(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 881 761**

(51) Int. CI.:

A23B 4/023 (2006.01)
A23L 3/3535 (2006.01)
A23L 3/3526 (2006.01)
A23L 3/3499 (2006.01)
A23L 3/3508 (2006.01)
A23L 13/40 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2018 PCT/IL2018/050851**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019 WO19026073**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2018 E 18772913 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.05.2021 EP 3661367**

(54) Título: **Compuestos de S-nitrosotiol y sus combinaciones con agentes bloqueadores de nitrosamina para una conservación segura de los alimentos**

(30) Prioridad:

01.08.2017 US 201762539565 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2021

(73) Titular/es:

YISSUM RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD. (100.0%)
Hi-Tech Park, The Edmond J. Safra Campus The Hebrew University of Jerusalem Givat Ram P.O. Box 39135
9139002 Jerusalem, IL

(72) Inventor/es:

TIROSH, OREN;
KANNER, JOSEPH y
SPAIZER-KATZENELSON, ADI

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

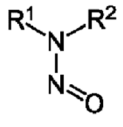
DESCRIPCIÓN

Compuestos de S-nitrosotiol y sus combinaciones con agentes bloqueadores de nitrosamina para una conservación segura de los alimentos

Antecedentes de la invención

El nitrito ha sido utilizado tradicionalmente por la industria cárnica como aditivo para un propósito múltiple: la conservación de la carne (debido a la capacidad única del nitrito para prevenir el crecimiento de *Clostridium botulinum*), el desarrollo del característico color rosa a rojo de la carne y la contribución al sabor.

A pesar de sus propiedades útiles, el nitrito tiene mala fama porque reacciona con las aminas secundarias que se encuentran en la carne (p. ej., en las proteínas). La reacción de nitrito y aminas secundarias conduce a la formación de N-nitrosaminas, que han sido reconocidas como cancerígenas. El término "nitrosamina" se refiere a compuestos químicos de fórmula general I, que tienen grupo N-nitroso (-N-N=O) (R^1 y R^2 representan restos orgánicos):



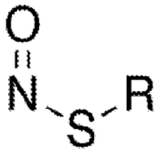
(Fórmula I)

Las nitrosaminas se forman cuando se permite que los nitritos y las aminas secundarias se pongan en contacto en ciertas condiciones, incluido un ambiente fuertemente ácido y altas temperaturas, p. ej., en los procedimientos de cocción y fritura llevados a cabo por la industria cárnica.

Por lo tanto, convencionalmente se incorporan aditivos auxiliares destinados a suprimir la formación de N-nitrosaminas, p. ej., principalmente ácido ascórbico, ácido isoascórbico o sales de los mismos, en productos cárnicos curados con nitritos para actuar como agentes bloqueadores de nitrosaminas. Pero estos aditivos auxiliares solo pueden reducir el nivel de formación de N-nitrosamina en productos cárnicos curados con nitrito en un grado limitado.

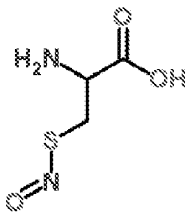
Un mejor enfoque para resolver el problema de la formación de N-nitrosamina es, por supuesto, localizar sustitutos de nitritos, que presenten una acción conservante comparable a la del nitrito, pero con menor reactividad hacia la amina secundaria y la formación de N-nitrosamina. Pero hasta ahora, ningún sustituto del nitrito ha podido ganar aceptación comercial, aparentemente debido al efecto incomparable que posee el nitrito, en particular como un conservante potente contra las bacterias formadoras de toxinas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, en el documento US 3 966 974 se ha propuesto utilizar nitritos orgánicos en lugar de nitrito de sodio. En el documento US 4 346 117 se ensayaron las sales de hipofosfito metálico, p. ej., $Na(H_2PO_2)$ como sustitutas del nitrito de sodio. El documento US 4 559 234 describe que se podría conseguir un producto cárnico sin nitrito indistinguible de la carne curada con nitrito con la ayuda de una composición de curado que comprenda dinitrosilferrohemocromo, es decir, complejo de hierro-azufre-nitrosilo (Fe-S-NO), un antioxidante y un agente antimicrobiano.

Una revisión sobre nitritos y compuestos de nitrosilo en la conservación de alimentos [Canmmack et al. en *Biochimica et Biophysica Acta* 1411 pág. 475-488 (1999)], menciona diferentes tipos de compuestos bacteriostáticos relacionados con los nitritos, incluidos los S-nitrosotioles. Los S-nitrosotioles son compuestos representados, en su forma más general, por la fórmula II:



(Fórmula II)

donde R es un resto orgánico. El documento AU199877492B2 describe el uso de S-nitroso-N-acetilpenicilamina en la conservación de la carne. Incze et al. [*Applied Microbiology* pág. 202-205 (1974)] describieron que un compuesto de fórmula II donde R es cisteína presenta una actividad antimicrobiana mayor que el nitrito en varias bacterias. Los autores del artículo luego sugirieron que el compuesto en consideración, es decir, la S-nitrosocisteína, que tiene la estructura química que se muestra a continuación:



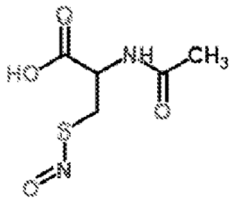
potencialmente podría sustituir al nitrito en la conservación de la carne, basado en el supuesto de que la formación de N-nitrosaminas probablemente sea menor cuando se usa S-nitrosocisteína como aditivo, en comparación con el uso directo de nitrito.

Pero los resultados experimentales descritos a continuación indican que el nitrito de sodio y la S-nitrosocisteína son aproximadamente comparables en términos de formación de N-nitrosaminas y, en algunas condiciones, el uso de S-nitrosocisteína puede incluso conducir a una mayor producción de N-nitrosaminas. En el trabajo experimental realizado en apoyo de esta invención, se investigó la conversión de una amina secundaria característica (N-metil-anilina) en la nitrosamina correspondiente en presencia de nitrito de sodio y S-nitrosocisteína en condiciones de pH ácido para simular el estómago y condiciones de pH casi neutro para estimular la carne. También se estudiaron el efecto de la concentración de aditivo y la temperatura de reacción. Los resultados mostrados a continuación, que indican que la S-nitrosocisteína realmente no puede sustituir al nitrito como conservante de alimentos, parecen estar en línea con los datos comunicados por Dennis et al. [*Journal of the Science of Food and Agriculture* (1980), 31 (11), 1195-2000], donde se demostró que el nitrito y la S-nitrosocisteína producen un efecto similar en términos de formación de nitrosamina.

Sumario de la invención

Las formas modificadas de S-nitroso-cisteína (p. ej., los derivados de N-acilo) han surgido de los estudios que se describen a continuación como sustitutos efectivos del nitrito en los alimentos. Se ha mostrado que estos derivados generan cantidades sorprendentemente inapreciables de nitrosamina a partir de la reacción con amina secundaria, es decir, significativamente menores que las cantidades medidas para las reacciones paralelas de aminas secundarias con el conservante nitrito de sodio o S-nitroso-cisteína actualmente utilizado.

Por tanto, la presente invención se dirige a un procedimiento para tratar alimentos (incluyendo bebidas), por ejemplo, un procedimiento de curado de carne, que comprende la etapa de añadir al alimento S-nitroso-N-acetilcisteína (S-nitroso-N-acetil-L-cisteína, a veces abreviada aquí NAC-SNO):



Fórmula III-A-1

o una sal fisiológicamente aceptable o éster de alquilo C1-C5 de la misma.

Se pueden usar sales no tóxicas, preferiblemente solubles en agua y derivados de éster de alquilo C1-C5 de los ácidos de Fórmula III-A-1, incluyendo sales metálicas. En general, el ácido libre de Fórmula III-A-1 presenta buena solubilidad en agua a pH casi neutro y se puede añadir a la carne mediante inyección de soluciones acuosas como se describe a continuación.

Cabe señalar que los derivados de S-nitrosocisteína de fórmula III-A-1 que se contemplan en la invención incluyen derivados del enantiómero L natural, el enantiómero D y mezclas de los mismos. Por tanto, la fórmula presentada en el presente documento debe entenderse en consecuencia. Sin embargo, preferiblemente, el compuesto de Fórmula III-A-1 es un derivado de L-cisteína.

Los ensayos descritos a continuación también muestran que una mezcla de un compuesto de Fórmula III-A-1 (S-nitroso-N-acetilcisteína) con aditivos que se usan convencionalmente para inhibir la formación de nitrosamina en la carne, tal como el ácido ascórbico, genera un efecto muy bueno en condiciones de almacenamiento en una nevera. A 4ºC, se ha mostrado que estas mezclas reducen la formación de nitrosamina en mayor medida que las mezclas comparativas (es decir, mezclas que consisten en nitrito de sodio/ácido ascórbico y S-nitrosocisteína/ácido ascórbico).

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para tratar alimentos (incluyendo bebidas), por ejemplo, un procedimiento de curado de carne, que comprende la etapa de añadir al alimento o bebida una mezcla de un compuesto de Fórmula III-A-1 y un inhibidor de la formación de nitrosamina, tal como ácido ascórbico, ácido isoascórbico o una sal o éster de los mismos fisiológicamente aceptable, u otros depuradores de especies oxidantes de NO. Una mezcla de un compuesto de Fórmula III-A-1 y ácido ascórbico, ácido isoascórbico o una sal o éster de los mismos fisiológicamente aceptable, y su uso como aditivo alimentario para inhibir la formación de nitrosamina forman aspectos adicionales de la invención. Estas mezclas generalmente estarían en una proporción de aproximadamente 1:0.1 a 1:50, p. ej., de 1:1 a 1:10 (relación en peso de Fórmula III-A-1:vitamina C).

El compuesto de Fórmula III-A-1 se puede incorporar a la carne en una forma sólida o líquida junto con otros aditivos. Por lo tanto, la invención también proporciona una composición para curar carne que comprende un compuesto de Fórmula III-A-1 y al menos un aditivo de carne, en donde el aditivo es cloruro de sodio, y opcionalmente uno o más aditivos de carne seleccionados del grupo que consiste en cloruro de potasio, azúcar, antioxidantes, inhibidores de la formación de nitrosaminas que comprenden uno o más de ácido ascórbico y sales o ésteres del mismo fisiológicamente

aceptables, aditivos de sabor y una mezcla de los mismos. La composición para el tratamiento de la carne, por ejemplo, una composición líquida que comprende agua, cloruro de sodio y un compuesto de Fórmula III-A-1 disuelto o disperso en la misma, opcionalmente junto con otros aditivos como se describe con más detalle a continuación, también forman parte de la invención.

Descripción detallada de la invención

Los compuestos de Fórmula III-A-1 están disponibles comercialmente o pueden sintetizarse por métodos conocidos en la técnica. Los compuestos de Fórmula III-A-1 se preparan generalmente a partir de la reacción del correspondiente tiol con nitrito alcalino en un ambiente fuertemente ácido en atmósfera inerte, como se ilustra en Kanner J. y Juven B.J., 1980, *J. sci.* 45 (5), 1105-1108. El material de partida de tiol requerido para esta reacción, p. ej., cisteína N-monoacilada, está disponible comercialmente o puede prepararse por métodos conocidos descritos en el documento US 3 184 505 y referencias mencionadas en el mismo, que ilustran la síntesis de N-acetil-cisteína, N-propionil-cisteína y N-butiril-cisteína.

Los derivados de éster de Fórmula III-A-1 se describen en el documento US 6 613 937 y Bonnett et al. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* (1972-1999) (1979), (8), 1069-7.

Cabe señalar que los compuestos de Fórmula III-A-1 se pueden utilizar en forma de soluciones acuosas o de sólidos (p. ej., polvos cristalinos o liofilizados).

El compuesto de Fórmula III-A-1, o más preferiblemente, una mezcla de un compuesto de Fórmula III-A-1 con uno o más inhibidores de la formación de nitrosaminas, especialmente vitamina C, se puede usar en productos avícolas (por ejemplo, aves ahumadas tales como pechugas de ave ahumadas y rollos de ave ahumada); carne en conserva; y otros productos cárnicos tales como jamón o beicon y salchichas a base de carne. Por supuesto, esta es una lista no limitante de los principales productos cárnicos. Otros productos a mencionar incluyen pescado, queso, cerveza y otros productos actualmente conservados con solución de encurtido de nitrito. El compuesto de Fórmula III-A-1 se añade al producto alimenticio en una concentración suficiente para ejercer su efecto útil, por ejemplo, se añaden a la carne al menos 20 ppm del compuesto de Fórmula III-A-1, por ejemplo, de 30 a 1000 ppm, más específicamente de 50 a 500 ppm, p. ej., de 100 a 400 ppm, por ejemplo, de 100 a 200 ppm. El procedimiento de la invención permite una adición reducida de nitrito a la carne: el nitrito se puede añadir en cantidades inferiores a las actualmente aceptables en la industria, p. ej., por debajo de 150 ppm, es decir, 0 - 150 ppm, preferiblemente por debajo de 120 ppm, p. ej., por debajo de 75 ppm en la carne. El procedimiento de la invención puede estar desprovisto de la adición de nitrito.

Los aditivos conocidos en la técnica como "inhibidores de la formación de nitrosamina", "agente bloqueador de la formación de nitrosamina", "depuradores de nitrosamina" y similares son compuestos químicos capaces de prevenir o bloquear o reducir la formación o actividad de una nitrosamina, especialmente en alimentos. p. ej. alimentos en conserva, tales como, pero no limitados a carne, queso, pescado, productos de cerveza de malta. Ejemplos de dichos agentes bloqueadores de la formación de nitrosamina que son adecuados para su uso en la invención, incluyen vitamina C (ácido ascórbico y derivados del mismo (p. ej., palmitato de ascorbilo), que se ha mostrado que funcionan sorprendentemente bien junto con el compuesto de Fórmula III- A-1), vitamina E y derivados de la misma, la sal sódica del ácido eritórbico, fenoles, polifenoles, tales como ácido gálico, ácido tánico y compuestos que contienen tiol. Otros ejemplos de depuradores de nitrosonio incluyen benzoatos, tocoferoles, tocotrienoles, tiocianatos, BHT, BHA, TBHQ y derivados, sulfitos, betalaínas y derivados, carotenoides, retinoles, glucosinolatos, maltol y en general agentes reductores solos o en diferentes cantidades juntos para generar efectos sinérgicos.

Como se señaló anteriormente, el compuesto de Fórmula III-A-1 se puede añadir a la carne en una forma sólida, es decir, se puede añadir a la carne una mezcla que comprende un compuesto de Fórmula III-A-1, un inhibidor de la formación de nitrosamina y aditivos convencionales tales como cloruro de sodio y azúcares sin añadir agua, por ejemplo, frotando la carne con la composición sólida y dejando que el ingrediente se difunda dentro de la carne durante un período de tiempo adecuado. Por tanto, la invención también proporciona una composición sólida para el tratamiento de carne que comprende un compuesto de fórmula III-A-1, cloruro de sodio y/o uno o más azúcares. Por ejemplo, la invención proporciona una mezcla de sal de curado que comprende de 0.5 a 20% en peso de un compuesto de Fórmula III + de 80 a 99.5% de cloruro de sodio, p. ej., de 2 a 20% en peso de un compuesto de Fórmula III-A-1 + de 80 a 98% de cloruro de sodio. La mezcla de sal de curado puede contener además nitrito en una cantidad menor que la que se usa actualmente en mezclas comerciales, p. ej., de 0 a 5% en peso de nitrito.

Otro método para incorporar el compuesto de Fórmula III-A-1 en la carne es con la ayuda de una composición líquida para el tratamiento de carne que comprende agua, el compuesto de Fórmula III, cloruro de sodio, opcionalmente azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa, es decir, un monosacárido o un disacárido) y opcionalmente uno o más de los inhibidores de la formación de nitrosamina mencionados anteriormente, por ejemplo, ácido ascórbico. Por ejemplo, las salmueras acuosas adecuadas contienen, en peso, además de agua y un compuesto de Fórmula III-A-1 en una cantidad suficiente para proporcionar aproximadamente de 20 a 1000 ppm del compuesto de Fórmula III-A-1 en la carne, también los siguientes ingredientes (% en peso (g/100 g):

desde 0.05% hasta el límite de solubilidad del cloruro de sodio, p. ej., de 5 a 25% de NaCl (más específicamente, la concentración de la sal en la salmuera acuosa se ajusta para suministrar no más de 10% de NaCl a la carne,

generalmente aproximadamente 2% en p/p de sal del contenido acuoso de la carne);

opcionalmente de 0.05 a 15% en peso de azúcares, p. ej., de 1 a 10%, y

de 0.05 a 5% en peso y ésteres de ácido ascórbico, ácido isoascórbico o sales de los mismos (la concentración del ácido ascórbico en la salmuera acuosa se ajusta para suministrar aproximadamente de 400 a 500 mg de ácido ascórbico por kilogramo de carne).

La composición líquida para el tratamiento de carne se aplica utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, la composición se podría inyectar o bombear dentro de la carne con la ayuda de agujas adecuadas. Alternativamente o además, la carne se sumerge en la composición líquida para empapar, es decir, durante un tiempo suficiente para permitir la difusión del líquido por toda la carne. Los procedimientos detallados para producir productos cárnicos, tales como pavo ahumado entero y pollo picado ahumado usando soluciones de encurtido se pueden encontrar en el documento US 4 346 117 (por supuesto, sustituyendo el hipofosfito de sodio en las soluciones de encurtido del documento US 4 346 117 con el aditivo de Fórmula III-A-1 según la invención).

Cabe señalar que el procedimiento de la invención, que incluye la incorporación de un compuesto de Fórmula III-A-1 en la carne, preferiblemente junto con uno o más depuradores de nitrosonio, también puede incluir una etapa para proporcionar un ambiente con bajo contenido de oxígeno, p. ej. creando vacío o purgando con nitrógeno (u otro gas inerte) para reemplazar el oxígeno con el gas inerte en todas las etapas de la preparación, envasado, almacenamiento y comercialización de productos alimenticios. Es decir, la adición del compuesto de Fórmula III-A-1 tiene lugar antes, simultáneamente con o después de la creación de vacío (u otro gas inerte) o la formación de un ambiente con bajo contenido de oxígeno.

Un producto alimenticio que contiene al menos 10 ppm, p. ej., 20 ppm de un compuesto de Fórmula III-A-1 (como tal, o en la forma obtenida tras la liberación de NO, es decir, el tiol libre correspondiente, o en ambas formas), p. ej., de 30 a 1000 ppm, más específicamente de 50 a 500 ppm, p. ej., al menos 100 ppm (de 100 a 400 ppm, por ejemplo, de 100 a 200 ppm); y al menos 20 ppm, al menos 30 ppm, y preferiblemente también al menos 50 ppm de ácido ascórbico u otros agentes bloqueadores, constituye otro aspecto de la invención. El producto alimenticio (p. ej., carne) puede estar libre de nitritos, pero debe tenerse en cuenta que el compuesto de Fórmula III-A-1 no se usa necesariamente para eliminar el nitrito por completo, sino más bien para reducir la cantidad de nitrito añadido. Por lo tanto, en algunas realizaciones, también se proporciona un producto cárnico curado con nitrito que comprende nitrito en una concentración de hasta 150 ppm (0 - 150 ppm), p. ej., de 5 a 120 ppm, y preferiblemente por debajo de 75 ppm, junto con el aditivo de la invención.

El compuesto de Fórmula III-A-1 puede usarse junto con sales de nitrito o S-nitrosocisteína para lograr efectos beneficiosos. Un ejemplo en el que el compuesto de Fórmula III y el nitrito se pueden aplicar juntos para lograr un mejor efecto es mediante la inyección de una sal de nitrito a la carne de manera que esté presente durante las etapas convencionales de calentamiento, cocción y/o ahumado. El nitrito se añade en un nivel bastante bajo, con el fin de beneficiarse de la acción única del nitrito (efectos de color y bacteriostáticos), pero sin dejar restos de nitrito en el producto cocido/ahumado. El compuesto de Fórmula III-A-1 se añade para compensar el nivel de carga reducido del nitrito; la adición del compuesto de Fórmula III puede tener lugar antes, durante o después del calentamiento, mediante pulverización, cepillado o utilizando una segunda etapa de inyección antes del envasado.

Los compuestos de Fórmula III-A-1 se utilizan en procedimientos para tratar alimentos, para cumplir uno o más propósitos tales como reducir microorganismos (p. ej., reducir el número de microorganismos, inhibir (o ralentizar) el aumento en el número de microorganismos a lo largo del tiempo, prevenir o eliminar el crecimiento de microorganismos, p. ej., de los microorganismos mencionados en el presente documento), mejorar el color y contribuir al sabor. Los resultados experimentales descritos a continuación muestran que el compuesto de Fórmula III-A-1 (S-nitroso-N-acetilcisteína) ofrece una serie de beneficios. En un sistema de modelo de carne, donde se usó N-metilanilina como referencia para evaluar la formación de N-nitrosamina (es decir, N-nitroso-metilanilina) en presencia de nitrito de sodio, S-nitroso-cisteína y S-nitroso-N-acetilcisteína, junto con cloruro de sodio y ácido ascórbico habitualmente añadidos a productos cárnicos, se encontró que la conversión de la N-metilanilina en la N-nitrosamina correspondiente se produce en un menor grado en presencia de S-nitroso-N-acetilcisteína en comparación con nitrito de sodio y S-nitroso-cisteína. En un ambiente ácido que simula las condiciones del estómago, la ventaja de la S-nitroso-N-acetilcisteína sobre el nitrito de sodio es aún más significativa. Durante el almacenamiento de la carne en bolsas de envasado al vacío, la conversión de la N-metilanilina en la N-nitrosamina correspondiente se produce de forma más apreciable en la carne con adición de nitrito, o en la carne con adición de (S-nitroso-cisteína), que en la carne con adición de (S-nitroso-N-acetilcisteína); en el último caso, se encontró que el nivel de N-nitrosamina era esencialmente constante durante el período de almacenamiento ensayado. La aplicación de condiciones de alto vacío durante el almacenamiento inhibe la conversión de N-metilanilina en la N-nitrosamina correspondiente tanto para la carne con adición de nitrito como para la carne con adición de S-nitrosocisteína en comparación con las condiciones aerobias; pero los niveles de N-nitrosamina eran aún más altos que los medidos en la carne con adición de (S-nitroso-N-acetilcisteína). Por tanto, los resultados indican la sensibilidad del nitrito y la S-nitroso-cisteína al nivel de oxígeno en el entorno del producto: cuanto mayor es el nivel de oxígeno, mayor es la producción de N-nitrosamina por estos aditivos. Por el contrario, la S-nitroso-N-acetilcisteína es bastante insensible a los cambios en los niveles de oxígeno y no respondería al aumento en el nivel de oxígeno (es decir, debido a la penetración de oxígeno en el envase) mediante una mayor producción de N-nitrosamina. Con la S-nitroso-N-acetilcisteína, la producción de N-nitrosamina permanece bastante baja y constante tanto en condiciones anaerobias como aerobias. La

S-nitroso-N-acetilcisteína muestra además una buena estabilidad durante largos períodos de almacenamiento a 4ºC. En resumen, la S-nitroso-N-acetilcisteína demuestra una menor reactividad como agente de nitrosilación hacia las aminas secundarias en comparación con el nitrito y la S-nitroso-cisteína en condiciones que simulan la producción y el envasado de carne y la digestión en el estómago.

Además, los resultados experimentales descritos a continuación muestran que la S-nitroso-N-acetilcisteína muestra una actividad antimicrobiana adecuada, al menos comparable a la del nitrito. Otras funciones importantes que desempeña el nitrito en la industria cárnica (conservación del color de la carne y mejora del sabor de la carne) se cumplen al menos igualmente bien con la S-nitroso-N-acetilcisteína. De hecho, como se muestra a continuación, la carne con adición de (S-nitroso-N-acetilcisteína) conserva excelentes propiedades de color durante períodos de tiempo más largos que la carne con adición de nitrito.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama de barras que ilustra la producción de N-nitroso-metilanilina a 37ºC (reacción de 30 min) por una reacción de N-metilanilina con diferentes agentes descritos en el Ejemplo 1 a continuación. Las flechas indican la cantidad por debajo del límite de detección.

La Figura 2 es un diagrama de barras que ilustra la producción de N-nitroso-metilanilina a 37ºC (reacción de 30 min) por una reacción de N-metilanilina con diferentes agentes descritos en el Ejemplo 2 a continuación.

La Figura 3 muestra la cinética de la formación de N-nitroso-metilanilina para una reacción a pH 6.2 de N-metilanilina con S-nitroso-cisteína (2.5 mM) (curva superior) y una reacción de N-metilanilina con S-nitroso-N-acetil-cisteína (2.5 mM) (curva inferior).

La Figura 4 es un diagrama de barras que ilustra la producción de N-nitroso-metilanilina a 4ºC (reacción de 24 h) por una reacción de N-metilanilina con diferentes agentes descritos en el Ejemplo 3 a continuación.

Las Figuras 5A-5F muestran los resultados de un estudio donde se formaba N-nitroso-metilanilina por una reacción de N-metilanilina con diferentes agentes en un sistema de modelo de carne en diversas condiciones.

Las Figuras 6A-6C ilustran el efecto de los aditivos en el color de la carne.

La Figura 7 es un diagrama de barras que muestra el recuento de colonias aerobias después de tres meses de bacterias naturales, en pastrami de paleta de vaca ahumada preparado con nitrito o S-nitroso-N-acetilcisteína (las placas se incubaron a 30ºC durante 24 horas, luego se contaron las colonias y se calcularon las UFC).

La Figura 8 es un diagrama de barras que muestra el recuento de colonias aerobias después de 0 a 4 semanas de bacterias naturales, en paleta de vaca picada tratada con nitrito, S-nitroso-cisteína (Cys-SNO) o S-nitroso-N-acetilcisteína (NAC-SNO) (las placas se incubaron a 30ºC durante 24 horas, luego se contaron las colonias y se calcularon las UFC).

La Figura 9 es un diagrama de barras que muestra el crecimiento bacteriano después de 24 h a 37ºC determinado midiendo la DO a 595 nm de suspensión de C. *perfringens* tratada con NAC-SNO 2.5 mM o DDW como control.

Ejemplos

Materiales

El citrato trisódico, ácido clorhídrico (HCl) al 37%, N-metilanilina, ácido L-ascórbico (AA), nitrito de sodio, L-cisteína y N-acetil-L-cisteína se adquirieron de Sigma-Aldrich (EE. UU.). El acetonitrilo, agua y cloruro de sodio se adquirieron de J.T.Baker (EE. UU.). El ácido cítrico se obtuvo de Bio-Lab Ltd. (Israel). El tampón de citrato se preparó mezclando cantidades apropiadas de ácido cítrico 0.1 M y citrato trisódico 0.1 M, el pH se ajustó usando HCl. Todos los disolventes eran de calidad HPLC. La carne de vaca picada fresca se compró en un supermercado local.

Métodos

La separación por HPLC se realizó en un sistema de HPLC de Merck/Hitachi que consistía en una bomba LaChrom L 7100 y un detector LaChrom DAD L 7450. El sistema funcionaba con un procesador de datos que trabaja con una interfaz LaChrom D 7000 y el software EZChrom Elite 3.3.1. La mezcla se separó en una columna Kinetex EVO C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) usando un sistema de elución en gradiente, el disolvente A era acetonitrilo al 5% en agua (v/v) y B era acetonitrilo. Las condiciones de gradiente eran, iniciales = 0% de B, 25 min = 70% de B y 30 min = 100% de B. El caudal era constante a 1.0 ml.min-1. El volumen del bucle de inyección era de 20 µl, la absorbancia se controló a 272 nm.

Preparación 1

Preparación de S-nitrosotioles

Los S-nitrosotioles se sintetizaron haciendo reaccionar cantidades equimolares de nitrito de sodio y el tiol

correspondiente, es decir, L-cisteína o N-acetil-L-cisteína, en HCl (1 M). La reacción tuvo lugar en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 5 minutos, momento en el que se desarrolló un color rojo característico.

Los S-nitrosotioles así formados: S-nitroso-cisteína y S-nitroso-acetil-cisteína, se cuantificaron midiendo la absorbancia UV a 334 nm. Los coeficientes de extinción se estimaron a partir de los espectros de UV de los S-nitrosotioles no purificados basándose en la cantidad de tiol usada en la reacción y asumiendo que la reacción se completaba. La S-nitroso-cisteína y S-nitroso-acetil-cisteína no se aislaron de las mezclas de reacción y se usaron en forma de soluciones en los experimentos que se describen a continuación.

Ejemplo 1

Formación de N-nitroso-N-metilanilina a partir de la reacción de N-metilanilina con nitrito de sodio (comparativo), S-nitroso-cisteína (comparativo) y S-nitroso-N-acetilcisteína (de la invención) a 37ºC

Las mezclas de reacción se prepararon mezclando en tampón de citrato, a pH = 3.0 simulando las condiciones del estómago y a pH = 6.2 simulando las condiciones de la carne, N-metilanilina (0.25 mM) y NaCl (0.25 mM) junto con una cantidad equimolar del agente de nitrosilación ensayado, utilizado solo o en combinación con ácido ascórbico, como se expone a continuación:

1. Nitrito de sodio (0.25 mM);

2. Nitrito de sodio (0.25 mM) + ácido ascórbico (1 mM);

3. S-nitroso-cisteína (0.25 mM);

4. S-nitroso-cisteína (0.25 mM) + ácido ascórbico (1 mM);

5. S-nitroso-cisteína (0.25 mM) + ácido ascórbico (2 mM);

6. S-nitroso-N-acetilcisteína (0.25 mM)

7. S-nitroso-N-acetilcisteína (0.25 mM) + ácido ascórbico (1 mM)

8. S-nitroso-N-acetilcisteína (0.25 mM) + ácido ascórbico (2 mM)

El recipiente de reacción se puso en un baño de agua a 37ºC durante 30 minutos. La mezcla de reacción se transfirió posteriormente al HPLC para el análisis del producto de reacción, la N-nitroso-metilanilina. Los resultados del análisis de HPLC, para la reacción a pH 3.0 y para la reacción a pH 6.2, se muestran en forma de diagramas de barras en la Figura 1 (con flechas que indican resultados por debajo del límite de detección).

El análisis de HPLC indica que la S-nitroso-N-acetilcisteína, ya sea sola o en combinación con ácido ascórbico, es capaz de suprimir la formación de nitrosamina (es decir, N-nitroso-metilanilina) mucho más eficazmente que el nitrito de sodio o la S-nitrosocisteína.

Ejemplo 2

Formación de N-nitroso-N-metilanilina a partir de la reacción de N-metilanilina con nitrito de sodio (comparativo), S-nitroso-cisteína (comparativo) y S-nitroso-N-acetilcisteína (de la invención) a 37ºC

Se repitió el experimento del Ejemplo 1 con un aumento de diez veces de la concentración de los reaccionantes. Es decir, las mezclas de reacción se prepararon mezclando en tampón de citrato, a pH = 3.0 y a pH = 6.2, N-metilanilina (2.5 mM) y NaCl (2.5 mM) junto con una cantidad equimolar del agente de nitrosilación ensayado, usado solo o en combinación con ácido ascórbico, como se expone a continuación:

1. Nitrito de sodio (2.5 mM);

2. Nitrito de sodio (2.5 mM) + ácido ascórbico (2.5 mM);

3. S-nitroso-cisteína (2.5 mM);

4. S-nitroso-cisteína (2.5 mM) + ácido ascórbico (2.5 mM);

5. S-nitroso-N-acetilcisteína (2.5 mM)

6. S-nitroso-N-acetilcisteína (2.5 mM) + ácido ascórbico (2.5 mM).

Los resultados del análisis de HPLC, para la reacción a pH 3.0 y para la reacción a pH 6.2, se presentan en forma de diagramas de barras en la Figura 2. La S-nitroso-N-acetilcisteína sale victoriosa también de este estudio, es decir, de los experimentos llevados a cabo en el régimen de alta concentración.

La Figura 3 muestra la cinética de la formación de N-nitroso-metilanilina a partir de la reacción de S-nitroso-cisteína (2.5 mM) y N-metil anilina (2.5 mM) a pH 6.2 (la curva superior) y de la reacción de S-nitroso -N-acetilcisteína (2.5 mM) y N-metilanilina (2.5 mM) a pH 6.2 (la curva inferior), controlado midiendo la absorbancia de UV a 270 nm a lo largo de esta.

Se ve a partir de los gráficos de absorbancia frente al tiempo que la S-nitroso-cisteína reacciona rápidamente con la N-metilanilina para producir cantidades progresivamente crecientes de nitrosamina. Por el contrario, la formación de nitrosamina es significativamente menor para la reacción de la S-nitroso-N-acetilcisteína y la N-metil-anilina y permanece sin cambios después de un breve período de tiempo.

Ejemplo 3

Formación de N-nitroso-N-metilanilina a partir de la reacción de N-metilanilina con nitrito de sodio (comparativo), S-nitroso-cisteína (comparativo) y S-nitroso-N-acetilcisteína (de la invención) a 4ºC

Se repitió el experimento del Ejemplo 2, pero esta vez la reacción tuvo lugar a 4ºC durante 24 h y pH 6.2, para simular las condiciones que se utilizan para el almacenamiento a largo plazo de la carne. Es decir, las mezclas de reacción se prepararon mezclando en tampón de citrato, a pH = 6.2, N-metilanilina (2.5 mM) y NaCl (2.5 mM) junto con una cantidad equimolar del agente de nitrosilación ensayado, usado solo o en combinación con ácido ascórbico, como se expone a continuación:

1. Nitrito de sodio (2.5 mM);

2. Nitrito de sodio (2.5 mM) + ácido ascórbico (2.5 mM);

3. S-nitroso-cisteína (2.5 mM);

4. S-nitroso-cisteína (2.5 mM) + ácido ascórbico (2.5 mM);

5. S-nitroso-N-acetilcisteína (2.5 mM)

6. S-nitroso-N-acetilcisteína (2.5 mM) + ácido ascórbico (2.5 mM).

El recipiente de reacción se mantuvo a 4ºC durante veinticuatro horas. Los resultados del análisis de HPLC de los niveles de N-nitroso-metilanilina se presentan en forma de diagrama de barras en la Figura 4. Es evidente que, en condiciones de almacenamiento, la combinación de S-nitroso-N-acetilcisteína y vitamina C funciona sorprendentemente bien, viéndose que es capaz de reducir la formación de N-nitroso-metilanilina de forma muy eficaz.

(En los diagramas de barras adjuntos, la posición de las barras, de izquierda a derecha, corresponde al orden de los experimentos descritos).

Ejemplo 4

Formación de N-nitroso-N-metilanilina a partir de la reacción de N-metilanilina con nitrito de sodio (comparativo), S-nitroso-cisteína (comparativo) y S-nitroso-N-acetilcisteína (de la invención) en un sistema de modelo de carne

La carne contiene sustancias que pueden afectar la formación de N-nitrosaminas (p. ej., ácido ascórbico, L-Cys libre y mioglobina). El propósito del estudio descrito en el presente documento era medir la formación de N-nitrosaminas a partir de la amina secundaria N-metilanilina añadida a la carne de vaca picada junto con los agentes de nitrosilación ensayados.

Se llevó a cabo un conjunto de experimentos marcados como A, B, C, D, E y F como se describe específicamente a continuación. En general, se mezclaron N-metilanilina (0.25 mM) y NaCl (0.25 mM) en 1 g de carne de vaca picada. Luego se añadió el aditivo ensayado: nitrito de sodio, S-nitroso-cisteína o S-nitroso-N-acetilcisteína (2.5 mM). Las concentraciones se calcularon como las concentraciones finales en la carne por kg, usando Kg = L. En un experimento (F), las condiciones experimentales se ampliaron para imitar el procesamiento de carne realista (mayor cantidad de cloruro de sodio y adición de ácido ascórbico).

La carne se procesó de acuerdo con una práctica de preparación de carne industrial aceptable (BPF - Buenas prácticas de fabricación), es decir, la carne se calentó a 72ºC (en un baño de agua durante dos minutos para alcanzar esa temperatura en el centro del producto), luego se transfirió a 4ºC para enfriar (30 minutos) o almacenar (24 a 216 horas). Algunas de las muestras se envasaron en bolsas al vacío usando MULTIVAC C100, con el fin de evaluar el efecto del oxígeno sobre la formación de N-nitrosamina en la carne (véanse los experimentos D y E), mientras que el resto de las muestras se pusieron en viales de vidrio cerrados de 4 ml.

Finalmente, la carne se homogeneizó en tampón de citrato. Se añadieron 3 ml de tampón de citrato (pH 6.2) a la carne y la mezcla se homogeneizó usando Kinematica Polytron PT 3000. En un experimento (C), destinado a evaluar la formación de N-nitrosaminas tras la digestión en un ambiente ácido de estómago, se usó tampón citrato a pH 3 para homogeneizar la carne. A continuación, se incubó el homogeneizado a pH 3.0 en un baño de agua a 37ºC durante 30 min para simular las condiciones de digestión del estómago.

Se añadió acetonitrilo (2 ml) al homogeneizado y se agitó con vórtice para la extracción de N-nitrosamina. Después, la mezcla se centrifugó durante 10 min a 4696 x g usando Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R. El líquido sobrenadante se filtró usando un filtro de jeringa de PTFE de 13 mm, 0.45 µm para el análisis por HPLC.

Más específicamente, se llevaron a cabo seis tipos diferentes de experimentos de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente con ciertas variaciones, y los resultados se muestran en las Figuras 5A-5F, respectivamente:

A) La carne se calentó a 72ºC, se enfrió a 4ºC (30 minutos) y luego se homogeneizó inmediatamente en tampón de citrato a pH = 6.2.

B) La carne se calentó a 72ºC, se enfrió a 4ºC, se almacenó a 4ºC durante veinticuatro horas y luego se homogeneizó en tampón de citrato a pH = 6.2.

C) La carne se calentó a 72ºC, se enfrió a 4ºC, se almacenó a 4ºC durante veinticuatro horas, se homogeneizó en tampón de citrato a pH = 3.0 y se incubó a 37ºC durante treinta minutos.

D) Después de envasar en una bolsa de vacío (vacío a 100 mbar), la carne se calentó a 72ºC, se almacenó a 4ºC durante diferentes períodos de tiempo y luego se homogeneizó en tampón de citrato a pH = 6,2.

E) Después de envasar en bolsa de vacío (vacío a 8 mbar), la carne se calentó a 72ºC, se enfrió a 4ºC y luego se homogeneizó inmediatamente en tampón de citrato a pH = 6.2 o después del almacenamiento durante diferentes períodos de tiempo.

F) La carne también se trató con NaCl al 2% (p/p) y ácido ascórbico 3.27 mM (AA, 576 ppm). El producto cárnico se calentó en un baño de agua a 75ºC durante 5 min (la temperatura medida en el centro del producto era de 72ºC durante 3 min) y se almacenó a 4ºC durante 216 h. Después de almacenar la carne se homogeneizó sin o con incubación en tampón de citrato a pH 3.0 durante 30 min a 37ºC (medio del estómago).

Los resultados de estos experimentos se presentan en los gráficos de las Figuras 5A-5F, respectivamente; en los gráficos, Cys-SNO significa S-nitroso-cisteína y NAC-SNO significa S-nitroso-N-acetilcisteína.

Experimentos A-C: Los diagramas de barras indican que inmediatamente después de calentar y enfriar (Figura 5A), las N-nitrosaminas se formaron principalmente por la S-nitroso-cisteína, ~28 µM, mientras que tanto el nitrito de sodio como la S-nitroso-N-acetilcisteína podían mantener los niveles de formación de N-nitrosaminas por debajo de 10 µM. Después de un período de almacenamiento de 24 horas a 4ºC (Figura 5B), la formación por el nitrito y la S-nitroso-N-acetilcisteína aumentó a 15 µM y 13 µM, respectivamente. La formación de N-nitrosaminas por la S-nitroso-cisteína era significativamente mayor que la del nitrito y S-nitroso-N-acetilcisteína. Después del consumo, la carne se digiere en el pH ácido del estómago. Los resultados del experimento que imita estas condiciones se muestran en la Figura 5C. La formación de N-nitrosaminas por el nitrito había aumentado considerablemente, en ocho veces hasta 115 µM. La formación por la S-nitroso-cisteína aumentó a 47 µM. Sin embargo, la formación por la S-nitroso-N-acetilcisteína continuó siendo bastante baja de 15 µM de NA. Los resultados indican la mejor capacidad de la S-nitroso-N-acetilcisteína para suprimir la formación de N-nitrosaminas en un ambiente ácido que el nitrito.

Experimentos D-E: Se evaluó el efecto del oxígeno envasando la carne tratada en bolsas de vacío antes de calentarla. La carne envasada al vacío se calentó luego a 72ºC y se almacenó a 4ºC, y se midió la formación de N-nitrosamina. Con un vacío de 100 mbar (Figura 5D), después de 24 horas de almacenamiento, los tres tratamientos formaron ~19 µM. Sin embargo, durante el almacenamiento, el nivel de N-nitrosaminas aumentó a ~50 µM después de un período de almacenamiento de 192 h en muestras de carne que se trataron con nitrito de sodio y S-nitroso-cisteína, mientras que la formación de N-nitrosaminas no cambió en la muestra con adición de S-nitroso-N -acetilcisteína, y permaneció ~20 µM. En condiciones de vacío más fuertes de 8 mbar (Figura 5E), la formación de N-nitrosamina por el nitrito era dos veces mayor que la de los otros agentes después de 216 h. La formación de N-nitrosamina por el nitrito y la S-nitroso-cisteína se redujo en ~40% en condiciones anaerobias en comparación con condiciones aerobias, mientras que la formación de N-nitrosamina por la S-nitroso-N-acetilcisteína permaneció baja e igual.

Experimento F: Los resultados del experimento que imitan las condiciones de procesamiento de la carne que incluyen la adición de ácido ascórbico y cloruro de sodio a la carne (Figura 5F) muestran que la transferencia de la carne al medio simulado del estómago a pH 3.0 durante solo 30 min generó una alta concentración de N-nitrosamina por el nitrito en presencia de ácido ascórbico: los niveles de N-nitrosaminas aumentaron en más de cuatro veces, de ~20 µM a 90 µM en el medio simulado del estómago. La concentración de N-nitrosaminas que eran generadas en el producto cárnico por la S-nitroso-cisteína y la S-nitroso-N-acetilcisteína casi no cambió después de la transferencia al medio simulado del estómago, a pH 3.0.

En resumen, desde la perspectiva de restringir la formación de N-nitrosaminas, la S-nitroso-N-acetilcisteína emerge claramente como el mejor aditivo del estudio realizado en un sistema de modelo de carne.

Ejemplo 5

El efecto del nitrito de sodio (comparativo), S-nitroso-cisteína (comparativo) y S-nitroso-N-acetilcisteína (de la

invención) sobre el color de la carne

Se sabe que el nitrito es responsable del característico color rosa asociado con los productos cárnicos curados y de la estabilización del sabor. Se compararon el desarrollo de color y la estabilidad del color de la carne de vaca picada tratada con S-nitroso-cisteína y S-nitroso-N-acetilcisteína después de calentar a 72ºC con el color de la carne de vaca picada tratada con nitrito. Se utilizó un colorímetro portátil (X-rite) para medir los valores de luminosidad, rojez y amarillez del color Hunter (L*, a*, b*) de muestras de carne de vaca picada tratadas con los diferentes aditivos y calentadas en un horno microondas (Dow, S-Corea, a 800 W) a 72ºC en el centro. El instrumento se normalizó utilizando placas de referencia blancas y negras.

Los resultados se dan en forma de diagrama de barras en las Figuras 6A y 6B. Había una diferencia significativa en la diferencia de color total (ΔE*) (Figura 6A) y en la rojez (Δa*) (Figura 6B) entre la carne tratada con S-nitrosocisteína o S-nitroso-N-acetilcisteína y la carne tratada con nitrito de sodio. La carne tratada con S-nitroso-cisteína o S-nitroso-N-acetilcisteína era dos veces más roja y con mejor aspecto del color que la carne tratada con nitrito de sodio (no había diferencia en la amarillez (Δb*) entre los tratamientos y, por lo tanto, estos resultados no se muestran). En el tratamiento con RSNO (ya sea S-nitroso-cisteína o S-nitroso-N-acetilcisteína) en condiciones aerobias, el color permanecía estable durante un período de 24 h, mientras que el color en la carne tratada con nitrito disminuía con el tiempo (véase la Figura 6A). Las diferencias son fácilmente visibles también en la foto adjunta como Figura 6C.

Ejemplo 6

Actividad antimicrobiana del nitrito de sodio (comparativo) y S-nitroso-N-acetilcisteína (de la invención) en paleta de vaca ahumada

Procedimiento de fabricación de paleta de vaca ahumada: los ingredientes de la salmuera [agua, almidón modificado (E-1442), maltodextrina, sal, potenciadores del sabor (glutamato monosódico, extracto de levadura), conservantes (lactato de potasio y acetato de potasio y nitrito de sodio o S-nitroso-N-acetilcisteína), fosfato, carragenina, condimentos, antioxidantes (extracto de orégano, ácido ascórbico)] se mezclaron para formar la solución de salmuera. Se añadió S-nitroso-N-acetilcisteína a la salmuera en forma de solución acuosa recién preparada (cantidad equivalente a 150 ppm de nitrito de sodio y 2% de NaCl en el producto final).

A continuación, se añadió la salmuera al 50% (p/p) a la paleta de vaca previamente limpiada de grasa y cortada en cubos grandes. Luego, la carne se volteó al vacío. Con el fin de emulsionar la carne, se transfirió aproximadamente 23% de la carne a un cortador industrial. Posteriormente, la emulsión se mezcló con el resto de la carne volteada en una mezcladora durante varios minutos. A continuación, la carne se embutió en tripa fibrosa, que se transfirió a cocción al vapor hasta que el centro del producto alcanzó una temperatura de 72ºC. A continuación, el producto se enfrió rápidamente a 4ºC, se cortó en rodajas y se envasó en una atmósfera modificada con bajo contenido de oxígeno. El pastrami se almacenó a 4ºC durante tres meses.

Recuento de colonias aerobias de bacterias naturales en el pastrami de paleta de vaca ahumada: Se homogeneizaron 5 g del pastrami fabricado en una fábrica de carne como se describe anteriormente en una trituradora estéril con 45 ml de solución salina estéril, luego se diluyó adicionalmente con solución salina. Los diluyentes se sembraron en placas de agar BHI y se incubaron a 30ºC durante 24 horas, luego se contaron las colonias y se calcularon las UFC.

Los resultados mostrados en forma de diagrama de barras en la Figura 7 indican que la actividad antimicrobiana del nitrito y la S-nitroso-N-acetilcisteína es comparable, viéndose que después de tres meses, al expirar la vida en anaquel del producto, el pastrami tratado desarrolló una concentración similar de bacterias: el pastrami tratado con nitrito desarrolló $8*10^3$ UFC/ml y el pastrami tratado con S-nitroso-N-acetilcisteína $7*10^3$ UFC/ml.

Ejemplo 7

Actividad antimicrobiana del nitrito de sodio (comparativo), S-nitroso-cisteína (comparativo) y S-nitroso-N-acetilcisteína (de la invención) en carne de vaca picada

Se mezclaron 10 g de paleta de vaca picada con 1 ml (25 mM) de solución acuosa del conservante ensayado (nitrito de sodio, S-nitroso-cisteína y S-nitroso-N-acetilcisteína) o DDW para el control y 1 ml de solución de NaCl (10% p/v). Las concentraciones finales eran conservante 2.5 mM (donde kg de carne = L) y NaCl al 1% (p/p). La carne se dividió en porciones de 1 g y se puso en bolsas de vacío abiertas, luego se calentaron en un baño de agua a 75ºC durante 15 min y se sellaron con MULTIVAC C100 con un vacío de 8 mbar. Las bolsas se transfirieron a 4ºC para enfriarlas y almacenarlas. Después de transcurridos periodos de tiempo de 1 hora, 1 semana y 4 semanas, las bolsas se abrieron en una campana y se homogeneizó 1 g de carne en una picadora estéril con 9 ml de solución salina estéril, luego el homogeneizado se diluyó más con solución salina y los diluyentes se sembraron en placas de agar BHI. Las placas se incubaron a 30ºC durante 24 horas, luego se contaron las colonias y se calcularon las UFC.

Los resultados se muestran en forma de diagrama de barras en la Figura 8. Se ve que después de 1 hora de enfriamiento a 4ºC, todos los tratamientos tenían una concentración similar de bacterias $\sim10^2$ - $\sim10^3$. Después de 1 semana de almacenamiento a 4ºC, el recuento de bacterias de la carne tratadas con nitrito tenía un leve aumento a $5.8*10^3$ ufc/ml mientras que la S-nitroso-cisteína y S-nitroso-N-acetilcisteína permanecían en $\sim2.0*10^2$, logrando los

tres tratamientos una concentración de bacterias significativamente menor en comparación con el control ($3.3*10^6$). Después de 4 semanas, la carne tratada con nitrito tenía una concentración de bacterias de $\sim 10^8$ mientras que la carne tratada con Cys-SNO y NAC-SNO tenía una menor concentración de bacterias.

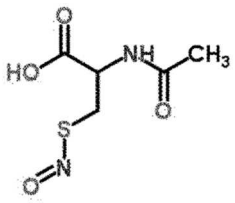
Ejemplo 8

El efecto de NAC-SNO en *Clostridium perfringens*

Se cultivaron células de *C. perfringens* durante la noche a 37ºC en medio fluido de tioglicolato (FTM). Luego, la suspensión bacteriana se diluyó en FTM para alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.1 A a 595 nm. La suspensión se dividió en tubos (7 ml por tubo), luego se añadieron 70 µl de NAC-SNO a los tubos hasta una concentración final de 2.5 mM. Se añadió DDW como control. Los tubos se mezclaron suavemente y se incubaron durante 24 h a 37ºC. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la DO a 595 nm. Los resultados se muestran en forma de diagrama de barras en la Figura 9.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para tratar alimentos, que comprende la etapa de añadir al alimento S-nitroso-N-acetilcisteína:



Fórmula III-A-1

o una sal o éster de alquilo C1-C5 de la misma fisiológicamente aceptable.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la adición de un inhibidor de la formación de nitrosamina al alimento.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2, en donde el inhibidor de la formación de nitrosamina es ácido ascórbico o una sal o éster del mismo fisiológicamente aceptable.

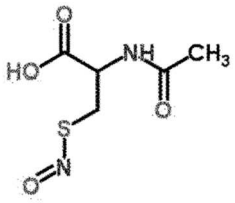
4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se añade a la carne S-nitroso-N-acetilcisteína, una sal o un éster de alquilo C1-C5 de la misma para producir un producto cárnico curado.

5. Un procedimiento según la reivindicación 4, que comprende además añadir nitrito a la carne, de manera que la concentración de nitrito en la carne sea inferior a 150 ppm.

6. Un procedimiento según la reivindicación 4, que carece de adición de nitrito.

7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una etapa de proporcionar un entorno con bajo contenido de oxígeno creando vacío o purgando con gas inerte para reemplazar el oxígeno con gas inerte durante la preparación, envasado o almacenamiento del producto alimenticio.

8. Uso de S-nitroso-N-acetilcisteína:

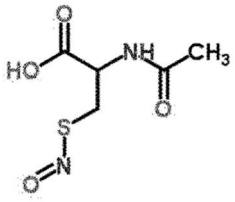


Fórmula III-A-1

o una sal o éster de alquilo C1-C5 de la misma fisiológicamente aceptable como conservante de alimentos.

9. Uso de S-nitroso-N-acetilcisteína, una sal o éster de alquilo C1-C5 de la misma según la reivindicación 8 como agente de curado de carne.

10. Una composición para curar carne que comprende S-nitroso-N-acetilcisteína:



Fórmula III-A-1

o una sal o éster de alquilo C1-C5 de la misma fisiológicamente aceptable y al menos un aditivo de carne, en donde el aditivo es cloruro de sodio, y opcionalmente uno o más aditivos de carne seleccionados del grupo que consiste en cloruro de potasio, azúcar, antioxidantes, inhibidores de la formación de nitrosamina, que comprende uno o más de ácido ascórbico y sales o ésteres del mismo fisiológicamente aceptables, aditivos de sabor y una mezcla de los mismos.

11. Una composición según la reivindicación 10, que es una mezcla de sal de curado que consiste en 0.5 a 20% en peso de S-nitroso-N-acetilcisteína, una sal o éster de alquilo C1-C5 de la misma y de 80 a 99.5% en peso de cloruro de sodio.

12. Producto cárnico que comprende al menos 10 ppm de S-nitroso-N-acetilcisteína, una sal o éster de alquilo C1-C5 de la misma y opcionalmente nitrito, en donde la concentración de nitrito, si está presente, es inferior a 150 ppm.

13. Producto cárnico según la reivindicación 12, que está exento de nitritos, comprendiendo dicho producto al menos 100 ppm de S-nitroso-N-acetilcisteína añadida, una sal o éster de alquilo C1-C5 de la misma.

14. Producto cárnico según una cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13, que además comprende al menos 20 ppm de ácido ascórbico o una sal o éster del mismo fisiológicamente aceptable.

Figura 1

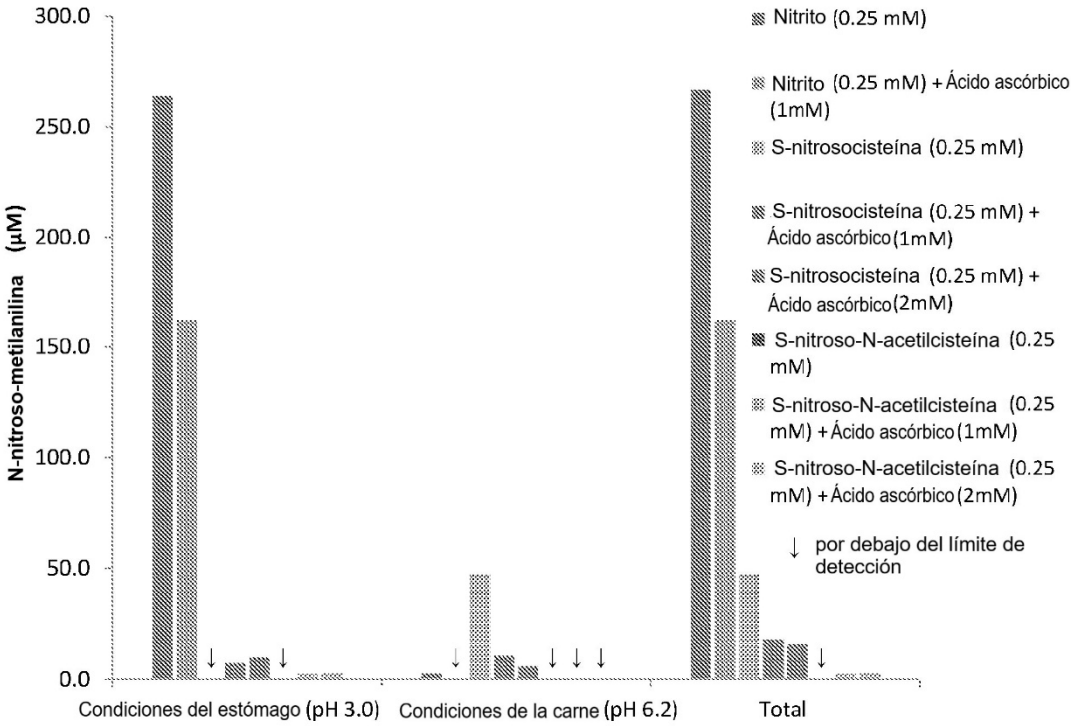

300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
N-nitroso-metilanilina (µM)
Condiciones del estómago (pH 3.0)
Condiciones de la carne (pH 6.2)
Total
Nitrito (0.25 mM)
Nitrito (0.25 mM) + Ácido ascórbico (1mM)
S-nitrosocisteína (0.25 mM)
S-nitrosocisteína (0.25 mM) + Ácido ascórbico (1mM)
S-nitrosocisteína (0.25 mM) + Ácido ascórbico (2mM)
S-nitroso-N-acetilcisteína (0.25 mM)
S-nitroso-N-acetilcisteína (0.25 mM) + Ácido ascórbico (1mM)
S-nitroso-N-acetilcisteína (0.25 mM) + Ácido ascórbico (2mM)
por debajo del límite de detección

FIGURA 2

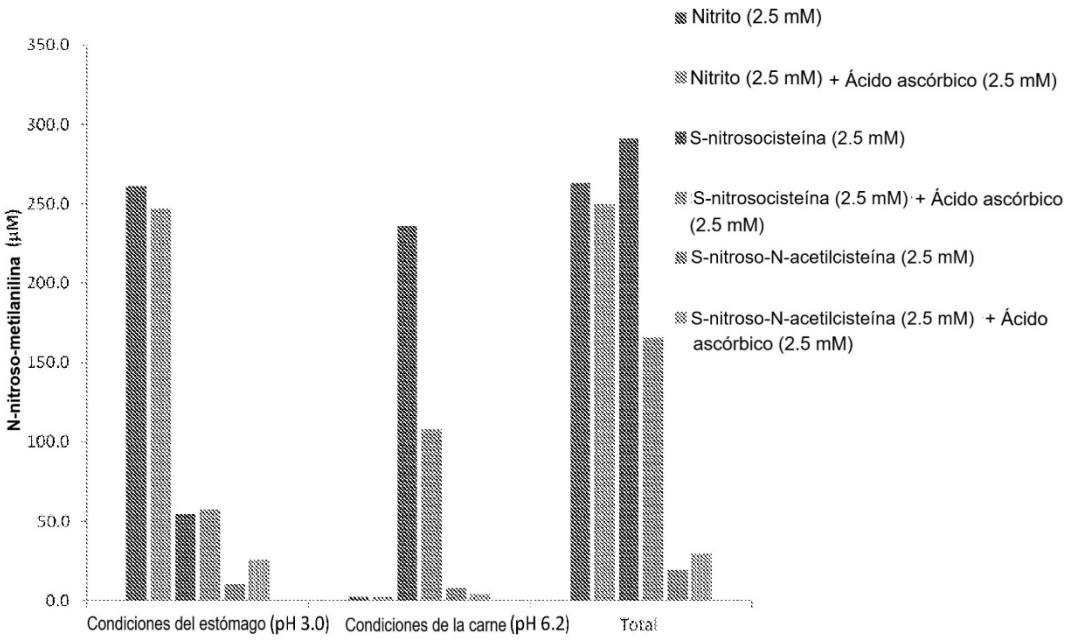

Nitrito (2.5 mM)
Nitrito (2.5 mM) + Ácido ascórbico (2.5 mM)
S-nitrosocisteína (2.5 mM)
S-nitrosocisteína (2.5 mM) + Ácido ascórbico (2.5 mM)
S-nitroso-N-acetilcisteína (2.5 mM)
S-nitroso-N-acetilcisteína (2.5 mM) + Ácido ascórbico (2.5 mM)
N-nitroso-metilanilina (µM)
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
Condiciones del estómago (pH 3.0)
Condiciones de la carne (pH 6.2)
Total

Figura 3

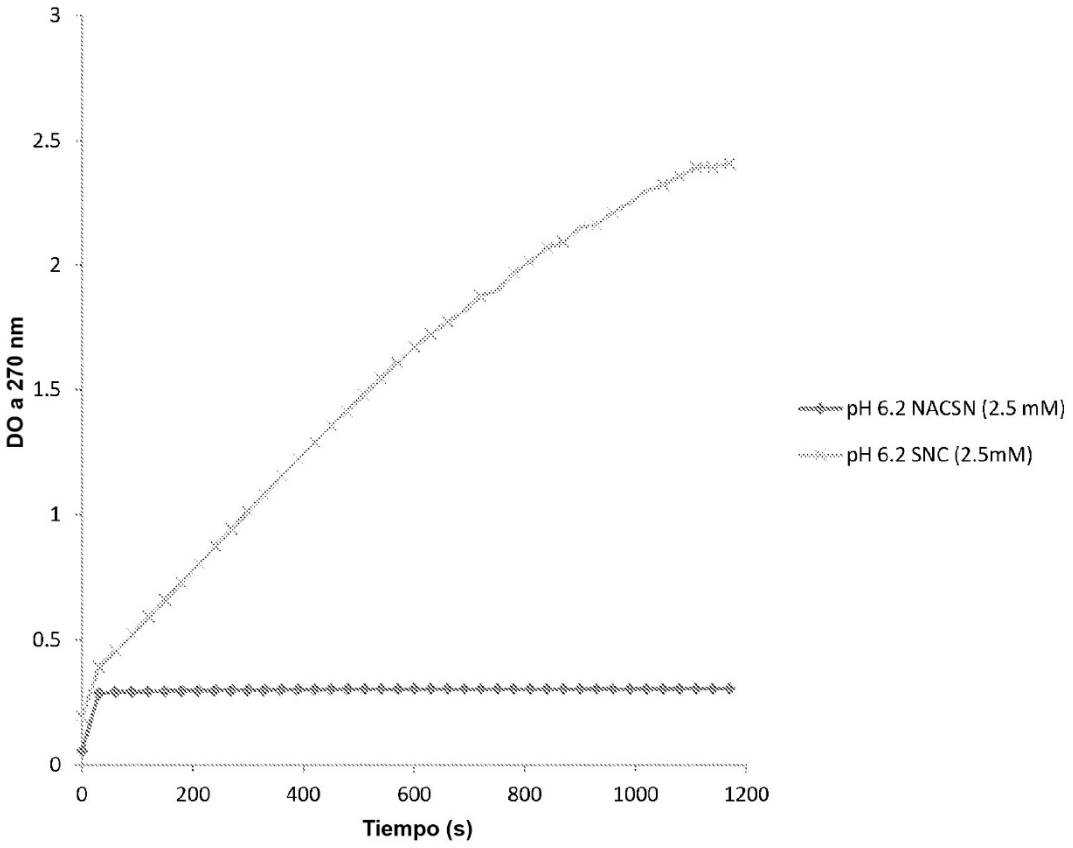

3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
DO a 270 nm
0
200
400
600
800
1000
1200
Tiempo (s)
pH 6.2 NACSN (2.5 mM)
pH 6.2 SNC (2.5mM)

Figura 4

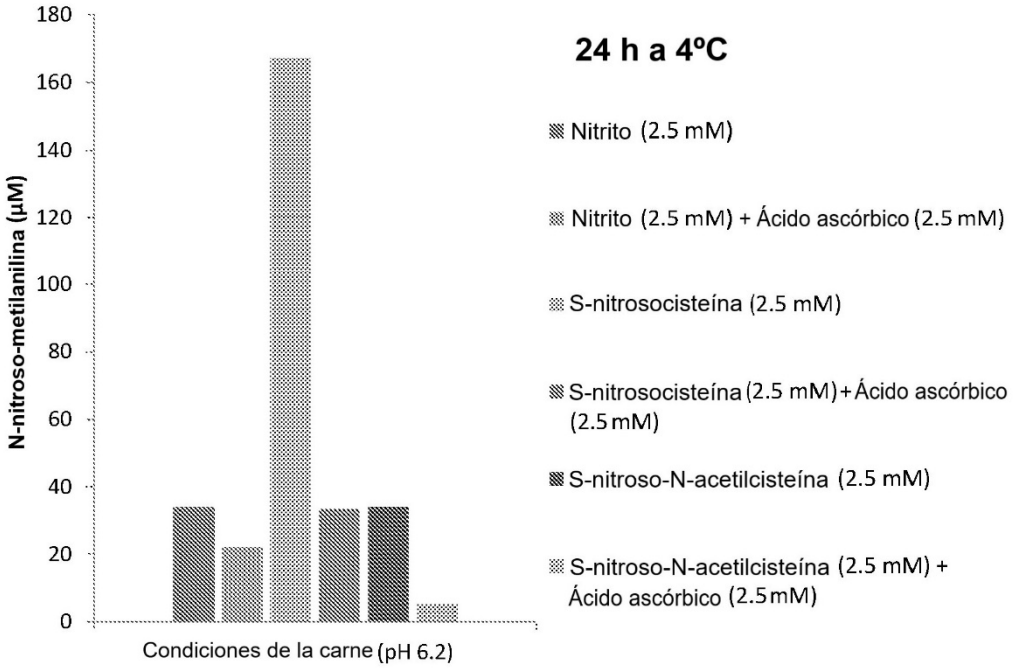

180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
N-nitroso-metilanilina (µM)
Condiciones de la carne (pH 6.2)
24 h a 4ºC
Nitrito (2.5 mM)
Nitrito (2.5 mM) + Ácido ascórbico (2.5 mM)
S-nitrosocisteína (2.5 mM)
S-nitrosocisteína (2.5 mM) + Ácido ascórbico (2.5 mM)
S-nitroso-N-acetilcisteína (2.5 mM)
S-nitroso-N-acetilcisteína (2.5 mM) + Ácido ascórbico (2.5 mM)

FIGURA 5A

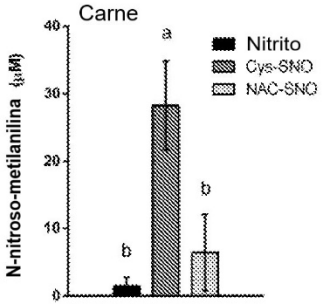


FIGURA 5B

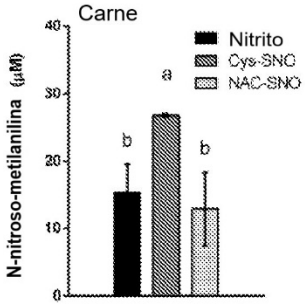


FIGURA 5C

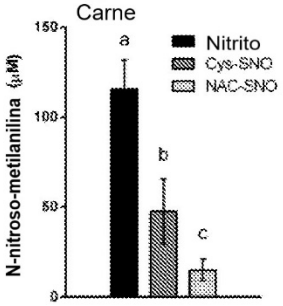


FIGURA 5D

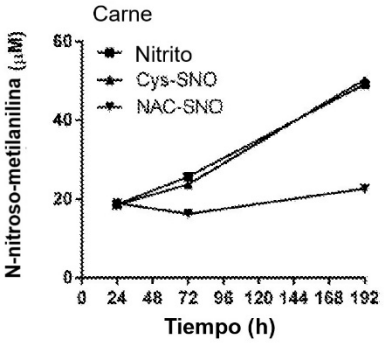


FIGURA 5E

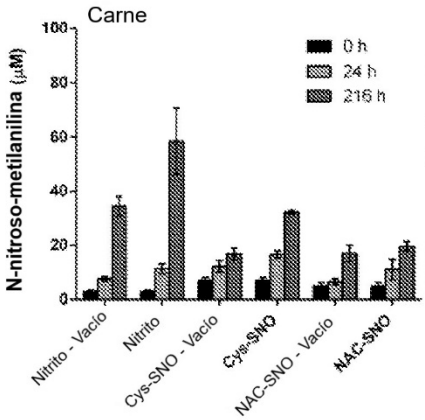


FIGURA 5F

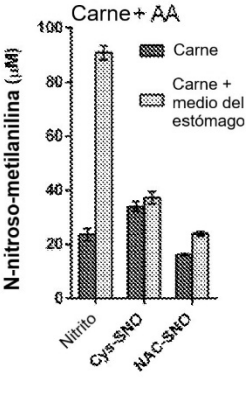


FIGURA 6A

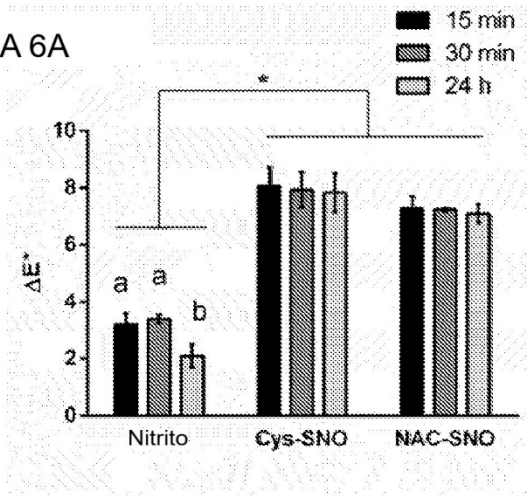


FIGURA 6B

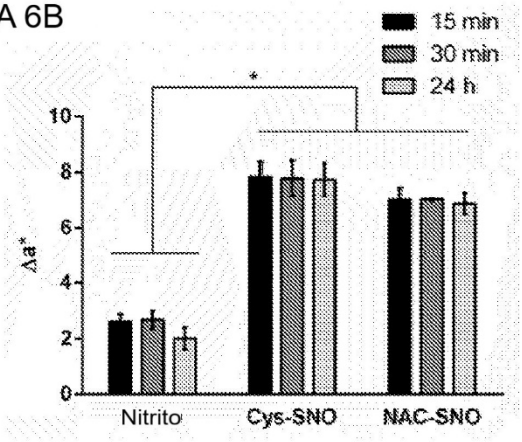


FIGURA 6C

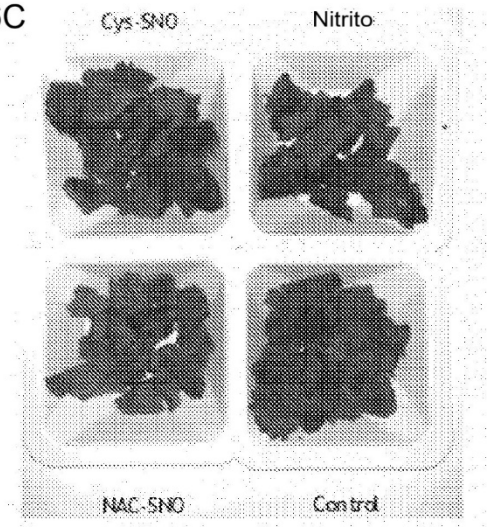


FIGURA 7

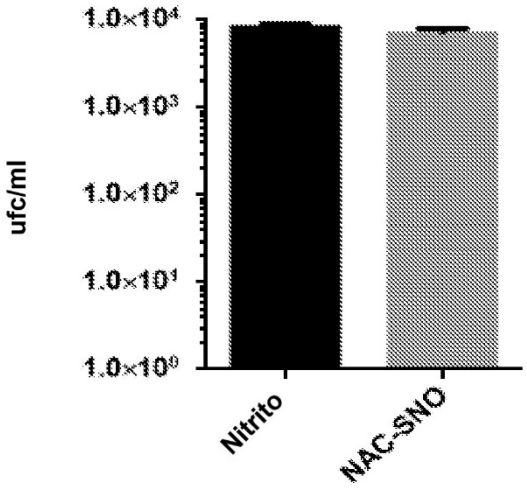


FIGURA 8

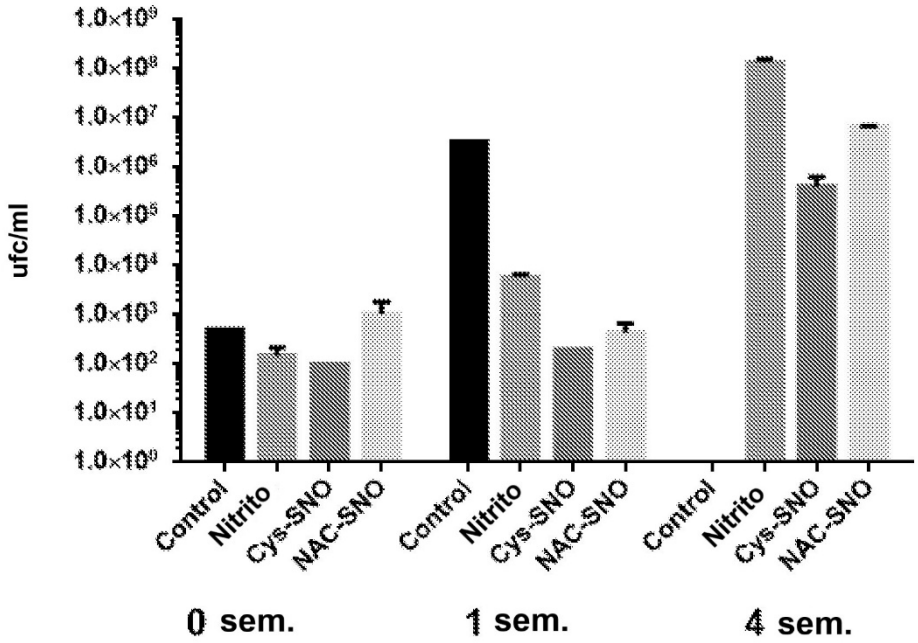


FIGURA 9

