árbol *Haematoxylon Campechianum*, originario de Méjico. El extracto natural que se obtiene no es un colorante activo. Este debe ser oxidado para dar hemateína, que es el principal agente activo. Este proceso de oxidación que se desarrolla en el extracto alcohólico o acuoso es conocido como "maduración" y requiere para producirse en forma espontánea de seis meses a un año. Pero puede lograrse casi instantáneamente con oxidantes químicos, como óxido de mercurio, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno, hipoclorito de calcio y yodato de sodio, siendo el último el utilizado en este caso. Un colorante de hematoxilina maduro es una mezcla de hematoxilina, hemateína, hematoxilón (extracto natural), productos de oxidación activos y productos de ultraoxidación inactivos. Una oxidación prolongada da compuestos en su mayoría incoloros por lo que es de fundamental importancia utilizar la cantidad correcta del agente oxidante. Otra sustancia importante en la preparación de este colorante es el mordiente, pues la hemateína sola produciría una coloración amarillenta clara. Se utilizan sales divalentes o trivalentes o hidróxidos de metales cuya estructura fisicoquímica facilita la fijación del colorante sobre los tejidos. El complejo resultante colorante-mordiente-tejido se denomina laca. Pueden usarse como mordientes sales de aluminio, hierro, cromo, cobre, molibdeno y vanadio aunque se prefieren los alumbres de amonio o potasio o de hierro.

En particular para la preparación de hematoxilina de Erlich, que es la utilizada en este trabajo, se agrega glicerina, que desempeña una doble función: estabiliza la solución y previene la sobreoxidación. Además detiene la acción del colorante suministrando una tinción menos intensa y más uniforme. El aporte realizado por Erlich fue el descubrimiento del efecto estabilizante

de los ácidos sobre estos colorantes que impide la formación de la laca. La ventaja de esta preparación radica en su gran estabilidad, que puede extenderse por años sin perder potencia.

La tinción con hematoxilina puede ser progresiva, tiñiendo hasta lograr la intensidad de color deseada, o regresiva, tiñiendo los tejidos en exceso y luego eliminando selectivamente el colorante hasta lograr la intensidad buscada. Este último proceso, empleado en el presente estudio, recibe el nombre de **diferenciación**. Durante el mismo algunos constituyentes celulares pierden completamente la coloración mientras que otras estructuras las conservan. Como la selectividad de los colorantes básicos no es absoluta, éstos tiñen también el citoplasma, por lo tanto la operación mencionada se vuelve necesaria en casi todos los tejidos. Al ser el colorante utilizado de tipo alcalino la diferenciación se logra en una solución alcohólica ácida pues tanto el alcohol como el ácido favorecen la disolución del exceso de colorante y mordiente. El ácido clorhídrico elegido para tal fin forma sales solubles con los metales presentes evitando su precipitación. Por lo antes expuesto se puede deducir que los cortes no pueden permanecer mucho tiempo en el baño de diferenciación. El tiempo óptimo se obtiene por ensayos y control microscópico.

La etapa siguiente se denomina **azuleamiento** y consiste en eliminar el exceso de acidez en un baño con agua corriente, o en soluciones levemente alcalinas, para permitir la formación de la laca insoluble de color azul de aluminio-hemateína-tejido; la solución ácida presenta color rojizo.

Para la coloración del citoplasma, de fondo o de contraste, se utiliza eosina. Estos colorantes son xantenos ácidos o derivados de ftaleína. A las soluciones acuosas se les agrega timol o formol para impedir el desarrollo de hongos.

La coloración consta de las siguientes etapas, siendo los tiempos aproximados, pues dependen de la coloración deseada:

- tinción con hematoxilina de Erlich, 2 min. Los núcleos apare-

cían con coloración rojiza.

- lavado con agua
- diferenciación por alcohol - ácido
- azuleamiento por lavado con agua, 5 min. El color rojizo viraba al violeta
- lavado con agua destilada
- tinción con eosina, 1 min.
- lavado con agua destilada

3.1.5.3 Deshidratación y montaje

La observación al microscopio de cortes teñidos pero sin montar resulta muy difícil por la gran diferencia que existe entre la refracción de la luz en el portaobjetos, el tejido y el aire, sumándose a ésta la distinta dispersión de la luz. Para mejorar los resultados, el corte de tejido debe impregnarse con un medio de índice de refracción cercano al del vidrio y al índice de refracción promedio del tejido. Además, el medio de montaje protege los cortes teñidos de lesiones físicas y blanqueamiento o deterioro del colorante a consecuencia de oxidaciones. Un medio de montaje permanente ideal deberá tener un índice de refracción próximo al del vidrio (1,518), secarse sin modificar o arrugar los cortes, endurecerse y no alterar los colores por períodos prolongados. Se eligió el Bálsamo de Canadá, resina sintética de Merck cuyo índice de refracción es 1,520, siendo más estable que la resina natural. Puesto que todas las resinas de posible utilización son solubles en xileno, los cortes deben estar impregnados en xileno, en otras palabras, se deben deshidratar primero y aclarar después. La deshidratación con alcoholes de concentración creciente debe realizarse correctamente para evitar la aparición de regiones nebulosas en los cortes montados. Para tal fin se siguió el procedimiento descrito a continuación:

- pasaje por alcohol 70% durante 3 minutos
- pasaje por alcohol 90% durante 3 minutos

- 2 pasajes por alcohol 100% durante 2 minutos cada uno
- pasaje por mezcla en partes iguales de alcohol 100% y xileno
- 2 pasajes por xileno durante 3 minutos cada uno
- montaje con Bálsamo de Canadá

Esta última operación se realizaba colocando una pequeña cantidad de Bálsamo de Canadá sobre el corte aún embebido en xileno. Luego se ubicaba sobre ésta el cubreobjetos de 0,125 mm de espesor evitando la formación de burbujas de aire. Posteriormente los cortes se secaban en estufa a 37°C por un período de 3 horas aproximadamente, quedando ya disponibles para la observación microscópica.

3.1.6 Soluciones empleadas en la técnica histológica

Fijador de Carnoy

- 6 volúmenes de etanol 100%
- 3 volúmenes de cloroformo
- 1 volumen de ácido acético glacial

Debe prepararse en el momento de ser usado.

Albúmina de Mayer

- 60 ml de albúmina de huevo
- 40 ml de glicerina

Se realiza la mezcla y se filtra a través de papel de poro grueso o algodón absorbente humedecido, en estufa a 58°C. Se agrega al filtrado un cristal de timol para evitar el desarrollo de mohos.

Hematoxilina de Erlich

- 2 gr de hematoxilina
- 0,3 gr de yodato de sodio
- 3 gr de alumbre de amonio o potasio
- 10 ml de ácido acético
- 100 ml de etanol 96%

100 ml de glicerina

100 ml de agua destilada

La hematoxilina se disuelve en alcohol y el alumbre en el agua destilada tibia, se le agrega a ésta última el iodato y la glicerina. Se mezclan ambas soluciones y se filtra.

Alcohol ácido

99 ml de etanol 80%

1 ml de ácido clorhídrico concentrado

Eosina

Solución acuosa al 1% (P/V)

Agregar un cristal de timol

3.2 Análisis de las condiciones de fijación para la aplicación de la técnica de sustitución a tejidos congelados

La técnica de sustitución a bajas temperaturas para el estudio de la localización del hielo en tejidos congelados, difiere esencialmente de las técnicas convencionales de sustitución en que la etapa de fijación se realiza a temperaturas por debajo del punto de fusión del tejido. Este hecho plantea la necesidad de analizar qué nivel térmico seleccionar para evitar distorsión en el tamaño cristalino, especialmente en el caso de tratarse de tejidos congelados a altas temperaturas. Las posibilidades que surgen a priori son la fijación isotérmica o a una temperatura inferior. Ya, Kaess y Weideman en 1961, destacaron la imposibilidad de estudiar posiciones y formas de cristales de hielo de muestras congeladas que han sido fijadas a temperatura ambiente, pues la rehidratación de las fibras durante la fijación enmascara las alteraciones provocadas por la congelación. Lo mismo ocurre cuando la temperatura de fijación, aún siendo inferior al punto de fusión del hielo en el tejido, es superior a la temperatura

original de la muestra. Esto también había sido advertido por Richardson y Scherubel en 1908, siendo los primeros en implementar la técnica de sustitución isotérmica, consistente en fijar el te ji do a la misma temperatura en que se encuentra la muestra. Goma y Biro (1970) emplearon dicha técnica utilizando fijador de Carnoy, en muestras de carne vacuna. Bevilacqua y col. (1979), Asquith y Reid (1980) y Reid y col. (1985), la utilizaron para dilucidar posiciones y tamaños cristalinos del hielo, también en carnes vacunas. Recientemente Lampila y col. (1985) compararon la fijación convencional a temperatura ambiente, con la fijación isotérmica por microscopía electrónica de barrido (SEM), encontrando que aún los detalles de estructura fina se ven preservados por esta técnica.

No obstante uno de los fenómenos a considerar al emplear la técnica de sustitución isotérmica es el de recristalización durante la etapa de fijación (MacKenzie y col., 1975). Teniendo en cuenta que la velocidad de difusión del fijador no es instantánea, podrían modificarse los tamaños y formas de los cristales por recristalización, alterando así los resultados posteriores. Como ya se ha mencionado, la velocidad de recristalización amen ta con la temperatura y se torna importante a niveles térmicos superiores a -7°C (Sy y Fennema, 1973; Voyle, 1974; Gerrits y Jansonius, 1975; Bevilacqua y Zaritzky, 1982). Una alternativa para minimizar este inconveniente sería fijar a una temperatura inferior a la de las muestras, para disminuir la velocidad de recristalización pe ro, teniendo en cuenta, sin embargo, el aumento de la masa de hie lo que esto implicaría. En relación con esto último, MacKenzie y col. (1975) han señalado la fundamental importancia que tiene durante la etapa de fijación la variación de la fracción de agua congelada con la temperatura, cuando ésta es superior a -10°C .

Por lo expuesto, en el presente trabajo se ha encarado el a n á l i s i s de los errores en la medición de los cristales de hielo, que introduce el método de sustitución a través de la temperatura

a la que se conduce la etapa de fijación. Al respecto, se diseñaron experiencias que permiten analizar los efectos de la variación de la fracción de agua congelada y la recristalización del hielo durante esta etapa en forma comparativa.

3.2.1 Procedimiento seguido para la congelación y determinación de historias térmicas de las muestras cárneas

Las muestras de carne bovina, músculo semitendinoso de 60 horas post-mortem aproximadamente, se congelaban en un intercambiador de placas paralelas que permitía simular lo que ocurre en procesos industriales. Se utilizaban dos criostatos Lauda UK 50 DW cuyo control de temperatura era de $\pm 1^\circ\text{C}$ que proveían el líquido refrigerante, metanol, que circulaba por las placas del intercambiador. La velocidad de enfriamiento se regulaba variando la temperatura del líquido refrigerante e interponiendo planchas de acrílico de distinto espesor entre la carne y las placas del intercambiador. El sistema estaba provisto de aislamiento lateral al utilizar poliestireno expandido de 5 cm de espesor. De esta manera se lograba un flujo unidireccional paralelo a las fibras musculares, por ambas bases de las muestras cárneas. Las correspondientes historias térmicas eran seguidas por termocuplas de cobre-constantán insertadas en la superficie y centro de las muestras, conectadas a un registrador. Se contaba con distintos tipos de registradores de carta: Sargent Welch Recorder SRG o Honeywell Electronik 196 y sistema de adquisición de datos Data logger Fluke modelo 2240. Las velocidades de congelación fueron determinadas por el tiempo necesario para que el centro de la muestra variara su temperatura desde $-1,1$ a -7°C , tiempo característico de congelación (t_c). En los casos que sólo se congeló hasta -5°C se determinaron los tiempos transcurridos para pasar de -1 a -5°C (t_{-5}). Cuando las muestras habían alcanzado uniformidad en la temperatura final deseada eran trasladadas a cámaras de almacenamiento (Longhi Hns.) con un control de temperatura de $\pm 1^\circ\text{C}$,

para ser sometidas a los distintos tratamientos que se describirán oportunamente.

3.2.2 Método para la determinación del coeficiente de difusión de la solución fijadora

El coeficiente de difusión (D) del fijador de Carnoy fue determinado en tejido cárneo a distintas temperaturas (-4 , -10 , -20 y -26°C) en muestras cuyas dimensiones permitían simular condiciones de difusión unidireccional en medio semi-infinito.

El fijador de Carnoy fue coloreado con Azul de metileno (0,1% P/V) para facilitar la visualización de su posterior difusión a través del tejido. Las piezas de carne de $3,5 \times 3,5 \times 1 \text{ cm}^3$ fueron congeladas según el procedimiento ya descrito alcanzando temperaturas finales de -4 , -10 , -20 y -26°C y posteriormente transferidas a la solución fijadora en cámaras cuyas temperaturas coincidían con las finales de congelación. La solución de Carnoy fue previamente almacenada en dichas cámaras para que la fijación se llevara a cabo en forma isotérmica; las muestras fueron sumergidas en 10 veces su volumen de fijador. A distintos tiempos se procedió a separar muestras por triplicado. Sobre micrografías de éstas, obtenidas con un estereomicroscopio S.R. Zeiss provisto de una cámara Zeiss modelo 63, se realizaba la medición de la penetración (δ) de la solución fijadora.

3.2.3 Determinación de la influencia de la temperatura y el tiempo de fijación en la técnica histológica

Muestras de carne bovina provenientes de músculo semitendinoso post-rigor de 5 cm de diámetro y 1 cm de espesor fueron sometidas a un mismo tratamiento de congelación y a distintas temperaturas de fijación para analizar los efectos que dicha variable producía en la morfología del hielo.

Las muestras fueron congeladas en un intercambiador de placas (sección 3.2.1) hasta una temperatura final de -5°C , siendo

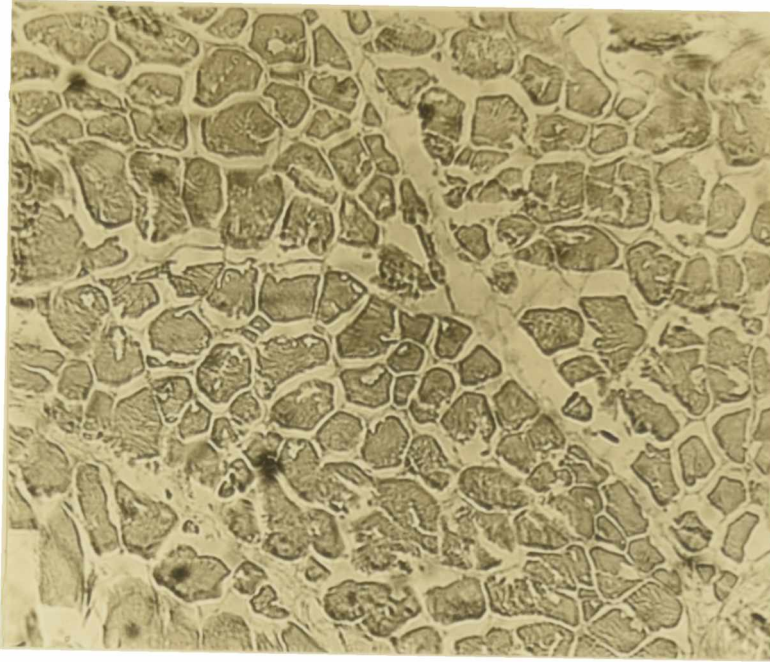
$t_{-5} = 20$ min. Para el análisis histológico se seccionaron con sa cabocados piezas más pequeñas de 0,5 cm de diámetro y 1 cm de es pesor de las iniciales en cámara a -5°C para evitar cambios de temperatura. Estas últimas fueron divididas en dos grupos para que se fijaran a distintas temperaturas: -5 y -15°C , permaneciendo en sendas cámaras de almacenamiento de donde eran retiradas a intervalos de 24 horas, durante 4 días, para ser procesadas según la técnica histológica ya descrita (sección 3.1). Los cortes obtenidos fueron micrografados en un microscopio Leitz Ortholux II equipado con una cámara Leitz Vario-Orthomat. Con un analizado r de imágenes (Morphomat 30, Zeiss) se obtuvieron de las micrografías los diámetros equivalentes (D_{eq}) de los huecos dejados por los cristales y el área (A_h) ocupada por el hielo. Los diámetros medios y las desviaciones standard se obtuvieron de distribuciones de frecuencias con un promedio de 100 cristales cada una. Los límites de confianza de los diámetros medios se calcularon usando el test "t" Student con probabilidad $P > 0.05$.

3.3 Resultados obtenidos

3.3.1 Efectos de la temperatura de fijación sobre la estructura tisular de carne bovina congelada

En las Figs. 23 a y b pueden observarse los cortes histológicos correspondientes a muestras congeladas a -5°C y fijadas unas a -5 y otras a -15°C . El estudio de las micrografías demuestra que los especímenes fijados a -15°C (temperatura inferior a la final de congelación) tienen una cantidad de hielo significativamente mayor ($P < 0.05$) que las muestras fijadas a -5°C .

Con el analizador de imágenes se determinó (en unidades arbitrarias) el área que ocupan las fibras (A_f) respecto a un área total (A_T) fija en ambas micrografías, para hallar por diferencia el área que ocupa el hielo (A_h). Las mediciones se realizaron por cuadruplicado obteniéndose los valores promedios (\bar{A})



a



b

100 μ m

Figura 23: Cortes histológicos transversales de tejido vacuno (músculo semitendinoso) con gelado a -5°C .

a) fijado a -5°C

b) fijado a -13°C

y las desviaciones standard (S) correspondientes. Luego se calcularon las desviaciones standard de las distribuciones de medias (S_A^-) y los límites de confianza con el estadístico "t" student para una probabilidad de 95% de confianza siendo $t_3(0,95) = 3,18$.

Recordando que:

$$S_A^- = \frac{S}{\sqrt{N}} \quad (60)$$

y

$$\bar{A} \pm t_v(P) S_A^- \quad (61)$$

con: N = número de datos, en este caso N = 4

v = N-1, grados de libertad

P = probabilidad

Seguidamente se hallan tabulados los valores hallados:

Tabla VI. Areas de hielo a distintas temperaturas de fijación.

T de fijación	\bar{A}_h	S	S_A^-	t S_A^-	límite de confianza
- 15°C	890,47	26,64	13,32	42,36	(848,11 - 932,83)
- 5°C	757,08	17,55	8,78	27,90	(729,18 - 784,98)

A través de los test "F" y "t" para diferencia de medias (Himmelblau, 1970) a nivel de 95% de confianza, se determinó que las áreas de hielo analizadas son significativamente diferentes. Los resultados fueron:

$$F_{\text{experimental}} = \frac{S_{-15}^2}{S_{-5}^2} = 1,52 \quad \text{y} \quad F_{\text{teórico}} \frac{3}{3}(0,95) = 9,28$$

Como $F_{\text{exp.}} < F_{\text{teor.}}$ ambas desviaciones standard pertenecen a la misma población y se puede realizar el test de diferencia de medias con $S_{A_{-15}-A_{-5}}^-$ como estima de la desviación standard combinada de la población según:

$$t_{\text{exp.}} = \frac{\bar{A}_{-15} - \bar{A}_{-5}}{S_{\bar{A}_{-15}} - \bar{A}_{-5}} = 8,36 \text{ y } t_{\text{teor. } 6(0,95)} = 2,45$$

Al ser $t_{\text{exp.}} > t_{\text{teor.}}$ se puede concluir que existía diferencia significativa entre ambas áreas medias a nivel de 0,05. Esta diferencia en áreas, proporcional a la masa de hielo, es atribuible al aumento de fracción de agua congelada con la disminución de temperatura. Según la Fig. 9 a -15°C la fracción de hielo respecto a la masa total de agua (ω) es de 87% mientras que a -5°C es sólo de 74%. Haciendo la relación de ambas fracciones se obtiene un valor de 1,18 igual al que se halla al vincular las áreas de hielo medidas.

Puede concluirse entonces que fijar a temperaturas inferiores a aquella que posee la muestra, en un intento por reducir los efectos de la recristalización, tratándose de temperaturas relativamente elevadas (superiores a -15°C) involucra un aumento de la fracción de agua congelada en el tejido que conduce a un error en las mediciones histológicas.

Dicho error debe ser comparado con el que surge de analizar los efectos de la recristalización durante la etapa de fijación.

3.3.2 Coeficiente de difusión del fijador de Carnoy en tejido cárneo congelado

La determinación de los coeficientes de difusión del fijador a distintas temperturas resulta necesaria para determinar los tiempos de fijación, durante los cuales se podría producir recristalización en el tejido.

La Fig. 24 muestra una típica fotografía utilizada en la medición de la penetración del fluido de Carnoy en el tejido bovino. El sistema pudo ser considerado, matemáticamente, como un medio semi-infinito, ya que durante el experimento las medidas de la penetración del fijador eran siempre pequeñas, en comparación con el



1mm

Figura 24: Difusión del fijador en tejido vacuno congelado. La zona clara muestra la penetración (δ) del fluido de Carnoy con azul de metileno. En este caso $\delta = 0,34\text{cm}$ para un día de fijación a -10°C .

espesor de la muestra en la dirección en que se produce la transferencia de masa. El coeficiente de difusión del fijador a distintas temperaturas (Tabla VII) se calculó con los valores de la penetración (δ) en función del tiempo (Crank, 1957) según:

$$\delta = 4 (D t)^{\frac{1}{2}} \quad (62)$$

donde δ : penetración del fijador, (m)

D : coeficiente de difusión del fijador, (m^2 /seg)

t : tiempo, (seg)

Tabla VII. Efectos de la temperatura sobre el coeficiente de difusión del fijador de Carnoy.

T (°C)	$\times 10^{11}$ (m^2 /seg)
- 4	1,460 \pm 0,007 ^a
- 10	0,834 \pm 0,006
- 20	0,454 \pm 0,124
- 26	0,125 \pm 0,006

a: límites de confianza (95%) de los valores medios calculados a partir de triplicados

La energía de activación ($E_a(\text{dif})$) para este proceso difusional se determinó, considerando una dependencia de tipo Arrhenius con la temperatura:

$$D = D_0 e^{-E_a(\text{dif})/RT} \quad (63)$$

con D_0 como factor pre-exponencial. Esta energía fue estimada a partir de la regresión lineal de $\ln D$ en función de $1/T$ Fig. 25) obteniéndose un valor de $E_a(\text{dif}) = 57.560 \pm 2.390$ J/mol y $D_0 = 2,339 \pm 0,066$ m^2 /seg.

Las ecuaciones (62) y (63) permitieron calcular el tiempo

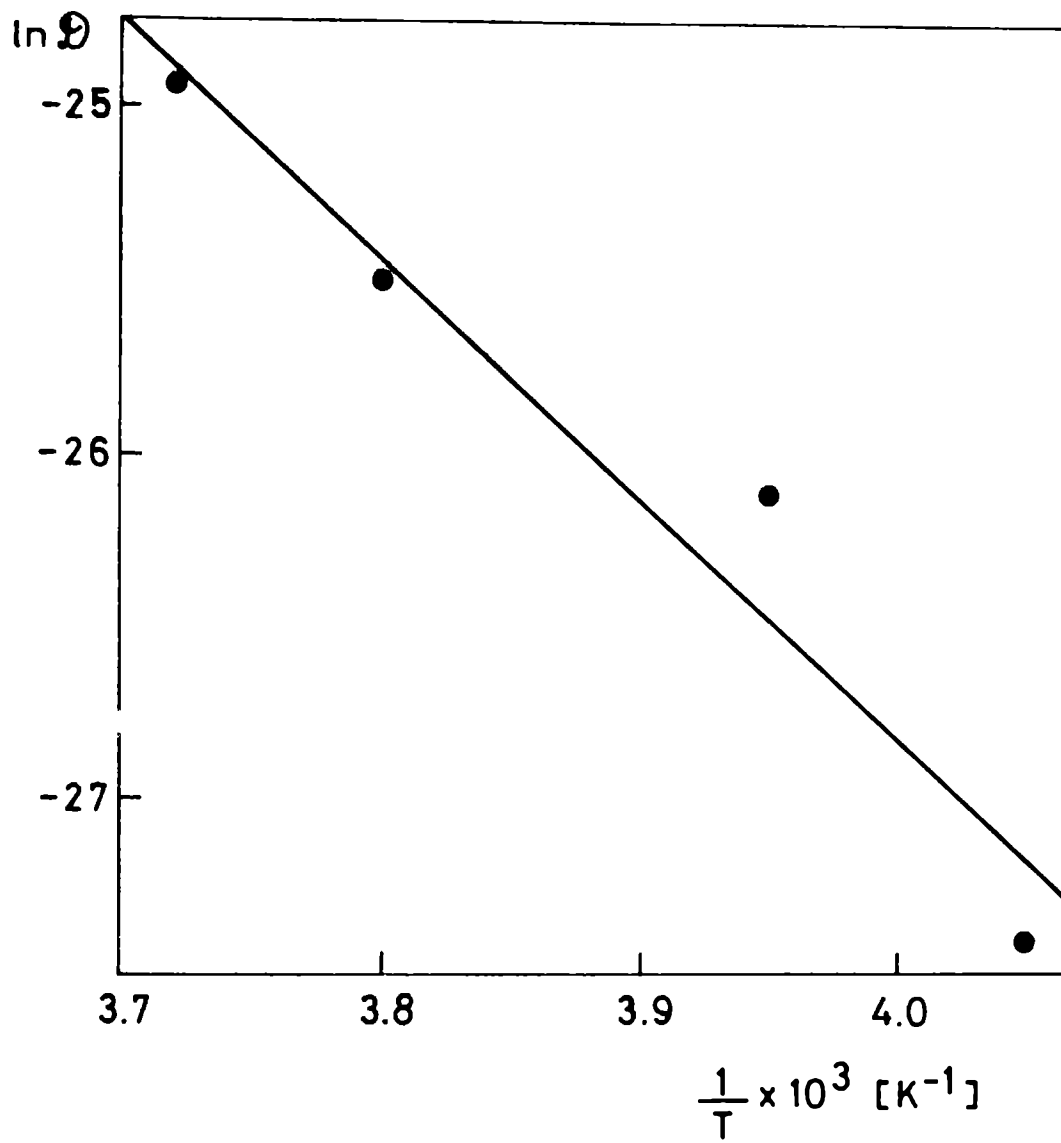


Figura 25: Efecto de la temperatura sobre el coeficiente de difusión del fijador de Carnoy (D) en tejido vacuno congelado.

requerido para una fijación completa, tiempo total de fijación (t_f), en función de la temperatura, según:

$$t_f = \frac{1,736 \times 10^{-5} \delta^2}{D_0 e^{-Ea(\text{dif})/RT}} \text{ (horas)} \quad (64)$$

En la Tabla VIII se encuentran los valores de t_f , considerando $\delta = 0,25$ cm que corresponde al radio de las muestras utilizadas en el tratamiento histológico.

Mediciones histológicas realizadas en muestras procesadas con el método de sustitución, fijando durante períodos entre 1 y 4 días, confirmaron que tiempos de fijación mayores que t_f no producían modificaciones en los tamaños cristalinos, avalando los resultados de la Tabla VIII y demostrando que una mayor permanencia en el fluido de fijación no alteraba las estructuras tisulares.

El conocimiento de los tiempos totales de fijación a distintas temperaturas, contribuyó a la eficiencia de la técnica histológica al acelerar los tiempos de operación de la misma y a definir los períodos durante los cuales habría riesgo de recristalización.

3.3.3 Efectos de la recristalización durante la fijación

Como ya se ha mencionado, el fenómeno de recristalización podría modificar la estructura cristalina durante la difusión del fijador, particularmente a temperaturas cercanas al punto de fusión del hielo en el tejido cárnico ($-1,1^\circ\text{C}$). Para estimar este efecto, se calcularon los incrementos de diámetro medio cristalino que se producirían durante el tiempo que requiriera la fijación completa, según la cinética de recristalización (válida a cortos tiempos) propuesta por Bevilacqua y Zaritzky (1982):

$$\frac{dD}{dt} = \frac{K}{D} \quad (65)$$

que integrada conduce a:

$$D^2 - D_o^2 = 2 K t \quad (66)$$

donde D: diámetro cristalino medio de hielo al tiempo t, en este caso tiempo de fijación ; D_o : diámetro cristalino medio inicial; K: constante cinética de recrystalización, expresada como:

$$K = K_o e^{-Ea_R / RT} \quad (67)$$

con K_o (factor preexponencial) = $1,67 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{seg}$; Ea_R (energía de activación para la recrystalización) = $4,35 \times 10^4 \text{ J/mol}$.

La variación de la estructura cristalina representada por el aumento de diámetro cristalino medio, debido a la recrystalización durante la fijación, se evaluó a través de la diferencia (Δ) entre el diámetro cristalino medio, al cabo del tiempo total de fijación y el diámetro inicial:

$$\Delta = D - D_o \quad (68)$$

Se estudiaron los efectos del diámetro inicial y la temperatura de fijación sobre Δ a partir de la Ec.(66) considerando t como el tiempo requerido para una fijación completa (t_f). En la Tabla VIII se hallan las diferencias calculadas para dos valores típicos de diámetros cristalinos iniciales, con sus respectivos límites de confianza a distintas temperaturas, que contemplan tanto aquellas que caracterizan a un semicongelado (-5°C) como a un congelado tradicional (-20°C).

Puede observarse que los diámetros iniciales mayores, implican cambios menores en Δ pues, como se analizó en el Cap. 2, la fuerza impulsora para la recrystalización aumenta con la curvatura de la superficie y por lo tanto, un diámetro inicial grande, relacionado directamente con velocidades de congelación lentas, presentará menor tendencia a modificarse que uno pequeño, independientemente de la temperatura. Pero aún los cambios producidos

por los diámetros pequeños resultan estadísticamente no significativos ($P > 0,05$), ya que estos incrementos debidos a la recristalización, caen dentro del intervalo de 95% de confianza para el correspondiente valor de diámetro inicial, en todas las temperaturas evaluadas. Esto se verifica aún para temperaturas tan elevadas como -5°C , ya que el simultáneo aumento de la velocidad de difusión, reduce el tiempo total de fijación y consecuentemente disminuyen las posibilidades de que la recristalización introduzca errores en las mediciones.

Tabla VIII. Efecto de la recristalización sobre el diámetro cristalino medio durante la fijación.

T ($^{\circ}\text{C}$)	t_f (hs)	Aumento del diámetro cristalino debido a la recristalización $\Delta = D - D_0$	
		$D_0 = 30,0^a \pm 2,6^b \mu\text{m}$	$D_0 = 50,0 \pm 3,2 \mu\text{m}$
- 5	8	0,79	0,48
-10	12	0,84	0,51
-15	21	0,97	0,59
-20	35	1,08	0,66

T: temperatura de fijación, t_f : tiempo total de fijación (correspondiente a un espécimen de radio = 0,25 cm), $\Delta = D - D_0$ con D_0 : diámetro medio inicial, D: diámetro medio al tiempo total de fijación, a: valor medio a partir de cuatro replicados y b: intervalo de 95% de confianza para D_0 .

3.4 Discusión de Resultados

Los resultados expuestos confirman que la fijación isotérmica, en la técnica de sustitución a bajas temperaturas, es un método apropiado para el análisis de los sistemas cristalinos y estructuras histológicas de tejidos cárneos congelados, aún a temperaturas cercanas al punto de congelación del tejido.

Tratándose de especímenes a temperaturas inferiores a -15°C , una eventual fluctuación de la temperatura de fijación no introduciría un cambio significativo en las mediciones cristalinas, debido a que las variaciones del porcentaje de agua convertida en hielo a bajas temperaturas, se ven notablemente reducidas.

En el caso de muestras congeladas cuya temperatura sea mayor de -15°C , fijar a temperaturas menores, en un intento por reducir los efectos de la recristalización, involucra una congelación adicional de agua durante la fijación que altera la estructura tisular, generando un error considerable en la medición, mientras que las variaciones introducidas por la recristalización resultan ser no significativas ($P > 0,05$) aún a -5°C .

CAPITULO 4

RECRISTALIZACION DEL HIELO EN TEJIDOS CARNEOS CONGELADOS

El proceso de congelación de alimentos involucra tres grandes etapas: congelación propiamente dicha, almacenamiento (transporte incluido) y descongelación. Cada una debe individualmente tener como propósito la optimización de los resultados concernientes a la conservación del producto, sin detrimento de ninguna de ellas, ya que una deficiencia en un eslabón de la cadena puede disminuir los beneficios previamente conseguidos. Durante la etapa de almacenamiento, los productos cárneos congelados permanecen por largos períodos antes de ser transportados y distribuidos para la venta; es en esta situación donde se producen pérdidas de calidad que exceden a aquéllas ocasionadas en cualquiera de las otras fases del proceso.

Las legislaciones imponen requerimientos energéticos cada vez más estrictos, aconsejándose temperaturas inferiores a -18°C para almacenamiento y transporte (Gortner y col., 1948; Ulrich, 1981a, b; Jul, 1984). Sin embargo, es muy frecuente que las carnes congeladas sufran fluctuaciones de temperatura durante esta etapa. Existen diversos trabajos donde se afirma que éstas son las principales causantes de los cambios físico-químicos, ya mencionados en el Capítulo 1, responsables de la pérdida de calidad y disminución de la vida útil del alimento (Chrystall, 1972; Singh y Wang, 1977; Ulrich, 1981a).

Asimismo, la literatura provee información acerca de la influencia de las oscilaciones térmicas ambientales y las distintas temperaturas que presentan los productos según su ubicación en los anaqueles de venta o almacenaje, determinando los abusos térmicos a que están sometidos (Schwimmer y col., 1955; Spiess y Wolf, 1977; Spiess y col., 1977; Zaritzky, 1982). Con este propósito se suele emplear la temperatura efectiva, siendo aquella en la que la velocidad del fenómeno bajo estudio es igual a la velocidad media cuando el sistema está sujeto a fluctuaciones (Schwimmer y col., 1955) y en oportunidades se le resta valor a las fluctuaciones en sí mismas frente a la temperatura efectiva, tratándose de calidad (Bramsnaes, 1981).

Debe destacarse la importancia de los envases (materiales aislantes, envasado al vacío) y también el rango de temperaturas en el cual se producen las fluctuaciones térmicas (Jul, 1969; Bramsnaes, 1981; Ulrich, 1981a, b; Jiang y col., 1985).

Evidentemente, la velocidad de deterioro dependerá de la temperatura de almacenamiento, sufra ésta oscilaciones o no, y del producto en sí mismo (Fennema, 1966; Dyer, 1968; Chrystall, 1972). Siendo la recristalización probablemente el cambio más importante de naturaleza únicamente física, puede ser efectivamente minimizada manteniendo bajas y uniformes temperaturas, aunque comercialmente esto sea algo difícil de lograr. Por este motivo se ha estudiado la recristalización del hielo en alimentos y en particular en miosistemas; debe tenerse en cuenta además, que los tejidos dañados por transformaciones cristalinas del hielo son irreparables (Lang, 1975). La literatura presenta coincidencias en características generales como el aumento de diámetro de los cristales con el tiempo de almacenamiento y el incremento de la velocidad al aumentar la temperatura (Moran y Hale, 1932; Goma y Biro, 1970; Voyle, 1974). Sin embargo, aspectos cuantitativos del fenómeno sólo fueron analizados por Sy y Fennema (1973) y Gerrits y Jansonius (1975) quienes postulan una cinética en base logarítmica para el tiempo y por Bevilacqua y Zaritzky (1982) al postular una cinética de tipo cuadrática para el diámetro cristalino válida para tiempos de almacenamiento cortos (menos de una semana). Al respecto, cabe el interrogante, si dicha cinética puede aplicarse a períodos de almacenamiento prolongados, ya que esto conduciría a un crecimiento de grano continuo que podría no ser compatible con la matriz tisular. Por este motivo, en el presente trabajo se propuso abordar el estudio de la recristalización en tejidos cárneos durante períodos de almacenamiento más extensos (hasta 5 meses) a temperaturas de -20, -15, -10 y -5°C.

El estudio a temperaturas relativamente altas como -5°C

está ligado a la evaluación del ahorro energético que éstas implican, en vistas a la factibilidad de su utilización cuando la demanda del mercado requiere tiempos de almacenamiento cortos. Como ya se ha mencionado en el Capítulo 1, Japón ha implementado la técnica de semi-congelados en el mercado del pescado (Uchiyama, 1979; Aleman y col., 1982), Canadá y China lo emplean como medio para prolongar la vida útil durante el transporte de pescado en barcos de captura (Roach y col., 1971; Gibbard y col., 1981/4; Ming, 1981/4).

También fue abordado el análisis histológico de muestras sometidas a saltos térmicos tanto ascendentes como descendentes. De los primeros existen algunas referencias para alimentos en general, no así de los descensos de temperatura que aunque menos frecuentes resultan también de interés.

Resulta asimismo importante analizar la conveniencia de seleccionar como temperatura final de congelación aquélla a la cual se almacenará el producto. A propósito de los saltos térmicos ascendentes, una práctica común es congelar a temperaturas muy bajas, criogénicas, y luego almacenar a temperaturas de -18°C o superiores. Jul (1984) advirtió la importancia de la temperatura final de congelación a través de trabajos de otros autores.

En síntesis, los objetivos que motivaron el estudio de la recristalización del hielo en carnes congeladas fueron:

- a) el conocimiento de las modificaciones ocasionadas por el hielo durante el almacenamiento prolongado de tejidos vacunos a diferentes temperaturas, vinculado a los resultados obtenidos del estudio en solución modelo.
- b) el desarrollo de un modelo matemático que interprete la cinética de recristalización a cortos y largos tiempos.
- c) el análisis de la influencia de las oscilaciones térmicas en la estructura tisular.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Método de congelación

Las muestras cárneas de músculo semitendinoso post-rigor, de 5 cm de diámetro y 1 cm de espesor fueron congeladas de la forma descrita en la sección 3.2.1.

Las temperaturas finales de congelación eran coincidentes con las de almacenamiento.

4.1.2. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la velocidad de recristalización

Las condiciones de congelación empleadas conducían a temperaturas finales diferentes que se lograban variando la temperatura del líquido refrigerante de los criostatos y el espesor de las placas de acrílico interpuestas.

Las velocidades de congelación (estimadas a través del tiempo característico, t_c), correspondientes a las distintas temperaturas finales (-5, -10, -15 y -20°C), se seleccionaron de tal manera que permitieran obtener diámetros cristalinos iniciales (D_0) prácticamente iguales. Esto fue realizado con el propósito de eliminar el efecto de D_0 en la comparación de la velocidad de recristalización a distintas temperaturas de almacenamiento.

Las muestras fueron almacenadas en cámaras a las cuatro temperaturas mencionadas, con una variación de $\pm 1^\circ\text{C}$, por un lapso máximo de cinco meses. La experiencia a -5°C sólo se prolongó 95 días, pues el período de vida útil de la carne es de 100 días (Jul, 1969).

A intervalos de tiempo establecidos se retiraban especímenes por duplicado (el tamaño del músculo era limitante), correspondientes a cada temperatura, para ser procesados según la técnica histológica de sustitución isotérmica descrita en el Capítulo 3.

4.1.3. Efecto del diámetro inicial sobre la recristalización de muestras almacenadas a temperatura constante

En este tipo de experiencias las muestras fueron congeladas hasta una misma temperatura final variándose las velocidades de congelación, para obtener D_0 diferentes y evaluar su efecto sobre la velocidad de recristalización. Se seleccionó -5°C como temperatura de ensayo por permitir observar mayores variaciones en el tamaño cristalino en menor tiempo de almacenamiento.

El rango de t_{-5} utilizado fue de 21 a 180 minutos, todos correspondientes a congelación extracelular.

Las muestras almacenadas a -5°C eran retiradas para su análisis histológico a distintos períodos durante un lapso de 52 días.

4.1.4. Almacenamiento con fluctuaciones de temperatura

El estudio de la influencia de las oscilaciones térmicas durante el almacenamiento, sobre la morfología de tejido de carnes bovinas congeladas fue realizado aplicando funciones de tipo escalón con saltos ascendentes y descendentes.

Las variaciones de temperatura a las que fueron sometidas se ejemplifican en la Fig. 26 para el caso de -10 y -20°C . Obsérvese que ciertas muestras permanecían a temperatura constante para ser utilizadas como referencia, ya que cada músculo se dividía en tres grupos que inicialmente habían sido congelados simultáneamente.

A distintos tiempos de almacenamiento se retiraban muestras por duplicado para el análisis histológico.

En todos los casos, los cortes histológicos obtenidos fueron micrografiados en un microscopio Leitz Ortholux II. Las micrografías posibilitaron la observación indirecta de los cristales de hielo a través de los huecos dejados por éstos en la estructura

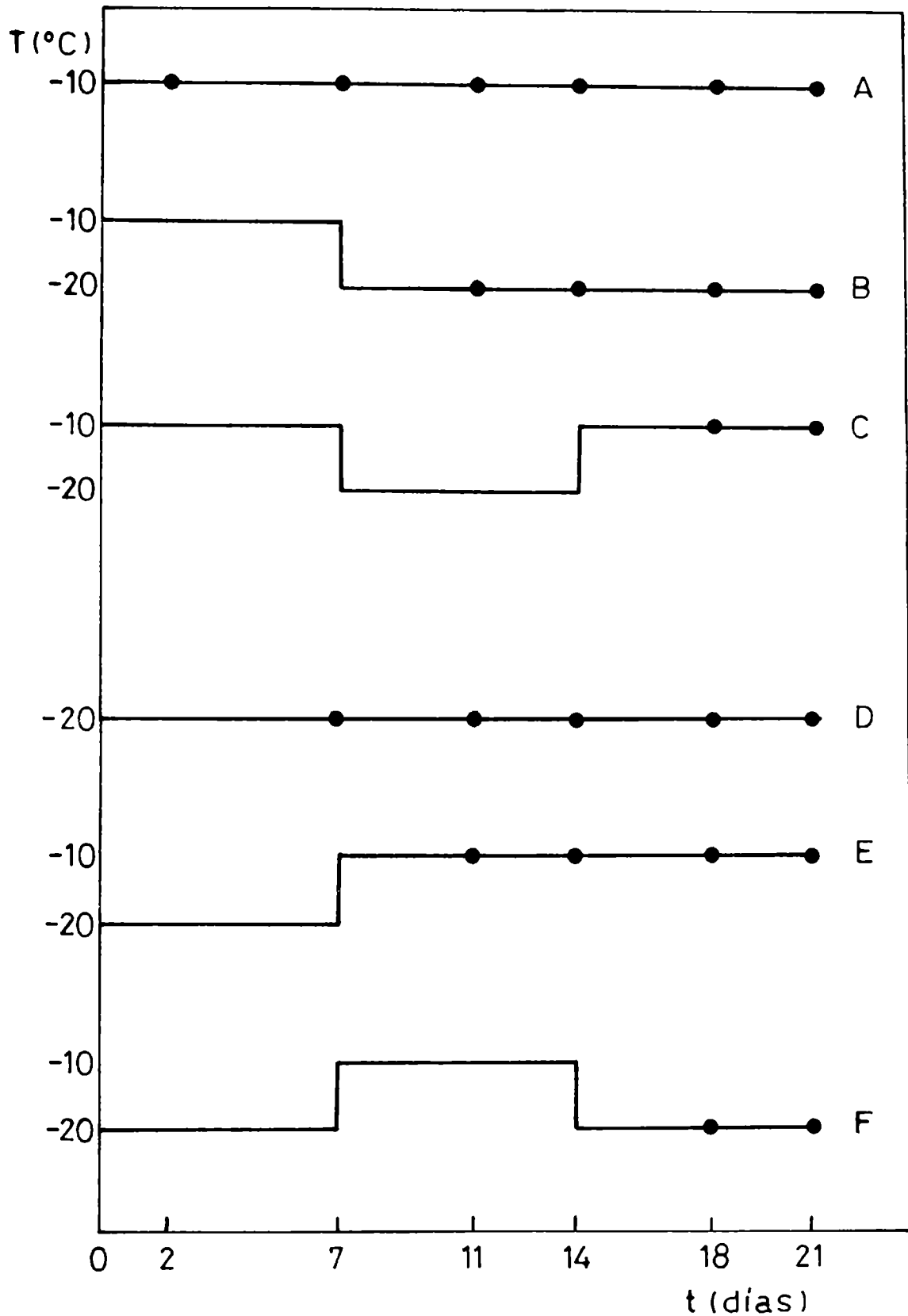


Figura 26: Esquema de los tratamientos térmicos a los que fueron sometidas las muestras cárneas durante el almacenamiento.

● simbolizan los tiempos en que fueron extraídas las muestras para el análisis histológico. Los tratamientos A, B y C corresponden a muestras congeladas simultáneamente hasta -10°C y los tratamientos D, E y F hasta -20°C .

tisular. Los diámetros individuales de los huecos fueron medidos por medio de un analizador de imágenes (Morphomat 30) y procesados en computadora (IBM Series/1 e IBM P.C., XT) para obtener diámetros medios, desviaciones standard e histogramas.

En forma similar fueron analizados, también, diámetros y áreas de fibras.

4.2. Resultados y discusión

Las micrografías de la Fig. 27b y c permiten observar las modificaciones ocasionadas al tejido por la recristalización del hielo, durante el almacenamiento a distintas temperaturas, al compararlas con el tejido fresco (Fig. 27a) de músculo bovino semitendinoso. Es apreciable el aumento de la fracción de hielo (zona clara en las micrografías) respecto a la de la fibra, al disminuir la temperatura. Este hecho ya ha sido analizado en la sección 3.3.1. en relación con la curva de fracción de agua congelada en función de la temperatura presentada en la sección 2.1 (Fig. 9). La Fig. 27b y c permite comparar también, la diferencia de los tamaños dejados por el hielo en muestras almacenadas el mismo tiempo a distintas temperaturas, siendo los diámetros medios $61,05 \pm 5,21 \mu\text{m}$ a -5°C y $55,95 \pm 4,93 \mu\text{m}$ a -15°C .

Utilizando las conclusiones obtenidas en el estudio de soluciones simuladoras, respecto a la selección de dimensiones características de los cristales (sección 2.2.1.), sólo se cuantificaron los diámetros equivalentes de los huecos dejados por los cristales de hielo, para obtener las distribuciones y diámetros medios que permitieran describir el proceso de recristalización.

A través de la prueba de bondad de ajuste del estadístico χ^2 , descripta en la sección 2.2.1., se comprobó que las distribuciones cristalinas permanecían normales ($P > 0,05$) para tiempos prolongados (5 meses).

Las micrografías correspondientes a experiencias realizadas

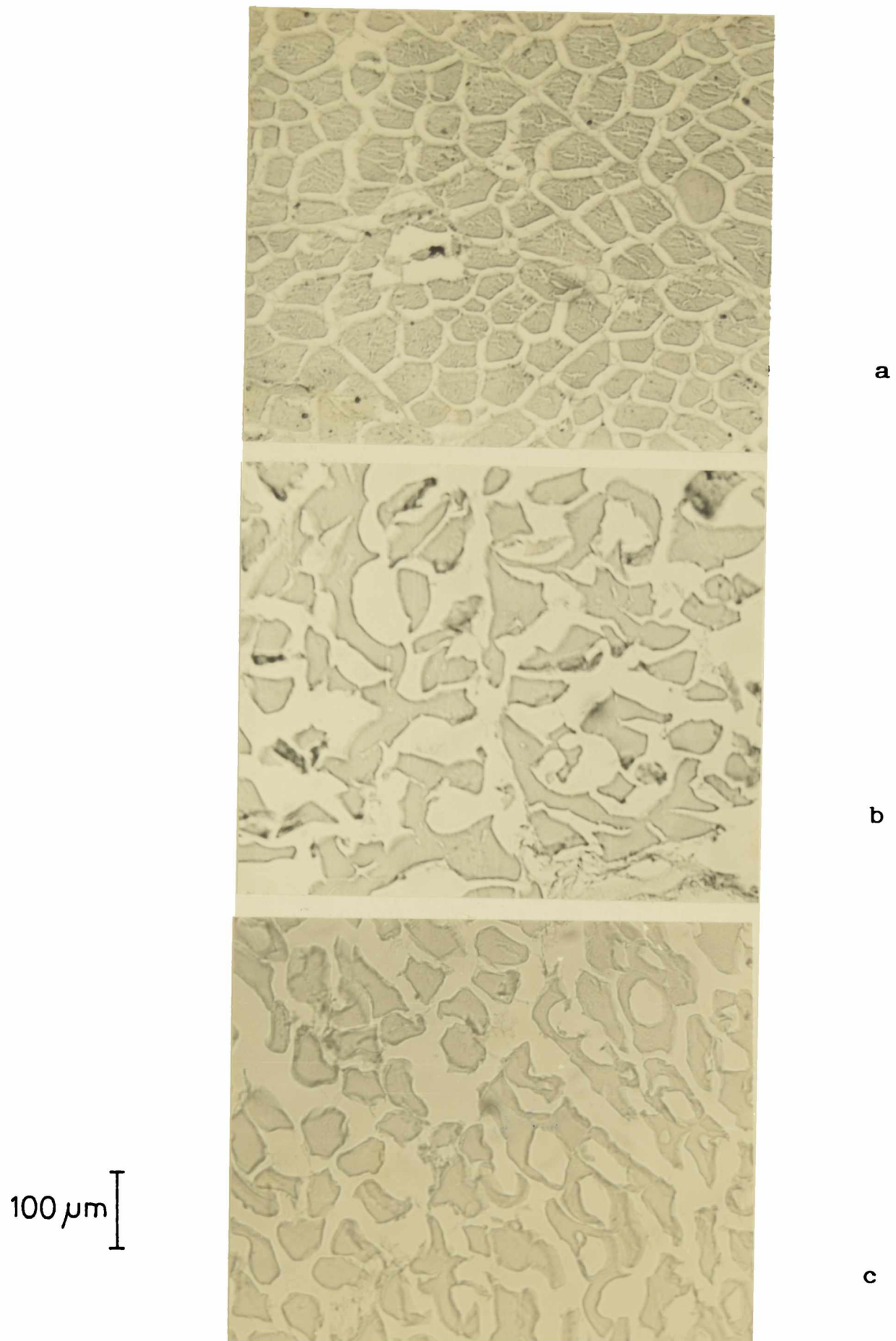


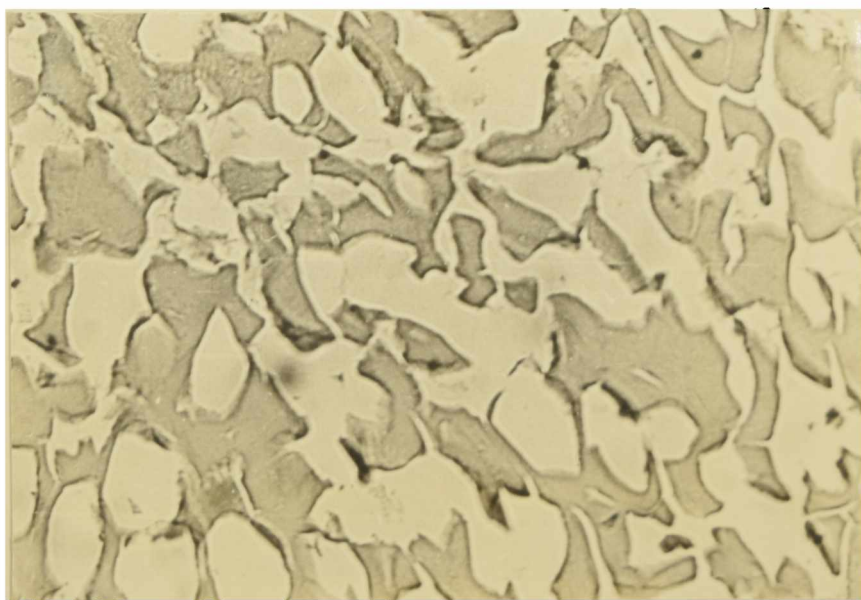
Figura 27: Cortes histológicos transversales de músculo semitendinoso.
a) fresco, sin congelar; b) almacenado a -5°C , 28 días; c) almacenado a -15°C , 28 días.
En los casos b) y c) las muestras fueron congeladas hasta la temperatura de almacenamiento.



a



b



c

100 μm |

Figura 28: Cortes histológicos de muestras cárneas almacenadas a -5°C .
a) Inmediatamente después de la congelación.
b) 14 días de almacenamiento.
c) 41 días de almacenamiento.

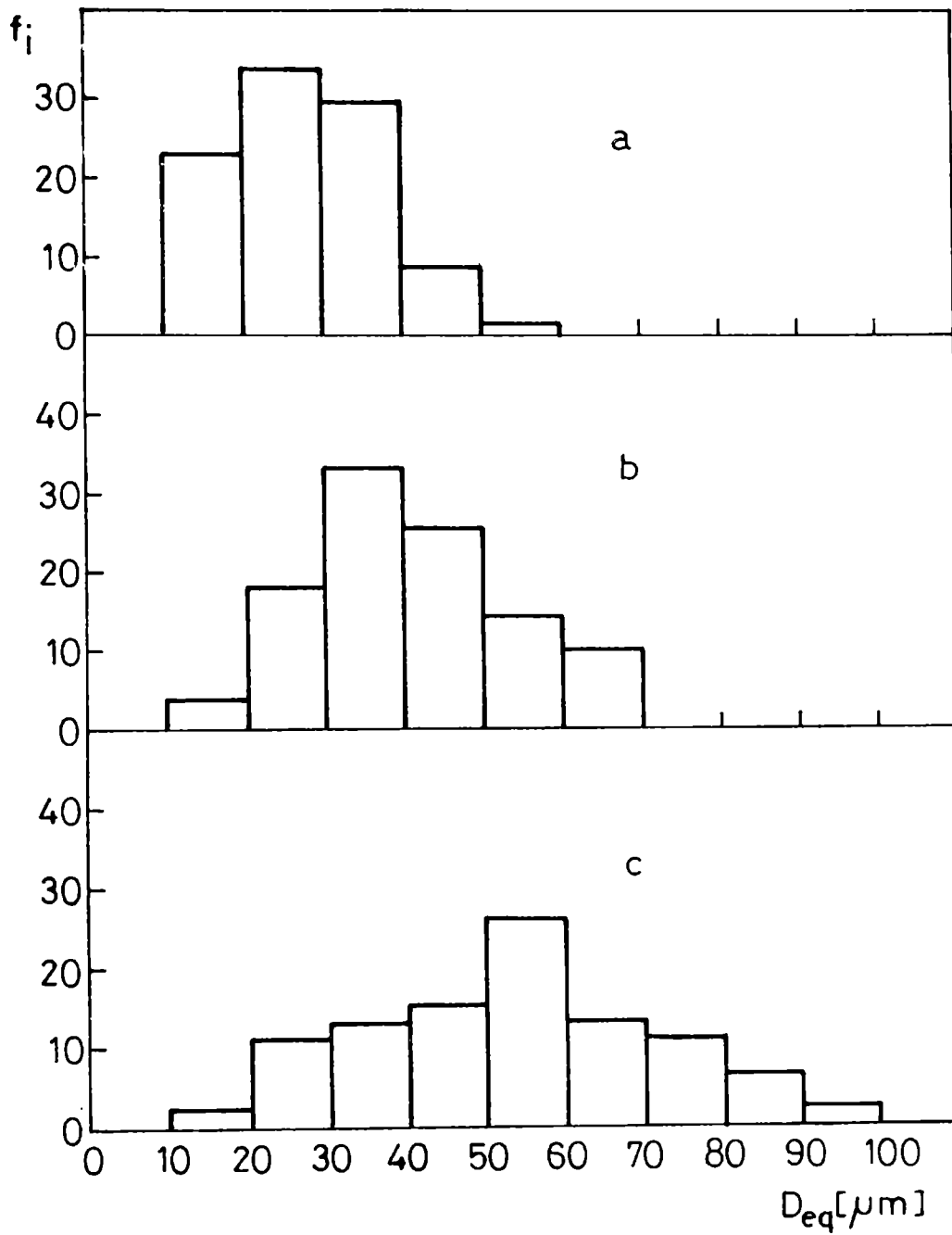


Figura 29: Histogramas de diámetros equivalentes (D_{eq}) en tejido cárnico en función de frecuencias relativas (f_i), correspondientes a una experiencia de almacenamiento a -5°C . a) inmediatamente después de la congelación; b) 5 días de almacenamiento; c) 40 días de almacenamiento.

a temperatura constante (Fig. 28a, b, c) y las distribuciones cristalinas (Fig. 29) demuestran el aumento del diámetro cristalino medio, que caracteriza al fenómeno de recristalización. Sin embargo, al analizar los datos experimentales (Fig. 30 y Fig. 31) se observaba que el aumento de tamaño cristalino medio no era ilimitado, sino que por el contrario a partir de un cierto tiempo que denominamos tiempo límite (t_1) (tanto mayor cuanto menor era el diámetro inicial y menor la temperatura de almacenamiento) se alcanzaban valores que no diferían entre sí en más de 3%.

Este hecho condujo a la reformulación de la cinética de recristalización, válida para cortos tiempos y presentada en el Capítulo 2 (Ec. (51)), contemplándose en la nueva expresión la existencia de un valor máximo para el diámetro medio. De esta manera la fuerza impulsora del fenómeno no solo depende de la curvatura media del sistema sino también, de la diferencia de ésta con la curvatura límite. La cinética queda expresada como:

$$\frac{dD}{dt} = k' \left(\frac{1}{D} - \frac{1}{D_1} \right) \quad (69)$$

Obsérvese que cuando $1/D_1$ se vuelve despreciable la Ec. (69) tiene la forma de las Ec. (51) y Ec. (65). Esta situación puede presentarse cuando no hay impedimento estérico para el crecimiento de grano ($D_1 \rightarrow \infty$), que es el caso de las soluciones o al comienzo de la recristalización cuando $1/D_1 \ll 1/D$ (Feltham, 1957).

La integración de la Ec. (69) conduce a la siguiente expresión:

$$\ln \left(\frac{D_1 - D_0}{D_1 - D} \right) + \frac{1}{D_1} (D_0 - D) = \frac{k'}{D_1^2} t \quad (70)$$

siendo D_1 : diámetro límite; D_0 : diámetro inicial a $t = 0$;

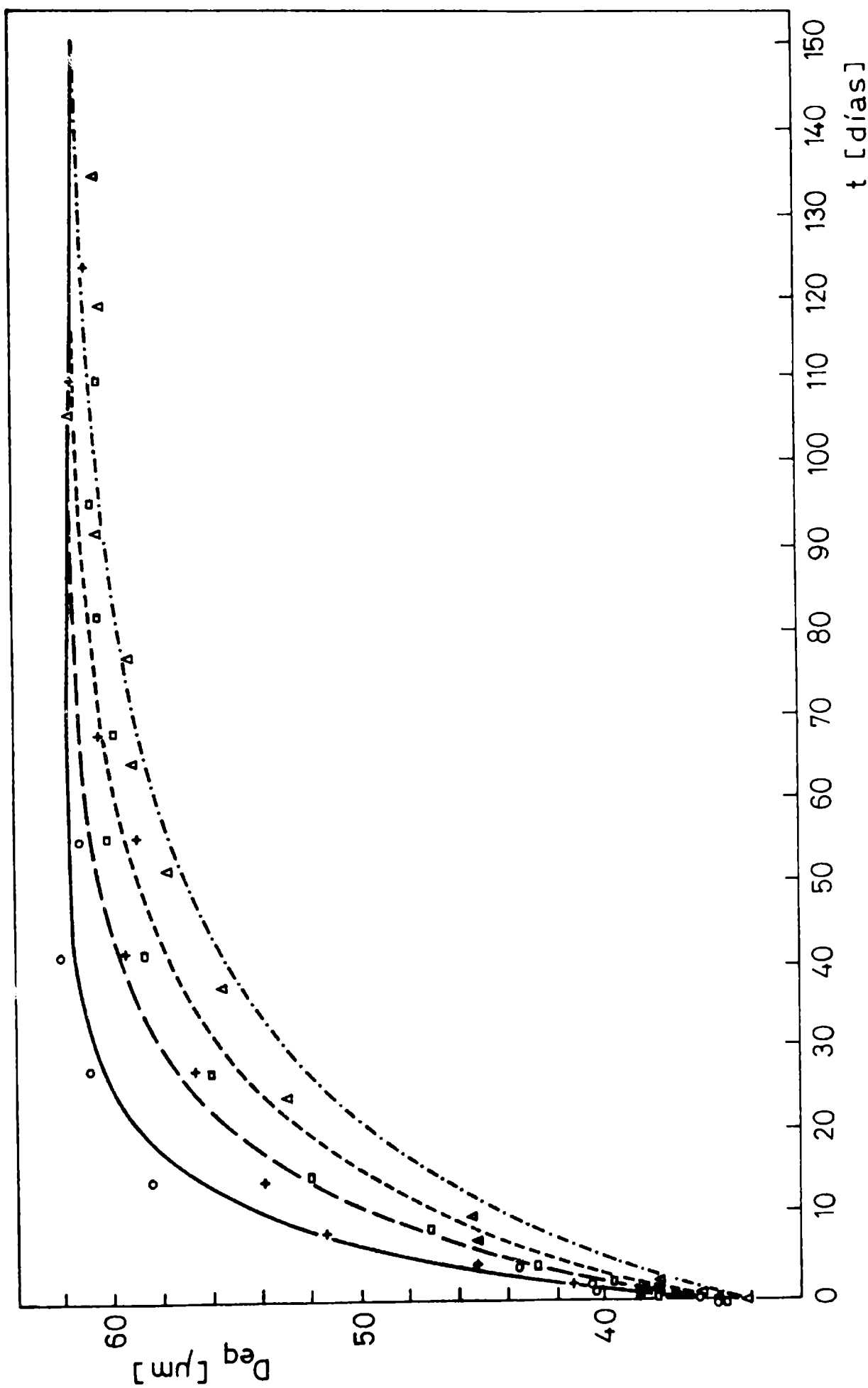


Figura 30: Efecto de la recristalización en tejido cárnico sobre el diámetro equivalente medio a distintas temperaturas de almacenamiento (desviación estándar máxima del D_{eq} $S_D = 3,22 \mu\text{m}$) — modelo cinético y \circ datos experimentales a -5°C ; --- modelo cinético y $+$ datos experimentales a -10°C ; - - - modelo cinético y \square datos experimentales a -15°C ; - · - · - modelo cinético y Δ datos experimentales a -20°C .

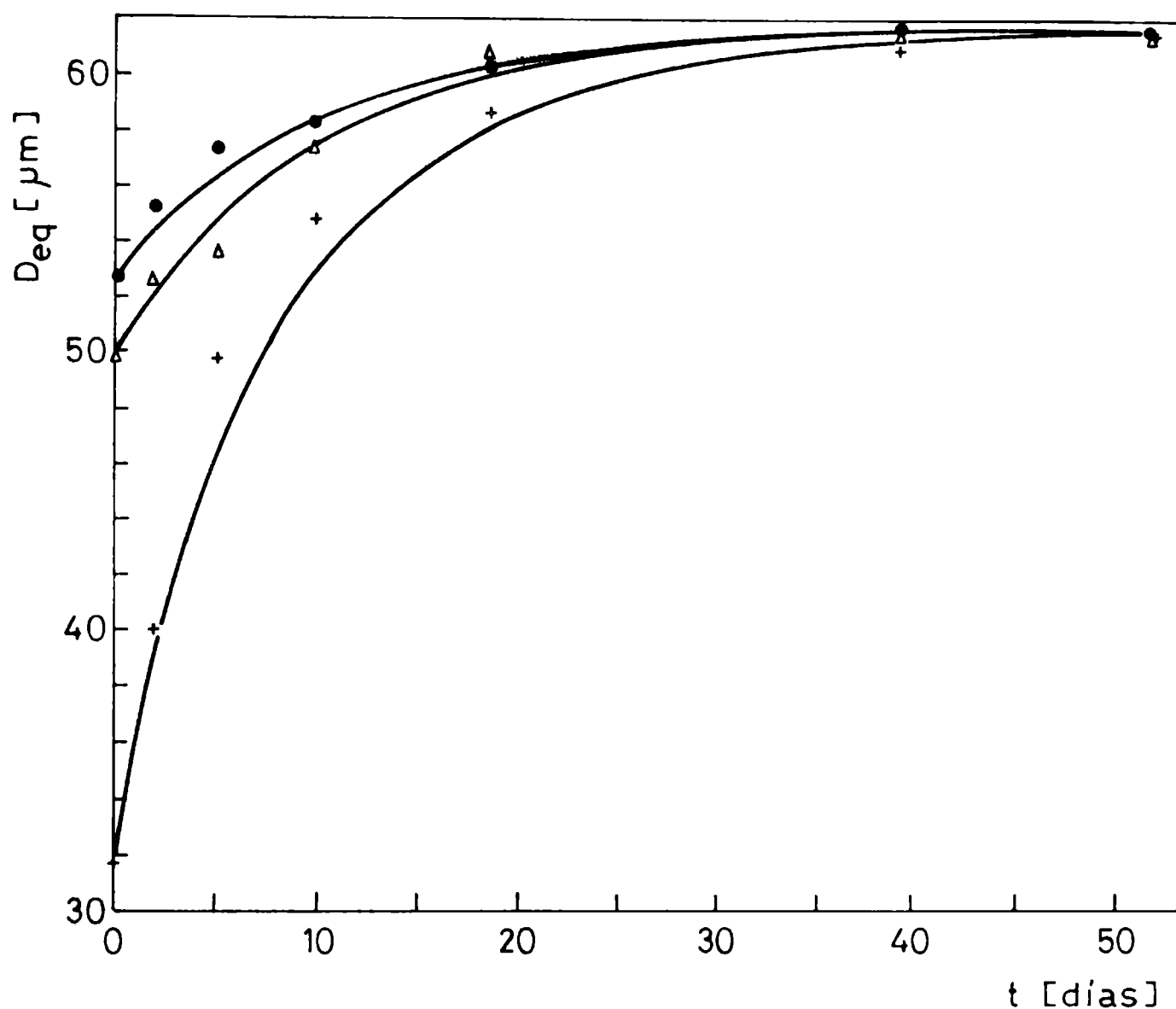


Figura 31: Efecto de la recristalización en tejido cárnico sobre el diámetro equivalente medio durante una experiencia de almacenamiento a -5°C con distintos diámetros iniciales (D_0). Las curvas representan los modelos cinéticos correspondientes a los datos experimentales: \circ $D_0 = 52,89 \pm 2,48 \mu\text{m}$; Δ $D_0 = 49,98 \pm 2,31 \mu\text{m}$ y $+$ $D_0 = 31,87 \pm 1,51 \mu\text{m}$ (desviación standard máxima de D_{eq} $S_{\bar{D}} = 2,69$).

D: diámetro equivalente medio a tiempo t y k' : constante cinética de recristalización para tejido cárneo.

Este tipo de análisis también ha sido aplicado a sistemas cerámicos y metálicos con inclusiones (Burke y Turnbull, 1952; Feltham, 1957; Bolling y Winegard, 1958; Kingery, 1960a; Burke, 1966; Brook, 1976). En estos sistemas se ha observado que a medida que el tamaño cristalino aumenta, al progresar el crecimiento de grano, la fuerza impulsora disminuye hasta que, en cierto momento, se detiene el crecimiento debido al efecto inhibitorio de las inclusiones, alcanzándose un tamaño cristalino estable (Beck, 1954). A partir del análisis bibliográfico, puede establecerse un paralelismo entre una segunda fase dispersa o impurezas en aleaciones metálicas, la porosidad en cerámicos y las fibras en miosistemas.

En lo que respecta a tejidos cárneos, aunque no se lo exprese en los mismos términos, pueden hallarse evidencias de observaciones de diámetros límites. Love (1966b) hace mención a un trabajo de otros autores, donde se destaca la aparente estabilidad alcanzada por el sistema cristalino en músculo bovino almacenado durante un año a -12°C . Similares resultados fueron observados por Goma y Biro (1970) al realizar observaciones histológicas sobre carne vacuna a distintas temperaturas entre 3 y 6 meses de almacenamiento. Esta constancia en la estructura tisular podría atribuirse a que se hubiera alcanzado el diámetro límite en el sistema. Coincidentemente, resulta significativa la experiencia de Gerrits y Jansonius (1975), quienes al practicar estudios sobre recristalización en músculo semitendinoso de pollo no lograban distinguir diferencias significativas en el tamaño cristalino una vez establecidos, lo que ellos denominaron "plates", grandes cristales extracelulares.

4.2.1. Influencia de la temperatura en la cinética de recristalización

Los valores experimentales de diámetro medio equivalente en función del tiempo, correspondientes a las distintas temperaturas de almacenamiento, se representaron en la Fig. 30, siendo los diámetros iniciales prácticamente iguales.

Es de destacar la independencia del diámetro límite respecto a la temperatura de almacenamiento, poniéndose de manifiesto además, que el efecto de la temperatura sobre la velocidad de recristalización, resulta relevante a tiempos menores que t_1 .

En la Fig. 30 se encuentran representadas también las curvas que interpretan el modelo cinético propuesto en la Ec. (70).

Las constantes cinéticas correspondientes a cada temperatura fueron obtenidas empleando el programa SYSTAT en una computadora IBM P.C., XT. El SYSTAT utiliza para regresionar los datos experimentales el método Quasi Newton, a partir de la primera y segunda derivadas de la ecuación. y el Simplex, que calcula la ecuación en un punto iterativamente hasta encontrar la mínima diferencia. Para los cálculos se emplearon los diámetros iniciales hallados experimentalmente para cada temperatura y para el diámetro límite el valor máximo registrado, siendo D_1 : 62 μm .

En la Tabla IX se presentan las constantes cinéticas halladas para cada temperatura.

Tabla XI: Constantes cinéticas de recristalización en tejido cartilago

T (°C)	$k' \left(\frac{\mu\text{m}^2}{\text{día}} \right)$
- 5	339,40 \pm 47,17
- 10	200,34 \pm 20,50
- 15	142,45 \pm 7,17
- 20	107,39 \pm 16,40

4.2.2. Influencia del diámetro inicial en la cinética de recristalización

Las experiencias conducidas a distintas velocidades de congelación y una misma temperatura de almacenamiento permitieron corroborar la funcionalidad, respecto del diámetro inicial (D_0), propuesta en la Ec. (70).

En la Fig. 31, correspondiente a un almacenamiento a -5°C , se presenta el ajuste de los datos experimentales a las curvas cinéticas correspondientes a distintos diámetros iniciales, donde puede observarse la constancia del valor del diámetro límite, ahora con respecto a D_0 .

La Fig. 32 confirma la validez del modelo cinético, en una forma alternativa. En ella se ha representado el primer miembro de la Ec. (70) en función del tiempo. Este tratamiento de los datos experimentales permite independizarse del D_0 , interpretando en una única recta, que pasa por el origen, las distintas experiencias a una dada temperatura. La pendiente de la recta, obtenida por cuadrados mínimos (Volk, 1958), es la constante cinética (k') a esa temperatura, siendo el valor hallado en este caso $k'_{-5^{\circ}\text{C}} = 381,84 \pm 12,41 \mu\text{m}^2/\text{día}$, que no difiere significativamente del hallado con el programa Systat.

4.2.3. Determinación de la energía de activación del fenómeno de recristalización en tejidos cárneos

La energía de activación ($E'a$) se determinó con los valores de las constantes cinéticas de la Tabla IX, por el método de Arrhenius (Fig. 33), aplicando cuadrados mínimos a la siguiente ecuación:

$$\ln k' = \ln k_0' - \frac{E'a}{RT} \quad (71)$$

siendo k_0' : factor pre-exponencial, R: la constante de los gases y T: la temperatura absoluta (Fig. 33).

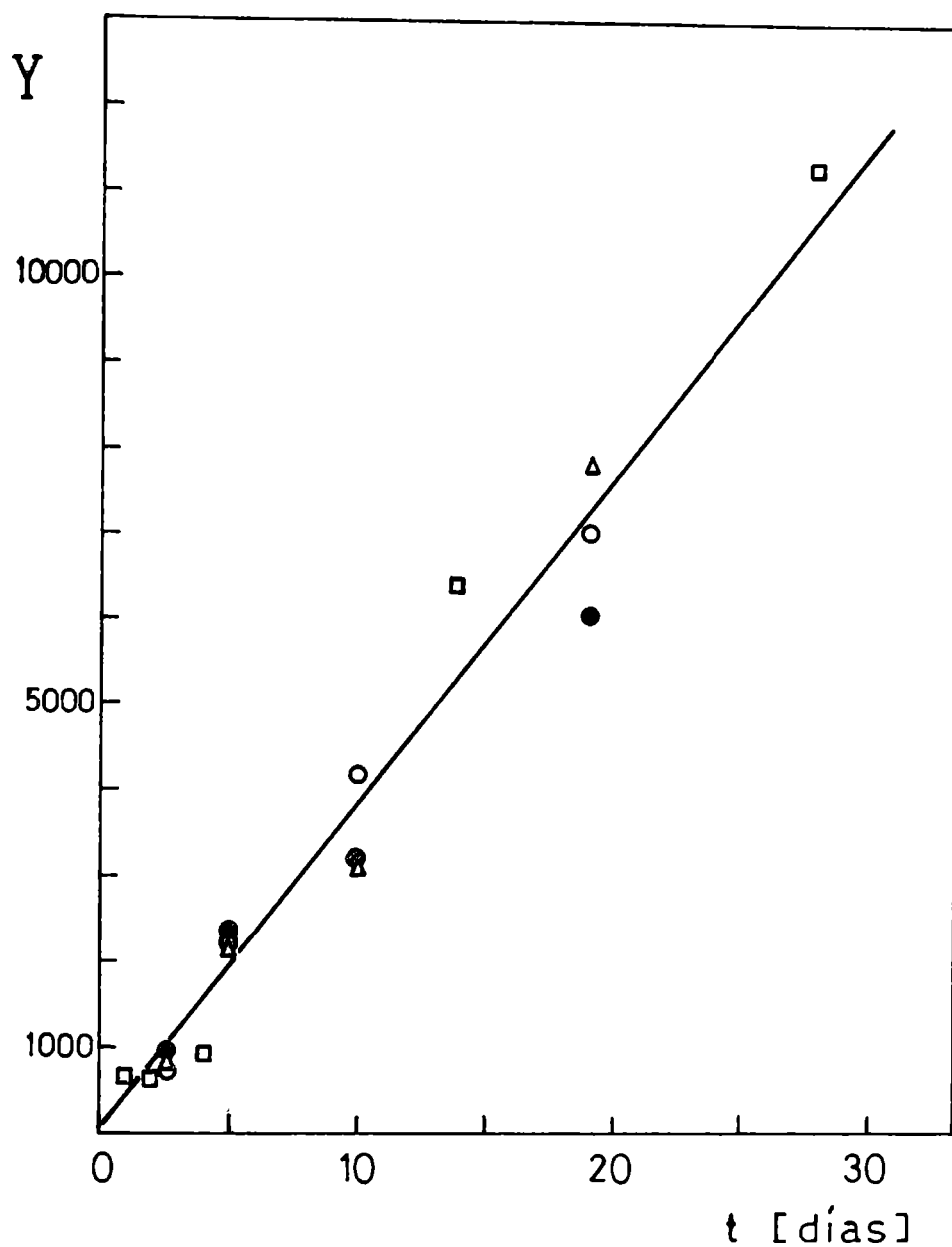


Figura 32: Representación de la cinética de recrystalización de tejidos cárneos almacenados a -5°C . Los datos experimentales corresponden a: ● $D_0 = 52,89 \pm 2,48 \mu\text{m}$; ▲ $D_0 = 49,98 \pm 2,31 \mu\text{m}$; ■ $D_0^{\circ} = 34,45 \pm 2,06 \mu\text{m}$; ○ $D_0^{\circ} = 31,87 \pm 1,51 \mu\text{m}$ y donde:

$$Y = D_1 \left[D_1 \ln \left(\frac{D_1 - D_0}{D_1 - D} \right) + D_0 - D \right] (\mu\text{m}^2)$$

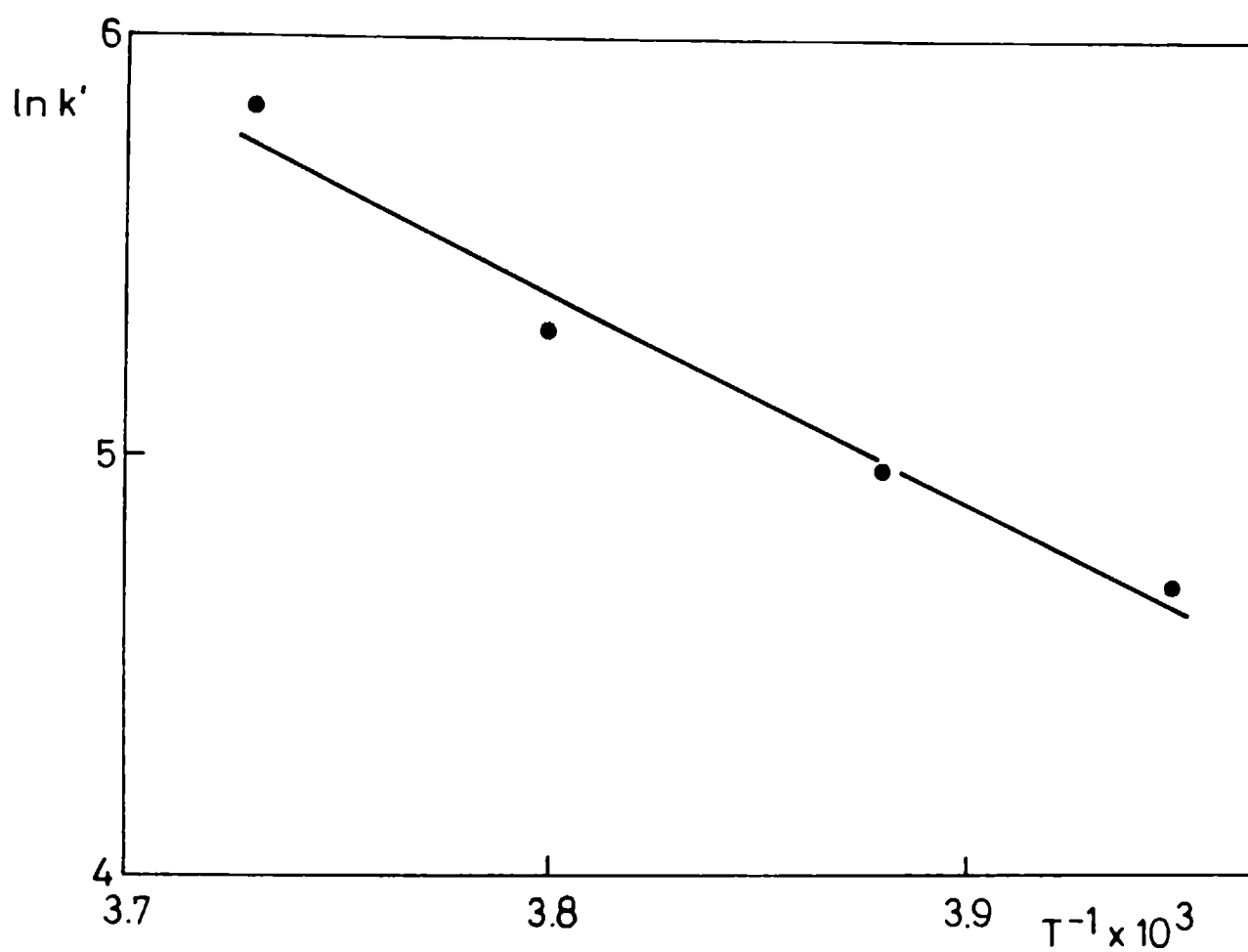


Figura 33: Efecto de la temperatura sobre la constante cinética (k') de recristalización en tejidos cárneos.

Obteniéndose: $Ea' = 42,37 \pm 4,75 \times 10^3$ Joule/mol

$$\ln k_o' = 24,78 \pm 2,20$$

El valor hallado resulta comparable con el obtenido por Bevilacqua y Zaritzky (1982) de $43,5 \times 10^3$ Joule/mol. Es de destacar que la ecuación empleada en el trabajo mencionado (Ec.(65)) ajusta los datos experimentales para períodos cortos (1 semana), ya que no es marcada aún la tendencia a alcanzar el valor límite para el diámetro cristalino medio. Sin embargo, datos correspondientes a tiempos de almacenamiento mayores se apartan de la linealidad al representar $(D^2 - D_o^2)$ vs t.

La magnitud de la energía de activación para la recristalización es del orden de las correspondientes a la de transferencia de una molécula de agua desde la fase líquida a la sólida y a la de autodifusión. Hallet (1968) estimó esta última a partir de datos de viscosidad, entre $22,30 \times 10^3$ Joule/mol a 0°C y $66,20 \times 10^3$ Joule/mol a -130°C . Asimismo, Hobbs (1974) informó valores de energía de activación de autodifusión volumétrica entre $52,02$ y $65,37 \times 10^3$ Joule/mol, obtenidos por distintos autores.

La comparación puede extenderse a valores de energía de activación para pérdidas de calidad de carnes vacunas congeladas, basados en características sensoriales. El valor obtenido por Rodríguez y Zaritzky (1983) es de $39,50 \times 10^3$ Joule/mol, calculado a partir de tiempos de vida útil que surgen de curvas tolerancia-tiempo-temperatura (International Institute of Refrigeration, 1964; Jul, 1969)

4.2.4. Estimación teórica del diámetro límite

El valor medio de diámetro cristalino máximo de hielo (D_1) utilizado en la regresión de la ecuación cinética fue obtenido a través de datos experimentales de recristalización durante períodos prolongados. Sin embargo, resultaría de gran utilidad

predecir teóricamente dicho valor con el objeto de extender su aplicación a otros sistemas alimenticios:

Al respecto, en estudios realizados con materiales cerámicos y metálicos, varios autores se valieron de la fórmula aproximada deducida por Zenner, donde se expresa en forma sencilla la relación entre el diámetro límite, el diámetro medio de las inclusiones (\bar{d}) y la fracción volumétrica (f_d) de éstas (Burke y Turnbull, 1952; Bolling y Winegard, 1958; Kingery, 1960a; Burke, 1966; Cottrell, 1968; Brook, 1976), de acuerdo con:

$$D_1 = \frac{\bar{d}}{f_d} \quad (72)$$

En el caso de tejido cárneo, si las fibras son consideradas como inclusiones dentro de la estructura cristalina del hielo, puede utilizarse la Ec.(72) para calcular el diámetro límite de los cristales de hielo.

Para realizar los cálculos se utilizaron micrografías de cortes transversales de muestras de tejido fresco y almacenado a -5, -10, -15 y -20°C. Se supuso un modelo simplificado de fibras cilíndricas de longitud l_f y diámetro equivalente (d_{f_i}) (diámetro que corresponde al círculo de igual área que la fibra medida). Estas mediciones permitieron obtener el área ocupada por las fibras y el diámetro equivalente de fibras medio.

La fracción volumétrica fue calculada según:

$$f_{\text{fibra}} = \frac{\pi/4 (n_i d_{f_i}^2) \cdot l_f}{A_T l_f} \quad (73)$$

siendo n_i el número de fibras con diámetro equivalente de fibra d_{f_i} y A_T el área total analizada.

Como l_f se cancela en la Ec. (73) la fracción volumétrica queda expresada en términos de áreas.

La Tabla X presenta los valores promedios de \bar{d}_f y f_{fibra}

obtenidos a partir de varias micrografías, tomadas a tiempos prolongados de almacenamiento para las cuales se observaba constancia en el diámetro medio de hielo.

Tabla X: Relación entre el diámetro medio de fibra y su fracción volumétrica

Temperatura de almacenamiento	Diámetro medio de fibra (\bar{d}_f) en μm	Fracción volumétrica de fibra (f_{fibra})	$\bar{d}_f/f_{\text{fibra}}$
fresco	43,68 \pm 1,66	0,70	62,40
-5°C	32,84 \pm 2,17	0,64	62,25
-10°C	35,13 \pm 2,34	0,57	61,70
-15°C	32,56 \pm 1,53	0,54	60,30
-20°C	30,74 \pm 1,29	0,50	61,48

Tanto la disminución del diámetro de fibra como de la fracción volumétrica con la temperatura de almacenamiento, interpretan la deshidratación que sufren las fibras al aumentar el contenido de hielo extracelular.

Si se asume como diámetro límite aquél que surge al promediar los $\bar{d}_f/f_{\text{fibra}}$ de la Tabla X, se obtiene D_1 calculado = 61,63 \pm 0,83 μm . Este valor resulta prácticamente coincidente con el hallado al promediar los datos experimentales de diámetros límites de hielo, siendo D_1 experimental = 61,00 \pm 0,70 μm .

Los resultados obtenidos demuestran que el valor de D_1 sólo depende de la estructura tisular y permite extender este criterio al cálculo de diámetros límites de otros tejidos.

4.2.5. Cálculo del tiempo requerido para alcanzar el diámetro límite

Con el objeto de evaluar, para distintas condiciones de

D_0 y temperaturas de almacenamiento, los períodos en que el fenómeno de recristalización tiene mayor efecto, se estimó en forma teórica a partir de la Ec. (70) el tiempo necesario para alcanzar un valor de diámetro cristalino levemente inferior al diámetro límite. Se fijó para el diámetro (D) mencionado un valor de $60 \mu\text{m}$ (no difiere en más de 3% del D_1 determinado) y se variaron los D_0 . Las constantes cinéticas a las distintas temperaturas se determinaron a través de la ecuación de Arrhenius (Ec. (71)), utilizando los datos de energía de activación y factor pre-exponencial obtenidos en la sección 4.2.3.; de esta manera se obtuvieron las curvas de la Fig. 34 para las temperaturas ensayadas.

La Fig. 31 aporta la confirmación experimental, pudiéndose observar que cuanto mayor es el D_0 menor es el tiempo necesario para obtener el D_1 . Un diámetro de $60 \mu\text{m}$ fue alcanzado a 25 días partiendo de un D_0 de $31,87 \pm 1,51 \mu\text{m}$, a 19 días con $D_0 = 49,98 \pm 2,31 \mu\text{m}$ y a 16 días con $D_0 = 52,89 \pm 2,48 \mu\text{m}$.

Otra justificación experimental puede hallarse en el trabajo realizado por Gerrits y Jansonius (1975) donde el estado de agregados extracelulares ("plates"), comparable con el D_1 , era alcanzado en menos tiempo por las muestras con tamaño cristalino inicial mayor, para igual temperatura de almacenamiento.

4.2.6. Modificaciones estructurales del tejido cárneo como consecuencia de oscilaciones térmicas durante el almacenamiento congelado

Las micrografías de la Fig. 35 permiten observar en forma comparativa, con relación a cortes histológicos de muestras almacenadas a temperatura constante, el mayor deterioro sufrido por el tejido sometido ya sea a ascensos o descensos de temperatura durante el almacenamiento congelado.

Cuantitativamente se hallaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los D_{medios} de los huecos dejados por el hielo

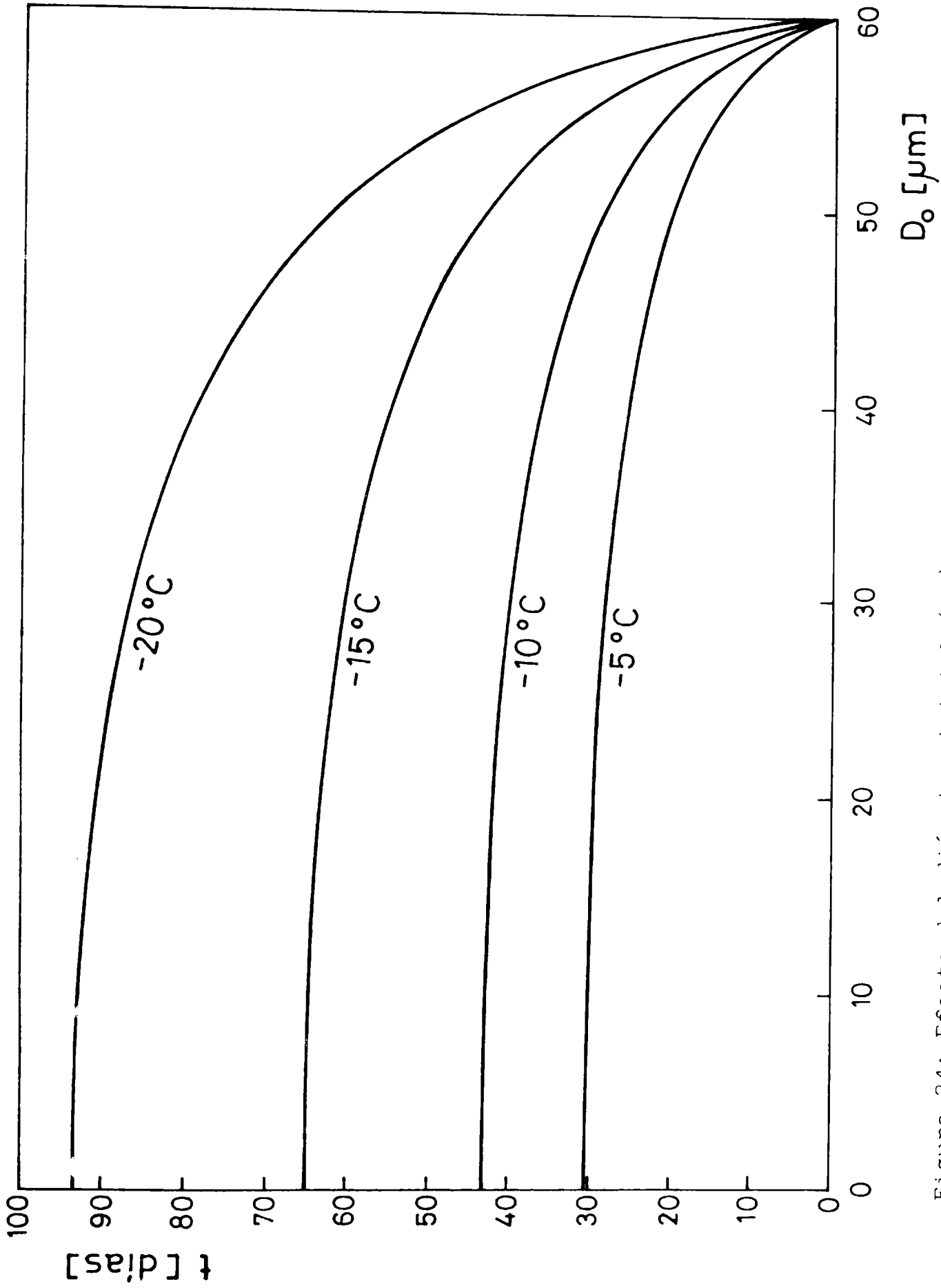
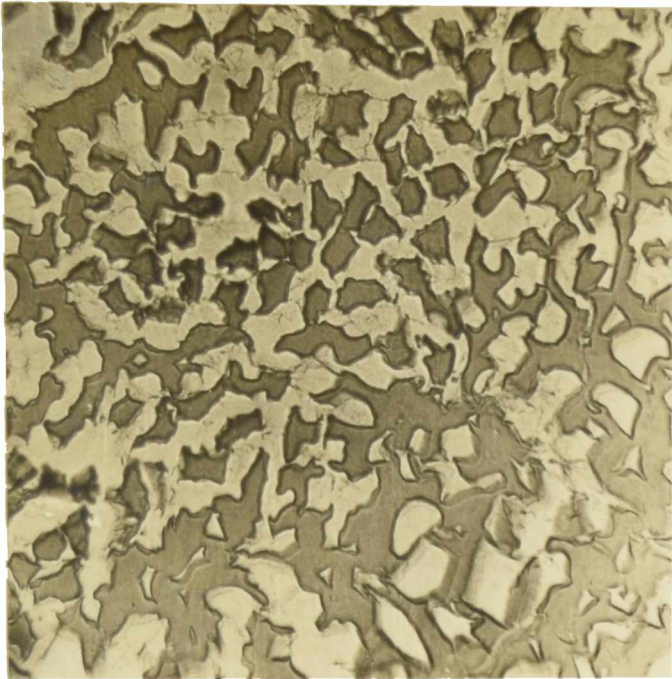
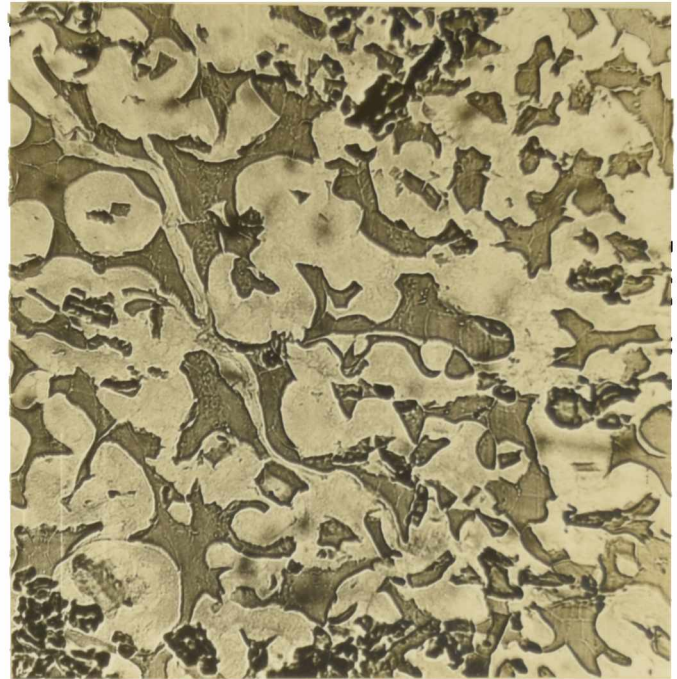


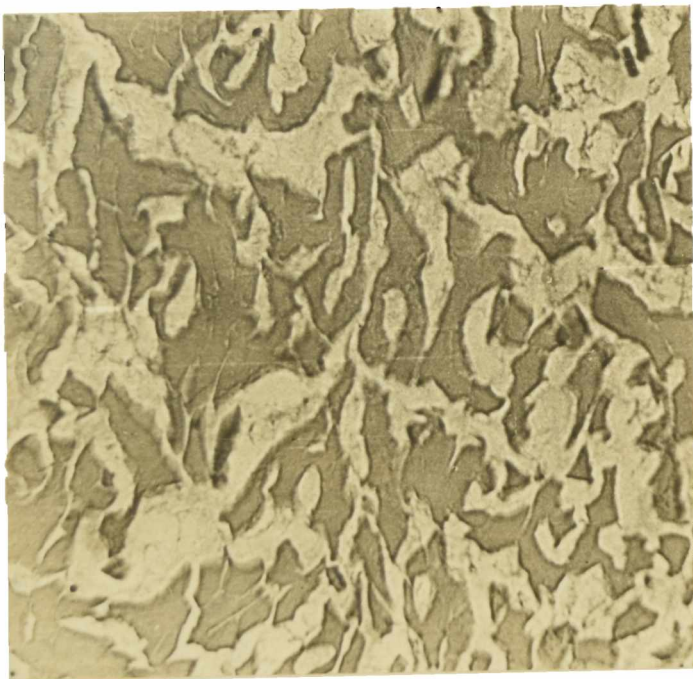
Figura 34: Efecto del diámetro inicial (D_0) sobre el tiempo necesario para alcanzar un diámetro de $60 \mu\text{m}$ próximo al diámetro límite de músculo semitendinoso bovino a distintas temperaturas.



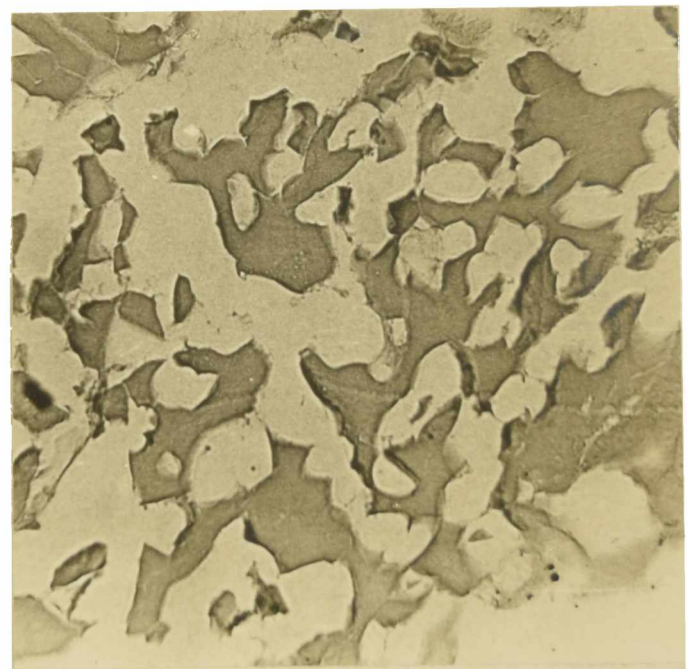
a



b



c



d

100 μ m

Figura 35: Cortes histológicos de muestras cárneas con geladas sometidas a distintos tratamientos de almacenamiento. a) 18 días a -20°C ; b) 7 días a -20°C , 7 días a -10°C y 4 días a -20°C ; c) 18 días a -10°C y d) 7 días a -10°C , 7 días a -20°C y 4 días a -10°C .

en muestras almacenadas el mismo tiempo, unas a temperatura constante y otras sometidas a oscilaciones de tipo onda cuadrada. Estos resultados fueron obtenidos a través de un ensayo de diferencia de medias con el estadístico t student.

La Tabla XI presenta los diámetros medios correspondientes a las micrografías de la Fig. 35.

Tabla XI: Aumento del diámetro medio debido a oscilaciones térmicas durante el almacenamiento congelado

Historia térmica	D (μm)
a) 18 días a -20°C	$45,39 \pm 2,57$
b) 7 días a -20°C 7 días a -10°C 4 días a -20°C	$62,00 \pm 5,19$
c) 18 días a -10°C	$49,00 \pm 3,74$
d) 7 días a -10°C 7 días a -20°C 4 días a -10°C	$61,36 \pm 1,61$

Los estadísticos $t_{\text{exp.}}$ fueron calculados con la diferencia entre los diámetros equivalentes medios que presentan igual fracción de agua congelada y la estima de la desviación standard combinada correspondiente. El $t_{\text{teór.}}$ para una probabilidad de 0,05 fue extraído de tablas (Himmelblau, 1970). Los valores obtenidos al comparar los casos (a) y (b) de la Tabla XI son $t_{\text{exp.}} = 6,32$ y $t_{\text{teór.}} = 1,98$ y para los casos (c) y (d) resultaron $t_{\text{exp.}} = 3,4$ y $t_{\text{teór.}} = 2$. Como los $t_{\text{exp.}}$ son mayores que los $t_{\text{teór.}}$ puede afirmarse que los diámetros medios de las muestras almacenadas bajo oscilaciones térmicas son significativamente mayores que los diámetros de las muestras que permanecieron a temperatura constante, con un nivel de significación de 0,05.

Por lo expuesto y del análisis realizado en la sección 2.3.4. puede inferirse que cualquiera sea el tipo de alteración térmica que sufran las muestras, éstas resultan perjudicadas. Este efecto se intensifica, en tejidos debido a la existencia de fibras que actúan como barreras para el libre desplazamiento del agua.

Tratándose de un ascenso de temperatura, disminuye la fracción de agua congelada y dada una distribución de tamaños cristalinicos funden preferentemente los cristales de menor tamaño por tener menor temperatura de fusión (Ec. (56)), conduciendo al aumento del diámetro medio. Una vez que se alcanza el equilibrio en cuanto a la cantidad de hielo y mientras la temperatura permanece constante, tiene lugar la recristalización, cuya velocidad es tanto mayor cuanto más elevado es el nivel térmico.

Ambos fenómenos conducen a un aumento del diámetro medio y a través de éste a un mayor deterioro de la estructura tisular.

El agua generada por el proceso de fusión durante un ascenso de temperatura no ingresa completamente a las fibras. Esto puede deberse a que los procesos difusionales disminuyen su velocidad a bajas temperaturas y a alteraciones en la permeabilidad de las membranas.

Por otro lado, al producirse un descenso de temperatura, el agua que congela, necesaria para satisfacer la condición de equilibrio, se deposita en forma preferencial sobre los cristales de mayor tamaño, debido a su estado energético más estable. Esto contribuye al deterioro físico del tejido a través del aumento del diámetro medio.

Las modificaciones que el descenso de temperatura ocasionen al tejido dependen de la fuente que provea el agua a congelar. El agua puede provenir del espacio extracelular, de solución en equilibrio, puede ser agua remanente de un ascenso de temperatura que las fibras no reabsorbieron o agua intracelular.

De tratarse de este último caso, al deterioro físico se le suma el problema de deshidratación de fibras con implicancias en la desnaturalización de proteínas miofibrilares que será objeto de análisis en la siguiente sección.

Los procesos descritos se producen cualquiera sea el nivel térmico antes y después del salto de temperatura; sin embargo, la magnitud en que resulte afectado el tejido dependerá fuertemente de la diferencia de temperaturas involucradas a través de la curva de fracción de agua congelada, de las velocidades de recristalización, del tiempo que permanezca a cada temperatura, de los ciclos térmicos y del tamaño de la pieza cárnea.

Schwimmer y col. (1955) calcularon temperaturas efectivas para distintos ciclos térmicos, onda triangular, cuadrada y sinusoidal. La mayor temperatura efectiva la proporcionaba la onda cuadrada, ya que esta función hacía que las muestras permanecieran más tiempo a la temperatura más elevada.

No obstante, a través de la cinética de recristalización (Ec. (70)) propuesta en el presente trabajo, las oscilaciones térmicas revestirán mayor importancia cuanto más difiera el diámetro medio de la distribución cristalina del diámetro límite correspondiente.

El concepto de fluctuación térmica puede extenderse al hecho de congelar piezas cárneas a temperaturas muy por debajo de la de almacenamiento, práctica común en frigoríficos. En estos procedimientos no solo se desvirtúan las posibles ventajas de una congelación rápida sino que se invierte energía adicional en alcanzar niveles térmicos bajos cuando sería más racional congelar las piezas hasta la temperatura a la cual serán almacenadas y evitar deterioros ocasionados por bajas temperaturas de congelación y posteriores ascensos de éstas. Por su parte, Winger (1932) y Jul (1984) pusieron de manifiesto la relevancia del rango de temperaturas entre la final de congelación y la de almacenamiento, en cuanto a la calidad final del producto. Love (1966a)

observó menor deterioro proteico en muestras de pescado congelado a -3°C que a -30°C luego de iguales períodos de almacenamiento a $-1,6^{\circ}\text{C}$, atribuyendo este hecho al daño ocasionado a las proteínas al extraerles el agua ligada durante la congelación a bajas temperaturas ya que el posterior aumento de temperatura ya no revierte la situación; Connell (1968) puntualiza el mismo hecho. Asimismo, Ouali y col. (1983) al estudiar desnaturalización de extractos miofibrilares de carne vacuna, destacaron el efecto antagónico que existe entre velocidades de congelación rápida que conduce a pequeños tamaños cristalinos y bajas temperaturas finales de congelación que generan mayor fracción de agua congelada.

4.2.7. Efecto de la recristalización en la desnaturalización de las proteínas miofibrilares en tejidos cárneos

Sin duda la causa más importante en la alteración proteica de la carne congelada es la interacción de las proteínas con la estructura en la que se encuentran, ya sea durante la congelación como durante el almacenamiento. En este último proceso tiene lugar la recristalización del hielo que a pesar de no implicar cambios en la fracción de agua congelada, influye en la desnaturalización proteica y principalmente en el inicio del proceso.

Existen datos experimentales que lo confirman. Tal es el caso de Wagner y Añón (1986a), quienes realizaron estudios de desnaturalización de proteínas miofibrilares durante el almacenamiento de carne vacuna congelada, a través de la pérdida de actividad ATPásica en presencia de iones Ca^{++} y Mg^{++} . Estos autores proponen una cinética de desnaturalización en dos etapas, siendo la energía de activación correspondiente a una velocidad de congelación lenta (que conduce a una estructura cristalina extracelular para el hielo) de $44,73 \times 10^3$ Joule/mol y de $36,28 \times 10^3$ Joule/mol, respectivamente.

La energía de activación de la primera etapa es comparable con la hallada en el presente trabajo para la recristalización, pudiéndose deducir que la recristalización es al menos una causa importante en esta etapa de la desnaturalización proteica. Asimismo, Wagner (1986) señaló que el cambio de mecanismo se producía a 2, 6 y 13 semanas a temperaturas de almacenamiento de -5 , -10 y -20°C respectivamente.

A partir del tiempo característico de congelación ($t_c = 60$ min) correspondiente a la experiencia antes mencionada (Wagner, 1986) y la ecuación que vincula el t_c con el diámetro inicial propuesta por Bevilacqua y col. (1979) para -20°C , se estimó un $D_o = 33,38 \mu\text{m}$. Al introducir este valor en el gráfico que relaciona el D_o con el tiempo necesario para alcanzar el D_1 (Fig. 34) se obtuvieron valores de 28, 40 y 86 días para -5 , -10 y -20°C respectivamente, cercanos a los tiempos en que cambia el mecanismo de desnaturalización proteica. La discrepancia hallada a -5°C puede atribuirse al hecho que en el trabajo de Wagner (1986) las muestras fueron congeladas hasta -25°C y posteriormente almacenadas a una temperatura superior (-5°C), sufriendo un incremento del diámetro medio cristalino (D_o) que conduciría de acuerdo a la Fig. 34 a un t_1 menor, más cercano a las dos semanas.

Reid y col. (1985) realizaron estudios histológicos en pescado, tendientes a explicar cambios bioquímicos como desnaturalización proteica, capacidad de retención de agua, etc. producidos durante el almacenamiento. También Matsumoto (1979) relacionó la recristalización con la desnaturalización de la actomiosina en pescado y propuso dos etapas para la desnaturalización de la miosina, destacando el efecto negativo de las oscilaciones térmicas al acelerar la disminución de la calidad sensorial de la carne y de la solubilidad de la actomiosina a través del aumento de tamaño cristalino del hielo.

Comúnmente se acepta que cuanto más baja es la temperatura

de almacenamiento menor es la velocidad de desnaturalización, sin embargo existen ciertas evidencias experimentales donde los semicongelados presentan menor deterioro proteico que muestras a temperaturas de almacenamiento inferiores (Love, 1966a; Matsumoto, 1979; Uchiyama, 1979; Aleman y col., 1982). Evidentemente, este comportamiento debe atribuirse al bajo contenido de hielo de estos productos y por lo tanto mínima deshidratación proteica.

Otro aspecto a considerar es la relación del exudado con la desnaturalización proteica y por medio de ésta con la congelación y recristalización. La formación y modificación de cristales de hielo conducen a una redistribución del agua que afecta su reingreso a los sitios originales (rehidratación proteica, capacidad de retención de agua) resultando en la eliminación de agua del tejido como exudado (Matsumoto, 1979; Connell, 1968). También la permeabilidad de las membranas se ve alterada a través de sus proteínas (Heber y col., 1979; Levitt, 1979; Shenouda, 1980).

La particular estructura proteica resulta sensiblemente afectada por la deshidratación y el aumento de fuerza iónica, siendo generalmente aceptado que la estabilidad de su conformación nativa se debe a la tendencia de los grupos hidrofóbicos a ubicarse hacia el interior de la molécula (Connell, 1968; Matsumoto, 1979; Shenouda, 1980).

Distintos modelos postulan la existencia de varias categorías de moléculas de agua asociadas a las proteínas, diferenciándolas por su estado "estructural", movilidad y fuerza de interacción con las proteínas. Sin embargo, toda clasificación resulta una simplificación puesto que los cambios son graduales. No obstante, pueden citarse: el agua ligada cuyas moléculas unidas estequiométricamente a sitios cargados o polares resultan fuertemente asociadas a las proteínas, de poca movilidad y de difícil remoción. El agua superficial, adyacente a la estructura proteica, está unida por puentes hidrógeno y presentan movilidad relativa,

y el agua de hidratación, no considerada por algunos autores, presenta una movilidad intermedia entre el agua del hielo y la de la solución a la misma temperatura (Love, 1966b; Berlin y col., 1970; Kuntz, 1979; Taborsky, 1979).

La esfera de hidratación que rodea las proteínas, les confiere estabilidad a la estructura tridimensional, siendo fuertemente dependiente de la red de uniones hidrógeno. Por lo tanto, cualquier modificación del medio que provoque deshidratación (migración de agua asociada a proteínas para formar cristales) o reordenamiento (recristalización), resultará en una interrupción del sistema de uniones por puente de hidrógeno y como consecuencia en la exposición de zonas hidrofóbicas o hidrofílicas, dejando regiones desprotegidas y vulnerables. Esto favorece las interacciones intramoleculares, causando alteraciones en la estructura tridimensional, o intermoleculares, induciendo a interacciones proteína-proteína y finalmente a agregación (Taborsky, 1979; Shenouda, 1980).

El otro aspecto de la presencia de cristales de hielo es el aumento del efecto salino que interviene en las uniones donde participan fuerzas secundarias o débiles (iónicas, de Van der Waals, de puente de hidrógeno, hidrofóbicas) que confieren estabilidad a las configuraciones terciarias y cuaternarias de las proteínas macromoleculares. La estabilidad de este tipo de uniones depende de la constante dieléctrica, la fuerza iónica del medio y del pH. Por lo tanto, el aumento de iones o "ligantes" en la solución remanente introduce una competencia de éstos por las uniones ya existentes y trae como consecuencia la ruptura de algunas de éstas. Al ser perturbadas las fuerzas secundarias, conduce a una mezcla de asociaciones, agregaciones y cambios conformacionales (Partmann, 1977; Taborsky, 1979; Shenouda, 1980).

En relación con las proteínas, Taborsky (1979) destacó la importancia del papel que cumple la interfase hielo-agua en la acumulación de solutos y propuso la existencia de zonas de

solución atrapadas por cristales de hielo, con gradientes térmicos y de concentración donde se producirían las reacciones con las proteínas.

Estudios realizados con sistemas agua-hielo proponen la existencia de una microestructura con ordenamiento polar en torno a los cristales de hielo para disminuir tensiones en la red cristalina. Esto resulta en el establecimiento de un potencial eléctrico entre las fases sólida y líquida que conduce a la incorporación selectiva de iones a la estructura del hielo, hecho observado experimentalmente, produciéndose como consecuencia, una distribución de concentraciones desde la interfase (Drost-Hansen, 1967; Gross, 1967; Le Febre, 1967). Por su parte, Hoekstra y Miller (1967) evidenciaron experimentalmente la existencia de una capa líquida de transición entre partículas sólidas y el hielo, cuyo espesor depende de los gradientes térmicos generados por la acumulación iónica que deprime el punto de fusión y crea una fuerza impulsora para la difusión de moléculas de agua (Jellinek, 1967; Terwilliger y Dizio, 1970).

Estos conceptos han sido aplicados a la etapa dinámica de la congelación de soluciones en general, e incluso soluciones proteicas; no obstante, pueden ser extendidos a la recristalización de tejidos cárneos. Durante este proceso, cada cristal está rodeado de una cantidad de solución salina con cierto ordenamiento y distribución iónica. Con el transcurso del tiempo al aumentar el tamaño medio cristalino se produce una disminución del número de cristales y en consecuencia del área expuesta por unidad de volumen, por lo tanto, la solución salina irá cambiando su distribución a medida que progrese la recristalización y se acumulará en torno a las fibras, ejerciendo mayor interacción con la estructura proteica, contribuyendo a la desnaturalización. Se puede postular entonces, que una vez establecido el diámetro límite cristalino la subsiguiente desnaturalización proteica obedecerá a otros factores distintos de la recristalización.

4.2.8. Efecto de la recristalización en la producción de exudado

La capacidad de retención de agua de la carne es una propiedad de indudable importancia, ya que influye en el aspecto del producto antes de cocinarlo y en la sensación de jugosidad que produce durante la masticación. La disminución de esta capacidad se manifiesta a través del líquido exudado durante la descongelación.

González-Sanguinetti y col. (1985) al estudiar los efectos de la velocidad de descongelación sobre la producción de exudado de carnes vacunas, propusieron un mecanismo en dos etapas consecutivas de fusión y absorción de agua por las fibras. Por medio de estudios histológicos, observaron acumulación de agua no absorbida en el espacio extracelular, atribuyendo la resistencia de las fibras a la reabsorción de agua a problemas migratorios a través del sarcolema. Asimismo, Heber y col. (1979) reportaron daños mecánicos y alteraciones en las respuestas osmóticas en biomembranas, ocasionados por la formación de hielo y su consecuente aumento de la concentración de solutos. Calvelo (1981), atribuyó la pérdida en la capacidad de retención de agua del tejido también a la acumulación de solutos y su relación con la membrana, pero además a la distorsión del tejido como resultado de la formación de cristales de gran tamaño, extracelulares. Connell (1968) relacionó la producción de exudado de muestras de pescado provenientes de almacenamiento congelado a la baja capacidad de reabsorción de agua de la estructura proteica.

Estudios realizados en el C.I.D.C.A. (Zárate y Zaritzky, 1985) donde se cuantificó el exudado producido en muestras cárneas congeladas y luego almacenadas a distintas temperaturas (-10, -15 y -20°C), demostraron que la mayor proporción de exudado se producía en la etapa inicial y que mayores períodos de almacenamiento no incrementaban significativamente su cantidad.

Dicho exudado provenía de muestras de músculo semitendinoso, 48 horas post-rigor, con valores de pH entre 5,5 y 5,8, de

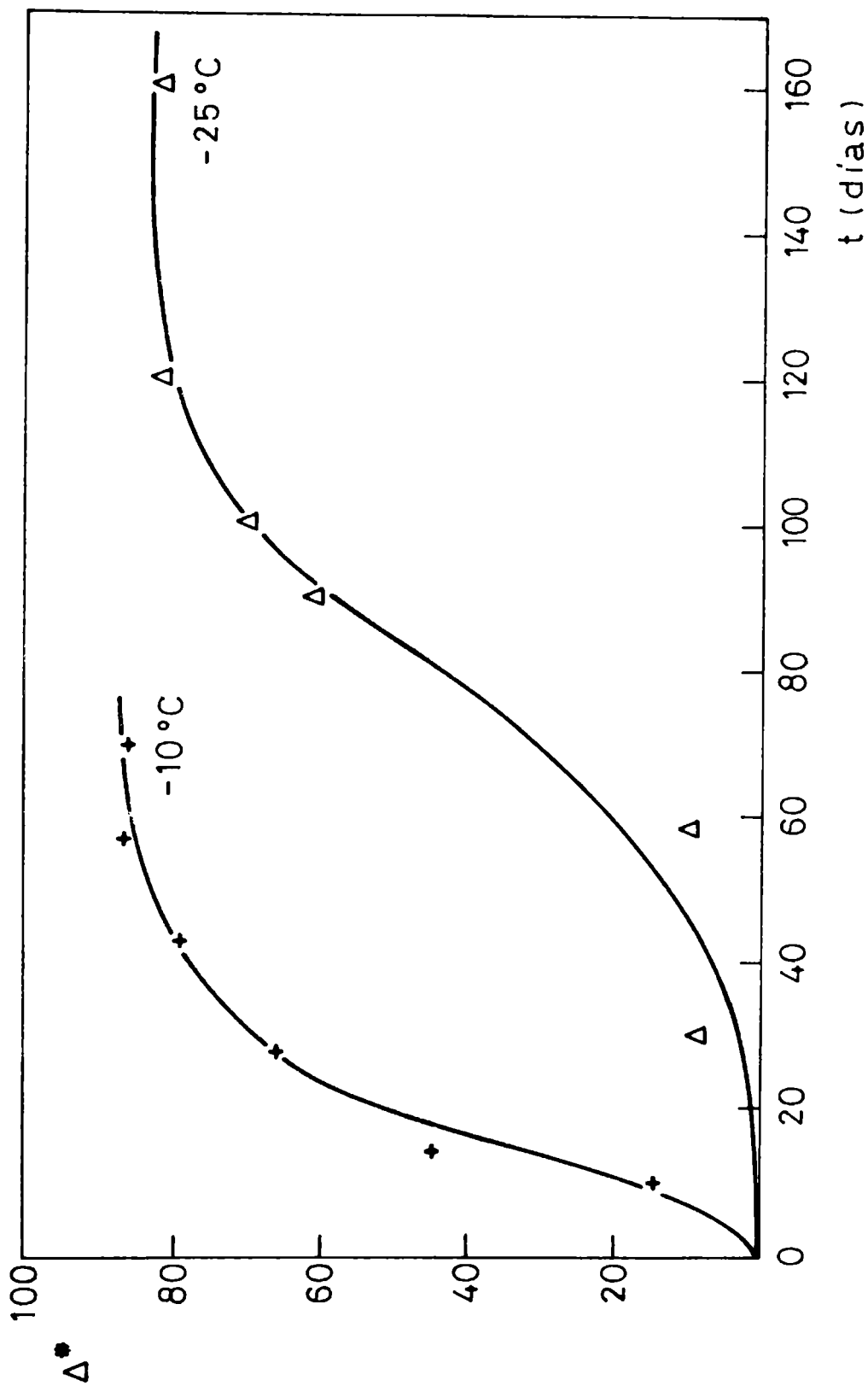


Figura 36: Producción de exudado debido al almacenamiento congelado a -10°C . Δ^* exudado adimensional corresponde al cociente entre el exudado porcentual debido al almacenamiento y el exudado máximo producido (Zárate y Zaritzky, 1985).

5 cm de diámetro y 1,5 cm de espesor, congeladas, almacenadas y descongeladas bajo condiciones standarizadas. Una vez descongeladas, las muestras eran sometidas a presión (1 Kg/cm^2) para obtener el porcentaje de exudado.

La Fig. 36 muestra los resultados experimentales obtenidos como promedio de músculos provenientes de nueve animales almacenados a las dos temperaturas. En ordenadas se representó el exudado adimensional (Δ^*) que corresponde a la relación entre el exudado porcentual debido exclusivamente al almacenamiento (Ex) y el máximo exudado que se produce. El valor de Ex era obtenido según:

$$\text{Ex} = \frac{(M_3 - M_2)}{M_1} \times 100 \quad (74)$$

siendo M_1 : peso inicial de la muestra fresca; M_2 : peso de la muestra congelada y descongelada inmediatamente; M_3 : peso de la muestra congelada, almacenada y descongelada. Con este cálculo se eliminaba el exudado atribuible a la congelación y descongelación.

En la Fig. 36 puede observarse que el 80% del máximo exudado obtenido era producido a 43 días a -10°C y 120 días a -25°C , correspondiente a muestras congeladas con un D_0 del orden de $30 \mu\text{m}$.

Los resultados provenientes de estas experiencias hacen suponer que la recristalización juega un papel importante en estos procesos, pues los tiempos en que se produce la mayor cantidad de exudado son muy próximos a los tiempos en que se alcanza el diámetro límite, 40 días para -10°C y 130 días para -25°C , calculados con la Ec. (70) para un D_0 de $30 \mu\text{m}$, según se indica en la sección 4.2.5. Evidentemente, los procesos de interfase en que interviene la recristalización modifican el entorno de las proteínas y su relación con el agua, generando a nivel macroscópico una mayor producción de exudado.

CAPITULO 5

C O N C L U S I O N E S

- El estudio realizado con solución de NaCl (0,28 N), simuladora de la curva de congelación de tejidos cárneos, ha permitido analizar el comportamiento de los cristales individualmente, por medio de la visualización de la interfase cristalina. Esta metodología aporta aspectos básicos del fenómeno que la técnica histológica utilizada en tejidos cárneos impide analizar.
- La recristalización conduce al aumento de los cristales de mayor tamaño a expensas de los menores, siendo la fuerza impulsora del fenómeno la disminución del área interfacial. Pudo comprobarse que la disminución del número de cristales se debía a la desaparición de los cristales de menor tamaño y que se producía un corrimiento del valor medio de la distribución cristalina con el tiempo, hacia mayores valores.
- La evaluación de las distribuciones de distintos parámetros cristalinos característicos ($D_{\text{máx}}$, D_{min} , D_{eq}) y distribuciones logarítmicas de los mismos, durante el proceso de recristalización, condujo a la selección de la distribución de diámetros equivalentes por ser la que mejor ajustaba a la distribución normal. Esto permitió expresar las distribuciones cristalinas en función del diámetro medio equivalente.
- Se encontró una relación directa entre tamaño cristalino y número de lados. Los cristales más pequeños presentaban tres o cuatro lados, siendo ésta una estructura más inestable con respecto a la correspondiente a los de seis lados que presentaban límites de grano plano.
- Se halló una expresión para la velocidad de recristalización para solución simuladora en función de la curvatura media y su dependencia con la temperatura. Pudo comprobarse además, que

el sistema policristalino estudiado evolucionó bajo las condiciones de recristalización normal, pues ningún cristal duplicaba el tamaño medio cristalino (criterio de Hillert).

- Se puso de manifiesto la importancia de considerar el diámetro medio inicial de la distribución cristalina, al formular la cinética de recristalización, con el objeto de no incurrir en errores en los resultados obtenidos (exponente de la ecuación y energía de activación del fenómeno) frecuentemente hallados en la literatura.
- Con respecto a las oscilaciones térmicas, se observó que los ascensos de temperatura producían la fusión de los cristales más pequeños (menor temperatura de equilibrio) y que durante los descensos de temperatura la masa de hielo adicional se depositaba preferencialmente sobre los cristales de mayor tamaño (mayor temperatura de equilibrio). En definitiva, tanto ascensos como descensos de temperatura conducían a un aumento del diámetro medio cristalino, que se sumaba al efecto producido por la recristalización. Este fenómeno pudo ser explicado en base a la relación existente entre radio de curvatura y temperatura de equilibrio.
- La aplicación del método histológico para el análisis microscópico de tejidos cárneos congelados, a través de la técnica de sustitución a baja temperatura, permitió la observación de los huecos dejados por el hielo en la estructura tisular.
- Se comprobó que cuanto menor era la temperatura de almacenamiento, mayor era el deterioro físico de la estructura tisular y que la relación de áreas de hielo a distintas temperaturas, guardaba la misma proporción que la obtenida por medio de la curva de variación de fracción de agua congelada con la temperatura, obtenida por métodos calorimétricos.

- Con respecto a la optimización de la técnica histológica, de manera de minimizar errores que podría introducir, se determinaron los coeficientes de difusión del fijador de Carnoy en tejidos cárneos a distintas temperaturas y la energía de activación del proceso, válida para el rango de temperaturas de almacenamiento comercialmente utilizadas. Esto permitió calcular los tiempos de fijación completa a distintas temperaturas, lapso durante el cual podrían modificarse los tamaños cristalinos y acelerar los tiempos de operación del método histológico.
- Se demostró que la fijación a temperaturas diferentes a la de la muestra ocasiona errores en las mediciones por variación en la fracción de agua congelada, aunque este efecto se reduce si las fluctuaciones de temperatura se producen por debajo de -15°C , ya que la curva de fracción de agua congelada presenta poca variación en esta zona.
- La variación del tamaño cristalino durante la etapa de fijación introducida por la recristalización, resultó ser no significativa aún a temperaturas cercanas al punto de fusión del hielo. Por lo tanto, pudo concluirse que la fijación isotérmica en la técnica de sustitución a baja temperatura es la más apropiada para el análisis histológico de tejidos congelados.
- La recristalización en tejidos cárneos quedó evidenciada por el aumento de tamaño de los huecos dejados por el hielo con el tiempo de almacenamiento, sin embargo pudo observarse que este crecimiento no resultaba ilimitado. A diferencia de lo que ocurre en solución simuladora, la matriz de fibras actúa como barrera al libre crecimiento de los cristales de hielo.
- La cinética de recristalización propuesta, expresada en términos de diámetros equivalentes medios, diámetro inicial y diámetro límite, interpreta el fenómeno a cortos y largos tiempos

de almacenamiento.

- El valor del diámetro límite resultó ser independiente de la temperatura y del diámetro inicial, dependiendo sólo del tejido en cuestión. Se postuló una ecuación que expresa el diámetro límite, en términos de diámetro medio y fracción volumétrica de fibras, que puede ser extendida a otros tejidos.
- Resultados experimentales demostraron que el diámetro límite era alcanzado en menos tiempo cuanto mayor era el diámetro inicial y mayor la temperatura de almacenamiento. Asimismo, a través del modelo cinético, se obtuvieron curvas que permiten conocer el tiempo necesario para alcanzar el diámetro límite, teniendo como datos el diámetro inicial y la temperatura de almacenamiento, lapso durante el cual el fenómeno de recristalización es significativo.
- Estudios histológicos realizados sobre muestras almacenadas bajo oscilaciones térmicas, mostraron el aumento del diámetro medio, discutiéndose su relación con el aumento de exudado y disminución de calidad del producto. Las fluctuaciones térmicas deben ser evitadas en lo posible, siendo el deterioro causado por éstas tanto mayor cuanto más alto es el nivel térmico y mayor es el rango del salto entre las temperaturas involucradas. El efecto de las variaciones de temperatura en el diámetro cristalino de hielo resultó más significativo en el caso de tejidos cárneos congelados que en soluciones, debido a la presencia de las fibras que dificultan la redistribución del agua. Durante un ascenso de temperatura funden los cristales más pequeños pero el agua generada difícilmente reingresa a las fibras. Durante un descenso de temperatura el hielo adicional proveniente de la deshidratación de las fibras o del agua generada por un ascenso de temperatura, se deposita sobre los cristales de mayor tamaño, distorsionando aún más la estructura

tisular.

- Las variaciones en la temperatura de almacenamiento tienen mayor efecto sobre la distribución cristalina cuando se producen a tiempos menores que el necesario para alcanzar el diámetro límite. Las oscilaciones térmicas, por otra parte, al generar un crecimiento del diámetro medio disminuyen dicho tiempo (t_1), acelerando los efectos indeseables de la recristalización.
- La recristalización ha sido vinculada con los procesos de deterioro de calidad de productos cárnicos a través de la energía de activación del fenómeno, que resultó ser comparable con la energía de activación obtenida a partir de curvas tolerancia, tiempo, temperatura. También resultó comparable con la correspondiente a la primera etapa de desnaturalización proteica en tejido bovino congelado, una de cuyas causas podría ser atribuida a la recristalización. Otra evidencia de la relación entre la recristalización y la primera etapa de la desnaturalización proteica la constituye la concordancia hallada entre los tiempos en que se alcanza el diámetro límite y los cambios de mecanismo de la desnaturalización. La vinculación surge a partir de las modificaciones que introduce la recristalización en los gradientes de concentración de los solutos y en la fuerza iónica del medio, afectando a la estructura proteica por medio de los procesos de interfase.
- A partir de trabajos previos, donde se observó que el 80% del exudado por presión, obtenido de muestras congeladas (almacenadas a distintas temperaturas y descongeladas en condiciones controladas) se producía en períodos de almacenamiento similares a los necesarios para alcanzar el diámetro límite, se concluyó que la recristalización tendría un efecto significativo en la capacidad de retención de agua durante el almacenamiento congelado.

- *Todo final trae ecos de un comienzo.*
- *¿Comienzo de lo que se ha concluído o de lo que se emprenderá?*

B I B L I O G R A F I A

- Adamson, A.W. (1960) Physical chemistry of surfaces. p. 229-307. Interscience Publishers, Inc., New York.
- Aleman, M.J.; Kakuda, K. y Uchizama, H. (1982). Partial freezing as a means of keeping freshness of fish. Bul. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. 106, 11-26.
- Añón, M.C. y Calvelo, A. (1980) Freezing rate effects on the drip loss of frozen beef. Meat Sci., 4, 1-14.
- Asquith, M.H. y Reid, D.S. (1980) The preparation of frozen samples for electron and light microscopy by isothermal freeze-fization at temperatures down to -20°C. Cryo-Letters 1, 352-359.
- Beck, P.A. (1948) Effect of recrystallized grain size on grain growth. J. Appl. Phys. 19, 507-509.
- Beck, P.A. (1954) Annealing of cold metals. Phil. Mag. Suppl. 3, 245-324.
- Bello, R.A.; Luft, J.H. y Pigott, G.M. (1981) Improved histological procedure for microscopic demonstration of related changes in fish muscle tissue structure during holding and freezing. J. Food Sci. 46, 733-737, 740.
- Berlin, P.G.; Kliman, P.G. y Pallansch, M.J. (1970) Changes in state of water in proteinaceous systems. J. Colloid Interface Sci. 34, 488-494.
- Bevilacqua, A.E. y Zaritzky, N.E. (1980) Ice morphology in frozen beef. J. Food Technol. 15, 589-597.
- Bevilacqua, A.E. y Zaritzky, N.E. (1982) Ice recrystallization in frozen beef. J. Food Sci. 47, 1410-1414.

- Bevilacqua, A.E.; Zaritzky, N.E. y Calvelo, A. (1979) Histological measurements of ice in frozen beef. *J. Food Technol.* 14, 237-251.
- Bilinski, E.; Jonas, R.E.E; Lau, Y.C. y Gibbard, G. (1977) Treatments before frozen storage affecting thaw drip formation in Pacific Salmon. *J. Fish Res. Board Can.* 34, 1431-1435.
- Bolling, G.F. y Winegard, W.C. (1958) Grain growth in zone refined lead. *Acta Met.* 6, 283-287.
- Bramsnaes, F. (1981) Maintaining the quality of frozen foods during distribution. *Food Technol.* April, 38-43.
- Brennan, J.G.; Butters, J.R.; Cowell, N.D. y Lilly, A.E.V. (1980) Las operaciones de la ingeniería de los alimentos, p. 367-390. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Brook, R.J. (1976) Controlled grain growth. En "Treatise on materials science and technology", vol. 9: Ceramic fabrication processes. Wang F.Y. (Ed.) pp 331-364. Academic Press, New York, London.
- Burke, J.E. (1966) Grain growth. En "Ceramic microstructures. Their analysis, significance and production". Fubrath, R.M. y Pask, J.A. (Eds.) pp. 681-700. John Wiley and Sons, Inc., New York, London, Sidney.
- Burke, J.E. y Turnbull, D. (1952) Recrystallization and grain growth. En "Progress in metal physics", vol. 3, Chalmers, B. (Ed.) pp 220-292. Pergamon Press, London, New York.
- Calvelo, A. (1981) Recent studies on meat freezing. En "Developments in meat Science", 2. Ralston Lawie (Ed.) pp. 125-158. Applied Science Publishers, London, New Jersey.

- Cerella, E.G. y Zaritzky, N.E. (1974) Adaptación de la técnica de sustitución para la observación microscópica de tejidos cárneos congelados. CIDCA (publicación interna) 9, 1-12.
- Ciobanu, A. (1976) Freezing. En "Cooling technology in the food industry". Ciobanu, A; Lascu, G.; Bercescu, V. y Niculescu, L. (Eds.) pp. 139-222. Abacus Press, Kent, England.
- Collin, D. (1977) La carne y el frío. Paraninfo, Madrid.
- Connell, J.J. (1968) The effect of freezing and frozen storage on the proteins of fish muscle. En "Low temperature biology of foodstuffs". Hawthorn, J. y Rolfe, E.J. (Eds.) pp 333-358. Pergamon Press, London.
- Contrell, A.H. (1968) An introduction to metallurgy. Edward Arnold (Publishers) Ltd.
- Crank, J. (1957) The Mathematics of diffusion. pp 30-37. Oxford University Press, London.
- Chalmers, B. (1977) Microscopic heat flow considerations. En "Principles of solidification", pp. 20-125. Robert E. Krieger Publishing Co., Huntington, New York.
- Cheftel, J.C. y Cheftel, H. (1976) Los principales sistemas bioquímicos alimentarios. Comportamiento durante los tratamientos. Carne y pescado. En "Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos" Vol. I. pp 65-97. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Chrystall, B.B. (1972) Influence of storage temperatures on quality of frozen meat. Meat Industry Research Institute of New Zealand (Inc.) 274, 1-11.
- Drost-Hansen, W. (1967) The water-ice interface as seen from the liquid side. J. Colloid Interface Sci. 25, 131-160.

- Dyer, W.J. (1968) Deterioration and storage life of frozen fish. En "Low temperature biology of foodstuffs". Hawthorn, J. y Rolfe, E.S. (Eds.) pp. 429-447. Pergamon Press, London.
- Feder, N. y Sidman, R.L. (1958) Methods and principles of fixation by freeze-substitution. J. Biophys. and Biochem. Cytol. 4, (5), 593-609.
- Feltham, P. (1957) Grain growth. Acta Met. 5, 95-105.
- Fennema, O.R. (1966) An over-all view of low temperature food preservation. Cryobiology 3, 197-213.
- Fennema, O.R. (1973) Solid-liquid equilibria y Nature of freezing process. En "Low-temperature preservation of foods and living matter". Fennema, O.R.; Powrie, W.D. y Marth, E.H. (Eds.) pp. 101-222. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Fennema, O.R. (1975a) Activity of enzymes in partially frozen aqueous systems. En "Water relations of foods". Duckworth, R.B. (Ed.) pp. 397-413. Academic Press, London, New York.
- Fennema, O.R. (1975b) Reaction kinetics in partially frozen aqueous systems. En "Water relations of foods". Duckworth, R.B. (Ed.) pp. 539-556. Academic Press, London, New York.
- Fernández-Morán, H. (1960) Low temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid helium II. Ann. N.Y. Acad. Sci. 85, 689-713.
- FIDE (Fundación de investigaciones para el desarrollo) (1985) Coyuntura y desarrollo 81, 38-49.
- Gerrits, A.R. y Jansonius, F.A.T. (1975) Recrystallisation of ice crystals in frozen muscle tissue of broilers. Spelderholt Medeling 233(16), 1-9.

- Gibbard, G.; Lee, F.; Gibbard, S. y Bilinski, E. (1981/4) Transport of salmon over long distances by partial freezing in RSW vessels. En "Advances in the refrigerated treatment of fish", Commissions C2-D1-D2-D3, Boston (USA) 1981/4. International Institute of Refrigeration (Ed.) pp. 285-290. Paris.
- Goma, M. y Biro, G. (1970) Strukturelle Veränderungen gefrorenen Fleishes während der Gefrierlagerung. Die Fleischwirtschaft 8, 1975-1978.
- González-Sanguinetti, S.; Añón, M.C. y Calvelo, A. (1985) Effect of thawing rate on the exudate production of frozen beef. J. Food Sci. 50, 697-700, 706.
- Gortner, W.A.; Fenton, F.; Volz, F.E. y Gleim, E. (1948). Effect of fluctuating storage temperatures on quality of frozen foods. Ind. Eng. Chem. 40, 1423-1426.
- Gross, G.W. (1967) Ion distribution and phase boundary potentials during the freezing of very dilute ionic solutions at uniform rates. J. Colloid Interface Sci. 25, 270-279.
- Grove, C.S.; Jelinek, R.V. y Schoen, H.M. (1962) Crystallization from solution. En "Advances in chemical engineering" Vol. 3, Drew, T.B.; Hoopes, J.W.(Jr) y Vermeuler, T. (Eds.) pp. 1-60, Academic Press, New York, London.
- Hallet, J. (1968) Nucleation and growth of ice crystals in water and biological systems. En "Low temperature biology of foodstuffs". Hawthorn, J. y Rolfe, E.J. (Eds.) pp. 23-52, Pergamon Press, London.
- Harrison, J.D. y Tiller, W.A. (1963) Ice interface morphology and texture developed during freezing. J. Appl. Phys. 34, 3349-3355.

- Heber, V.; Volger, H.; Overbeck, V. y Santarius, K.A. (1979) Membrane damage and protection during freezing. En "Proteins at low temperatures" Owen Fennema (Ed.) pp. 159-189. American Chemical Society, Washington D.C..
- Hillert, M. (1965) On the theory of normal and abnormal grain growth. *Acta Met.* 13, 227-238.
- Himmelblau, D.M. (1970) Process analysis by statistical methods, pp. 10-64, John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Hobbs, P.H. (1974) Ice Physics. Clarendon Press, Oxford.
- Hobbs, P.H. y Mason, B.J. (1964) The sintering and adhesion of ice. *Phil. Mag.* 9, 181-197.
- Hoekstra, P. y Miller, R.D. (1967) On the mobility of water molecules in the transition layer between ice and a solid surface. *J. Colloid Interface Sci.* 25, 166-173.
- Holmes, E.L.; Rutter, J.W. y Winegard, W.C. (1957) Growth conditions for stability of a cellular solid-liquid interface. *Can. J. Phys.* 35, 1223-1227.
- International Institute of Refrigeration (1964) Recommendations for the processing and handling of frozen foods. Institute International du Froid (Ed.), Paris.
- International Institute of Refrigeration (1972) Recommendations for the processing and handling of frozen foods. Institute International du Froid (Ed.), Paris.
- Itagaki, K. (1964) Self-diffusion in single crystals of ice. *J. Phys. Soc. Japan* 19, 1081.
- Itagaki, K. (1967) Some surface phenomena of ice. *J. Colloid Interface Sci.*, 25, 218-227.

- Jackson, K.A. (1967) A review of the fundamental aspects of crystal growth. En "Crystal Growth". Proceedings of an International Conference on Crystal Growths, Boston, 20-24 June, 1966, Peiser, H.S. (Ed.) pp. 17-24, Pergamon Press, London.
- Jackson, K.A.; Uhlmann, D.R. y Hunt, J.D. (1967) On the nature of crystal growth from the melt. *J. Cryst. Growth* 1, 1-36.
- Jansen, E.F. (1969) Quality-related chemical and physical changes in frozen foods. En "Quality and stability of frozen foods. Time-temperature tolerance and its significance". Van Arsdel, W.B.; Copley, M.J. y Olson, R.J. (Eds.) pp. 19-42. Wiley - Interscience, New York, London.
- Jellinek, H.H.G. (1967) Liquid-like (transition) layer on ice. *J. Colloid Interface Sci.*, 25, 192-205.
- Jellinek, H.H.G. y Gouda, V.K. (1969) Grain growth in polycrystalline ice. *Phys. Stat. sol.*, 31, 413-423.
- Jiang, S.T.; Tsao, Ch.Y. y Ho, M.L. (1985) Effect of the temperature fluctuation on the meat quality of frozen mackerel (*Scomber tapeinocephalus*). En "Storage lives of chilled and frozen fish and fish products". International Institute of Refrigeration (Ed.), pp. 63-69, Paris.
- Jul, M. (1969) Quality and stability of frozen meats. En "Quality and stability of frozen foods. Time-temperature tolerance and its significance". Van Arsdel, W.B.; Copley, M. M.J. y Olson, R.J. (Eds.) pp. 191-216. Wiley - Interscience, New York, London.
- Jul, M. (1984) The quality of frozen foods. Academic Press, London.

- Kaess, G. y Weidemann, J.F. (1961) Freezer burn as a limiting factor in the storage of animal tissue. II. Histological study of freezer burn of liver. Food Technol. 15(3), 129-133.
- Kato, N.; Umemoto, S. y Uchiyama, H. (1974) Partial freezing as a mean of perserving the freshness of fish. II. Changes in the properties during the storage of partially frozen sea bass muscle. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 40, 1145-1154.
- Kingery, W.D. (1960a) Introduction to ceramics. pp. 353-389. John Wiley and Sons Inc., New York, London.
- Kingery, W.D. (1960b) Regelation, surface diffusion and ice sintering. J. Appl. Phys. 31, 833-838.
- Kirwan, D.J. y Pigford, R.L. (1969) Crystallization kinetics of pure and binary melts. AIChE Journal 15(3), 442-449.
- Knight, C.A. (1967) The freezing of supercooled liquids. D. Van Nostrand Company Inc., Princeton, Toronto, London.
- Koonz, C.H. y Ramsbottom, J.M. (1939) A method for studying the histological structure of frozen products. I. Poultry. Food Res. (J. Food Sci.) 4, 117-128.
- Kuntz, I.D. (1979) Properties of protein-water systems at sub-zero temperatures. En "Proteins at low temperatures" Owen Fenema (Ed.) pp. 27-33, American Chemical Society, Washington D.C.
- Lampila, L.E.; Mobr, V. y Reid, D.S. (1985) Scanning electron microscopic study of rockfish preserved at either ambient temperature or by isothermal freeze-fixation. Food Microstructure 4, 11-16.

- Lang, O. (1975) Das Gefrieren von Fleisch das Lagern und Auftauen von gefrorenem Fleisch. Die Fleischwirtschaft 55(7), 897-901.
- Lawrie, R.A. (1974) Ciencia de la carne. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Le Febvre, V. (1967) The freezing potential effect. J. Colloid Interface Sci. 25, 263-269.
- Levitt, J. (1966) Winter hardiness in plants. En "Cryobiology". Harold T. Meryman (Ed.) pp. 495-563. Academic Press, London, New York.
- Levitt, J. (1979) The role of proteins in the freezing injury and resistance of biological material. En "Proteins at low temperatures". Owen Fennema (Ed.) pp. 141-157. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Love, R.M. (1966a) Freezing of bound water and protein aggregation in frozen cod muscle stored near its melting point. Nature 211, 981-982.
- Love, R.M. (1966b) The freezing of animal tissue. En "Cryobiology" Meryman, H.T. (Ed.) pp. 317-405, Academic Press, London, New York.
- Love, R.M. (1968) Ice formation in frozen muscle. En "Low temperature biology of foodstuffs". Hawthorn J. y Rolfe, E.J. (Eds.) pp. 105-124, Pergamon Press, London.
- Lusena, C.V. y Cook, W.H. (1953) Ice propagation in systems of biological interest. Effect of membranes and solutes in a model cell system. Arch. Biochem. Biophys. 46, 232-240.

- Lusena, C.V. y Cook, W.H. (1954) Ice propagation in systems of biological interest. II. Effect of solutes at rapid cooling rates. Arch. Biochem. Biophys. 50, 243-251.
- Luyet, B.J. (1957) On the growth of the ice phase aqueous colloids. Proc. Roy. Soc. London B, 147, 434-451.
- Luyet, B.J. (1960) On various phase transitions occurring in aqueous solutions at low temperatures. Annal New York Academy of Sciences 85, 549-569.
- Luyet, B.J. (1966) Anatomy of the freezing process in physical systems. En "Cryobiology". Meryman, H. (Ed.) pp. 115-138, Academic Press, London, New York.
- Luyet, B.J. (1968) The formation of ice and the physical behaviour of the ice phase in aqueous solutions and in biological systems. En "Low temperature biology of food stuffs", Hawthorn J. y Rolfe, E.J. (Eds.) pp. 55-77, Pergamon Press, London.
- Luyet, B.J.; Kroener, C. y Rapatz, G.L. (1958) Detection of heat of recrystallization in glycerol-water mixtures. Biodynamica 8, 73-80.
- Luyet, B.J. y Rapatz, G.L. (1958) Patterns of ice formation in some aqueous solution. Biodynamica 8, 1-68.
- Lynch, M.J.; Raphael, S.S.; Mellor, L.D.; Spare, P.D.; Hills, P. y Inwood, M.J.H. (1965) Técnicas histológicas, Cuarta Sección. En "Métodos de laboratorio", pp. 515-556, Editorial Interamericana, S.A., México.
- MacKenzie, A.P. (1975) The physico-chemical environment during the freezing and thawing of biological materials. En "Water relations of foods", Duckworth, R.B. (Ed.) pp. 477-503, Academic Press Inc. Ltd, London.

- MacKenzie, A.P.; Kuster, T.A. y Luyet, B.J. (1975) Freeze-fixation at high subzero temperatures. *Cryobiology* 12, 427-439.
- Macklin, W.C. y Ryan, B.F. (1966) Habits of ice growth in supercooled water and aqueous solutions. *Phil. mag.* 14, 847-860.
- Matsumoto, J.J. (1979) Denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. En "Proteins at low temperatures". Owen Fennema (Ed.) pp. 205-224, American Chemistry Society, Washington, D.C.
- Mazur, P. (1966) Physical and chemical basis of injury in single celled microorganisms subjected to freezing and thawing. En "Cryobiology". Meryman, H.T. (Ed.) pp. 213-251. Academic Press, London, New York.
- Menegalli, F.C. y Calvelo, A. (1979) Dendritic growth of ice crystals during the freezing of beef. *Meat Sci.* 3, 179-198.
- Meryman, H.T. (1966) Review of biological freezing. En "Cryobiology". Harold T. Meryman (Ed.) pp. 1-114. Academic Press, New York, London.
- Ming, Z. (1981/4) Application of partial freezing technique on fishing vessels operating in the South China Sea. En "Advances in the refrigerated treatment of fish"; Commissions C2-D1-D2 y D3, Boston (USA), 1981/4. International Institute of Refrigeration (Ed.) pp. 259-264. Paris.
- Moran, T. (1930) The frozen state in mammalian muscle. *Proc. Roy. Soc. B*, 107, 182-187.
- Moran, T. y Hale, H.P. (1932) Rapid freezing. Temperature of storage. *J. Soc. Chem. Ind.* 53, T20-T23.

- Nguyen, V.X. (1969a) Localisation et aspect de la glace dans l'épiderme d'oignon, dans différentes conditions de refroidissement. Rev. Gén. du Froid 1, 89-99.
- Nguyen, V.X. (1969b) Structure microscopique et conditions de congélation et d'entreposage des haricots verts. Bull. I.I.F. Commissions IV & V, Budapest 1969, Annexe 1969-6, pp. 41-45.
- Ouali, A.; Rochdi, A.; Bonnet, M.; Kopp, J. y Valin, C. (1983) Influence de la vitesse et de la température finale de congélation sur la structure contractile du muscle strié de bovin. En "Le froid au service de l'homme. XVIIe Congrès International du Froid", Institute International du Froid (Ed.) Tome 3, pp. 252-257. Paris.
- Partmann, W. (1973) Histologische Veränderungen in Rind- und Schweinefleisch sowie Schweineleber unter definierten Gefrier- und Auftaubedingungen. Die Fleischwirtschaft 53, 65-70.
- Partmann, W. (1975) The effects of freezing and thawing on food quality. En "Water relations of foods". Duckworth (Ed.) pp. 505-537, Academic Press, London, New York.
- Partmann, W. (1977) Some aspects of protein changes in frozen foods. Z. Ernährungswiss 16, 167-175.
- Perdsidsky, M.D. y Luyet, B.J. (1960) On some particular ice patterns observed in the freezing of gelatin gels. Biodynamica 8(163), 146-163.
- Plaskett, T.S. y Winegard, W.C. (1959) Cellular growth in tin alloys. Can. J. Phys. 37, 1555-1557.
- Powrie, W.D. (1973) Characteristics of food myosystems and their behaviour during freeze-preservation. En "Low-temperature preservation of foods and living matter". Fennema, O.R.; Powrie, W.D. y Marth, E.H. (Eds.) pp. 282-351.

- Price, J.F. y Schweigert, B.S. (1976) Introducción. En "Ciencia de la carne y de los productos cárneos". Price, J.F. y Schweigert, B.S. (Eds.) pp. 624-662. Acribia, Zaragoza.
- Rebhun, L.I. (1972) Freeze substitution and freeze-drying. En "Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications". Hayat, M.A. (Ed.) pp. 3-49. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Reed - Hill, R.E. (1972) Principios de metalúrgica física. pp. 183-195, 249-271. Compañía Editorial Continental S.A., México, España, Argentina, Chile.
- Reid, D.S. (1983) Fundamental physicochemical aspects of freezing Food Technol. 37(4), 110-115.
- Reid, R.C.; Botsaris, G.D.; Margolis, G.; Kirwan, D.J.; Denk, E.G.; Ersan, G.S.; Tester, J. y Wong, F. (1970) Crystallization. Part I. Transport phenomena of nucleation and crystal growth (Annual Review) Ind. Eng. Chem. 62(11), 52-67.
- Reid, D.S.; Doong, N.F.; Foin, A. y Snider, M. (1985) Studies on frozen storage of fish. En "Storage lives of chilled and frozen fish and fish products". International Institute of Refrigeration (Ed.) pp. 111-117, París.
- Renerre, M. (1982) La couleur de la viande et sa mesure. Bull. Techn. C.R.Z.V. Theix, INRA 47, 47-54.
- Richardson, W.D. y Scherubel, E. (1908) The deterioration and commercial preservation of flesh foods. First paper: General introduction and experiments on frozen beef. J. Am. Chem. Soc. 30, 1515-1564.
- Riedel, L. (1957) Kalorimetrische Untersuchungen über das Gefrieren von Fleisch. Kaltetechnik 9, 38-40.

- Roach, S.W.; Tomlinson, N.; Geiger, S.E. y Mann, S.H. (1971) Quality of salmon canned after being stored partially frozen influence of the rate of freezing. Proceedings of the XIIIth International Congress of Refrigeration, Washington D.C., International Institute of Refrigeration (Eds.), Paris, 4, 8.25, 601-605.
- Rodríguez, N. y Zaritzky, N.E. (1983) Development of a time-temperature integrator indicator for frozen beef. J. Fd. Sci. 48, 1523-1528.
- Schwimmer, S.; Ingraham, L.L. y Hughes, H.M. (1955) Temperature tolerance in frozen food processing. Effective temperature in thermally fluctuating systems. Ind. Eng. Chem. 47, 1149-1151.
- Shenouda, S.Y.K. (1980) Theories of protein denaturation during frozen storage of fish fleish. Adv. Food. Res. 26, 275-311.
- Shumskii, P.A. (1964) Principles of structural glaciology. Dover Publications Inc., New York.
- Singh, R. y Wang, C.Y. (1977) Quality of frozen foods. A review. J. Food Pro. Eng. 1, 97-127.
- Spiess, W.E.L. y Wolf, W. (1977) A survey of temperature distributions in retail cabinets for deep frozen foods. En "Progress in refrigeration science and technology" Vol. 3. Proceedings of the XIV International Congress of Refrigeration Moscow, 1975. International Institute of Refrigeration (Eds.) pp. 969-973. Vneshtorgizdat, USSR.
- Spiess, W.E.L.; Wolf, W.; Wien, K.J. y Jung, G. (1977) Temperature maintainance during the local distribution of deep frozen food products. En "Freezing, frozen storage and freeze-drying". International Institute of Refrigeration (Eds.) pp. 367-374, Karlsruhe, W. Germany.

- Sy, D.H. y Fennema, O.R. (1973) Rates of recrystallization in beef liver tissue. En "Proceedings of the International Congress of Refrigeration, 13th Washington", 3, pp. 199-204, AVI Publ. Co. Inc., Westport, C.T.
- Taborsky, G. (1979) Protein alterations at low temperatures: An overview. En "Proteins at low temperatures". Owen Fennema (Ed.) pp 1-26. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Terwilliger, J.P. y Dizio, S.F. (1970) Salt rejection phenomena in the freezing of saline solutions. Chem. Ing. Sci. 25, 1331-1349.
- Tiller, W.A. (1964) Dendrites. Science 146(3646), 871-879.
- Uchiyama, H. (1979) A survey of fish freshness in Thailand. Current Technical Paper. Southeast Asian Fisheries Development Center 7, 1-50.
- Uchiyama, H. y Kato, N. (1974) Partial freezing as a means of preserving fish freshness. I. Changes in free amino acids, TMA-N, ATP and its related compounds, and nucleic acids during storage. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 40, 1145-1154.
- Ulrich, R. (1981a) Comportement des produits congelés à des températures variables. La Surgelation 195, 30-32.
- Ulrich, R. (1981b) Variations de température et qualité des produits surgelés. Rev. Gén. du Froid, Juillet/Aout, 371-389.
- Ulrich, R. y Nguyen, V.X. (1967) Premières observations sur la structure microscopique des produits végétaux congelés. Rev. Gén. du Froid 4, 431-435.
- Urbain, W.M.(1976) Conservación de la carne. En "Ciencia de la carne y de los productos cárnicos". Price, J.F. y Schweigert, B.S. (Eds.) pp. 413-461. Acribia, Zaragoza.

- Van Harreveld, A. y Crowell, J. (1964) Electron microscopy after rapid freezing on a metal surface and substitution fixation. *Anat. Res.* 149, 381-386.
- Van Harreveld, A.; Crowell, J. y Malhotra, S.K. (1965) A study of extracellular space in central nervous tissue of freeze-substitution. *J. Cell. Biol.* 25, 117-137.
- Van Hulle, G.; Fennema, O. y Powrie, W.D. (1965) A comparison of methods for the microscopic examination of frozen tissue. *J. Food Sci.* 30, 601-603.
- Volk, W. (1958) Correlation - regression. En "Applied statistics for engineers". pp. 224-260, Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York.
- Voyle, C.A. (1974) Structural and histological changes associated with the freezing of meat. En "Meat freezing. Why and how?", Proc. M.R.I. Symposium N°3" Cutting, C.L. (Ed.) pp. 6.1-6.6, Meat Research Institute, Longford, Bristol.
- Wagner, J.R. (1986) Desnaturalización de proteínas de músculo bovino durante la congelación y el almacenamiento en estado congelado. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Wagner, J.R. y Añón, M.C. (1985) Effect of freezing rate on the denaturation of myofibrillar proteins. *J. Fd. Technol.* 20, 735-744.
- Wagner, J.R. y Añón, M.C. (1986a) Effect of frozen storage on protein denaturation in bovine muscle. I. Myofibrillar ATPase activity and differential scanning calorimetric studies. *J. Fd. Technol.* 21, 9-18.

- Wagner, J.R. y Añón, M.C. (1986b) Effect of frozen storage on protein denaturation in bovine muscle. II. Influence on solubility, viscosity and electrophoretic behaviour of myofibrillar proteins. *J. Fd. Technol.* 21, 547-558.
- Wang, J.H. (1965) Self-diffusion coefficients of water. *J. Phys. Chem.* 69, 4412.
- Williamson, R.B. y Chalmers, B. (1967) Morphology of ice solidified in undercooled water. En "Crystal growth". Proceedings of an international conference on crystal growth, Boston, June 1966. H. Steffen Peiser (Ed.) pp. 739-743. Pergamon Press, London, New York, Toronto.
- Winger, R.J. (1982) The effect of processing variables on the storage stability of frozen lamb. En "Refrigeration of perishable products for distant markets" International Institute of Refrigeration (Ed.) 79-82, París.
- Woodroof, J.G. (1939) Method for fixing ice crystal patterns in frozen products. *Science* 27, 87.
- Woolrich, W.R. (1965) Secondary refrigerants. En "Handbook of refrigerating engineering", Vol. I, Fundamentals. pp. 358-361. The AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut.
- Zárate, J.R. y Zaritzky, N.E. (1985) Producción de exudado durante el almacenamiento de carne bovina congelada. Datos no publicados.
- Zaritzky, N.E. (1982) Mathematical simulation of the thermal behaviour of frozen meat during its storage and distribution. *J. Food Pro. Eng.* 6, 15-36.

NOMENCLATURA

- \bar{a}_v : área media por unidad de volumen
- a_{vi} : área por unidad de volumen para cristales de diámetro D_i
- a_1, a_2, a_3 : constantes numéricas en Ec. (17)
- A : constante en Ec. (2)
- \bar{A} : área promedio
- A_f : área de fibra
- A_h : área ocupada por cristales de hielo
- A_i : superficie del cristal con diámetro D_i
- A_T : área total
- b : pendiente de la regresión lineal
- B : constante en Ec. (2)
- C : constante cinética de crecimiento cristalino en Ec. (59)
- \bar{d} : diámetro medio de inclusiones
- \bar{d}_f : diámetro equivalente medio de fibras
- d_{fi} : diámetro equivalente de fibra
- \mathcal{D} : coeficiente de difusión
- \mathcal{D}_0 : factor pre-exponencial para la difusión
- D : diámetro cristalino
- \bar{D} : diámetro cristalino medio
- D_{cr} : diámetro crítico
- D_{eq} : diámetro equivalente
- D_l : diámetro límite
- D_{max} : diámetro máximo

- D_{\min} : diámetro mínimo
- D_0 : diámetro inicial
- \bar{D}_1 : diámetro medio en función de frecuencias numéricas
- \bar{D}_2 : diámetro medio superficial
- \bar{D}_3 : diámetro medio en función del área por unidad de volumen
- \bar{D}_4 : diámetro medio cuadrático
- \bar{D}_5 : diámetro medio logarítmico
- e : factor de forma cristalino
- E_a : energía de activación para la recristalización de solución simuladora (Ec. (54))
- $E_a(\text{dif})$: energía de activación para la difusión del fijador de Carnoy en tejido cárneo
- E_{aR} : energía de activación para la recristalización en tejidos cárneos, válida a cortos tiempos (Ec. (67))
- Ex : exudado debido al almacenamiento
- $E'a$: energía de activación para la recristalización en tejido cárneo (Ec. (71))
- f_{AB}, f_{BA} : frecuencias de saltos atómicos a través de la interfase
- f_d : fracción volumétrica
- f_{fibra} : fracción volumétrica de fibras
- f_i : fracción numérica relativa
- f_{neta} : fracción neta de saltos atómicos
- $F_{\nu}^{\nu'}$ (P) : estadístico "F" con probabilidad P y ν, ν' grados de libertad
- G : energía libre
- $G^{\#}$: energía libre de activación

h : constante de Planck

$H^{\#}$: entalpía de activación

I : velocidad de nucleación

k : constante cinética de recristalización en solución simuladora (Ec. (53))

k_0 : factor pre-exponencial en la cinética de recristalización de solución simuladora (Ec. (54))

k' : constante cinética de recristalización en tejido cárneo (Ec. (69))

k'_0 : factor pre-exponencial en la cinética de recristalización en tejidos cárneos (Ec. (71))

K : constante cinética de recristalización en Ec. (55) y Ec. (66)

K_0 : factor pre-exponencial en Ec. (67)

l : espesor de la zona congelada

l_f : longitud de fibras cilíndricas

l_0 : menor distancia entre el centro térmico y la superficie

L_f : calor latente de fusión

m : exponente en la Ec. (55)

m_i : frecuencia absoluta

m_i^* : frecuencia teórica absoluta correspondiente a la distribución normal

M : movilidad de la interfase

M_1 : peso inicial de la muestra sin congelar

M_2 : peso de la muestra congelada y descongelada inmediatamente

M_3 : peso de la muestra congelada, almacenada y descongelada

n : número de lados del cristal

\bar{n} : número medio de lados en la distribución cristalina

n_i : número de individuos en una distribución

N : número total de cristales

N_A : número de Avogadro

N_i : número de cristales con diámetro D_i

N^* : punto de congelación crítico

p_1 : constante numérica en Ec. (17)

P : probabilidad

$P(x)$: función integral de la probabilidad normal

q : exponente en la Ec. (59)

Q : velocidad neta de saltos atómicos

Q_c : constante de velocidad

r : radio de partícula

r_1, r_2 : radio de curvatura

r^* : radio crítico

R : constante de los gases

s : número de intervalos en la prueba de bondad de ajuste χ^2

S : desviación standard

$S_{\bar{A}}$: desviación standard de áreas medias

$S(b)$: desviación standard de la pendiente

$S_{\bar{D}}$: desviación standard de diámetros medios

$S^\#$: entropía de activación

t_c : tiempo característico

t_{exp} : estadístico "t" student calculado con datos experimentales

t_f : tiempo total de fijación

t_l : tiempo límite

- t_{teor} : estadístico "t" student obtenido de tablas
- $t_v(P)$: estadístico "t" student con probabilidad P y v grados de libertad
- T_e : temperatura de equilibrio para una superficie plana
- T_n : temperatura de la interfase
- T_r : temperatura de equilibrio para un cristal con radio r
- T_{∞} : temperatura de la fuente fría
- u : tamaño cristalino relativo
- u_0 : tamaño cristalino relativo correspondiente a raíces coincidentes de la Ec. (36)
- v : velocidad de congelación
- \bar{v} : velocidad media de congelación lineal
- V : volumen molar
- w_i : fracción superficial cristalina
- W_i : frecuencia acumulada de la fracción superficial
- x : variable independiente empleada en Ec. (15). Ec. (16) y Ec. (17)
- y : variable dependiente definida en Ec. (18)
- Y : variable definida en la Fig. 32
- $Z(x)$: función de probabilidad normal

LETRAS GRIEGAS

- α : constante adimensional geométrica en Ec. (27)
- γ : zona donde las dendritas permanecen estables
- Δ : diferencia entre diámetro inicial y final correspondientes a la etapa de fijación
- ΔG_p : diferencia de energía libre entre fases sólida y líquida
- ΔT : subenfriamiento
- Δ^* : exudado adimensional
- δ : penetración del fijador de Carnoy en tejido cárneo
- $\epsilon(x)$: error
- λ : distancia de salto atómico
- ν, ν' : grados de libertad
- π : 3,14159...
- σ : energía libre interfacial
- σ_{SL} : tensión interfacial sólido-líquido
- τ_o : tiempo nominal de congelación
- ϕ : variable definida en la Ec. (34)
- ϕ_o : valor correspondiente a las raíces de la Ec. (36)
- χ^2 : parámetro estadístico
- Ω : variable definida en la Ec. (33)
- ω : fracción de agua congelada

No Lauter

600
/ *mu. fca* *María*