

APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA EN LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE DORADA

Méndez, E.; Fuentes, A.; Fernández-Segovia, I.; Barat, J.M.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación de la espectroscopía de impedancia en la diferenciación de dorada congelada-descongelada y dorada fresca, así como en la determinación de la vida útil de esta especie de pescado. En una primera fase, se estudiaron diferentes tiempos de almacenamiento en congelación. En una segunda fase, se llevó a cabo un estudio de vida útil en dorada fresca y dorada congelada-descongelada. En todas las muestras se llevaron a cabo análisis físico-químicos, microbiológicos, así como las determinaciones de impedancia empleando dos sensores de medida diferentes. La congelación no tuvo efecto sobre el NBVT ni sobre la calidad microbiológica; sin embargo provocó una ligera degradación del IMP, un aumento en el índice de TBA y por tanto en la oxidación del músculo y cambios en la estructura de la dorada que se tradujeron en una disminución de la dureza del músculo. Estos cambios fueron detectados mediante el equipo de espectroscopía de impedancia con el electrodo doble, con el cual se podría discriminar entre dorada congelada y dorada fresca. En general, ni el tiempo de almacenamiento en congelación ni el número de ciclos de congelado fueron perceptibles en los parámetros evaluados ni con la técnica de espectroscopía empleada. En el estudio de vida útil, los parámetros físico-químicos estudiados evidenciaron un mayor grado de deterioro durante el almacenamiento en refrigeración, para las muestras de dorada descongeladas en comparación con dorada fresca. Sin embargo, el deterioro microbiológico se alcanzó prácticamente a los 7 días de almacenamiento en ambos tipos de muestras. La técnica de espectroscopía de impedancia no consiguió discriminar los distintos tiempos de almacenamiento en refrigeración, lo que indica que los sensores empleados en este estudio no son adecuados para estimar la vida útil de dorada.

RESUM

L'objectiu d'aquest treball va ser avaluar l'aplicació de l'espectroscòpia d'impedància en la diferenciació de orada congelada-descongelada i orada fresca, així com en la determinació de la vida útil d'aquesta espècie de peix. A una primera fase, es van estudiar diferents temps d'emmagatzematge en congelació. A una segona fase, es va dur a terme un estudio de vida útil en daurada fresca i daurada congelada-descongelada. En totes les mostres es van dur a terme anàlisis físicoquímics, microbiològics, així com les determinacions d'impedància amb dos sensors de mesura diferents. La congelació no va tindre efecte sobre el NBVT ni sobre la qualitat microbiològica, però va provocar una lleugera degradació del IMP, un

augment en l'índex de TBA i per tant en l'oxidació del múscul i canvis en l'estructura de la orada que es van traduir en una disminució de la duresa del múscul. Aquests canvis van ser detectats mitjançant l'equip d'espectroscòpia d'impedància amb l'elèctrode doble, amb el qual es podria discriminar entre daurada congelada i fresca. En general, ni el temps d'emmagatzematge en congelació ni el nombre de cicles congelació van ser perceptibles en els paràmetres avaluats ni amb la tècnica d'espectroscopia utilitzada. En l'estudi de vida útil, els paràmetres fisicoquímics estudiats van evidenciar un major grau de deteriorament durant l'emmagatzematge en refrigeració, per a les mostres de orada descongelades en comparació amb orada fresca. No obstant això, el deteriorament microbiològic es va aconseguir pràcticament als 8 dies d'emmagatzematge en ambdós tipus de mostra. La tècnica de espectroscopia d'impedància no va aconseguir discriminar els diferents temps d'emmagatzematge en refrigeració, la qual cosa indica que els sensors utilitzats en aquest estudi no són adequats per a estimar la vida útil orada.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the application of impedance spectroscopy to differentiate between fresh and frozen-thawed sea bream, and to assess the shelf-life of this fish species. In a first stage, different times of frozen storage were studied. In a second stage, a study of shelf life of fresh and frozen-thawed sea bream were carried out. In all the samples were performed physical-chemical, microbiological, and the impedance measurements using two different measurement sensors. Freezing had no effect on the TVB or the microbiological quality, but caused a slight degradation of IMP, an increase in the rate of TBA, and therefore in muscle oxidation, and changes in the structure of the sea bream that provoked a muscle strength decrease. These changes were detected by impedance spectroscopy equipment with double-electrode, which could discriminate between frozen and fresh sea bream. In general, neither the frozen storage time and the number of freezing cycles were detectable in all evaluated parameters and the spectroscopic technique employed. In the study of shelf-life, physical-chemical parameters studied showed a higher deterioration during cold storage for samples thawed sea bream compared to fresh. However, microbiological spoilage is almost reached after 8 days of storage in both types of samples. The impedance spectroscopy technique did not distinguish among the different times of cold storage, indicating that the sensors used in this study are not adequate to estimate the shelf-life of sea bream.

PALABRAS CLAVES: espectroscopía de impedancia, dorada, congelación, análisis fisicoquímico, análisis microbiológico.

1. INTRODUCCIÓN

El pescado es un alimento muy apreciado en el mercado debido a su gran valor nutritivo y organoléptico. Sin embargo, el pescado fresco es extremadamente susceptible al deterioro, lo que provoca importantes cambios en sus características sensoriales, valor nutritivo e incluso en la inocuidad para los consumidores.

La congelación es una excelente alternativa para extender la vida útil del pescado, además de suponer una forma eficiente para su almacenamiento. Sin embargo, muchos consumidores prefieren pescado fresco a pesar de su mayor coste. Por esta razón, la venta de productos congelados-descongelados, ofertados como pescado fresco es una práctica fraudulenta. Durante el congelado, almacenamiento y descongelado, el músculo del pescado sufre cambios debidos a la desnaturalización de proteínas y a la oxidación de lípidos, lo que repercute directamente en la calidad sensorial y nutricional del producto, afectando también a la conservación del mismo.

Para diferenciar entre muestras de pescado congelado-descongelado y muestras frescas, se han empleado diferentes métodos analíticos basados en medidas físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales (Arannilewa *et al.*, 2006; Iglesias *et al.*, 2009; Orak y Kayisoglu, 2008). El inconveniente de la mayoría de estos métodos es que son tediosos, relativamente caros, largos y requieren personal altamente cualificado. Por tanto, sería interesante el desarrollo de técnicas rápidas de control que pudieran aplicarse en cualquier etapa de la comercialización para detectar si un pescado ha sido congelado/descongelado. Con este fin se han aplicado técnicas instrumentales no destructivas como la fluorescencia frontal o la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) (Karoui *et al.*, 2006). Los sensores como la lengua electrónica y los equipos de espectroscopía de impedancia, podrían ser dos técnicas alternativas para la detección rápida de este tipo de fraude.

La espectroscopía de impedancia consiste en aplicar un estímulo eléctrico a los electrodos, observar su respuesta y determinar sus propiedades, interacciones y dependencias con determinados factores (Masot 2010). La respuesta eléctrica puede variar sustancialmente en función de las cargas presentes (iones libres), la microestructura y naturaleza del electrolito, así como con la textura, geometría y naturaleza de los electrodos. Las medidas de impedancia eléctrica determinan o infieren información acerca del tejido, siempre y cuando lo que se esté analizando presente un cambio en dimensión, en sus propiedades eléctricas o en su conductividad (Geddes y Baker, 1989; Wu *et al.*, 2008). La impedancia se puede relacionar con las propiedades dieléctricas de la materia, es la oposición que presenta un determinado material al paso de una corriente a través de él, siendo consecuencia directa de su composición y de su naturaleza interna. Su respuesta depende tanto de sus propiedades dieléctricas (conductividad y permitividad), como de las cualidades y factores geométricos de los electrodos, como se ha dicho anteriormente.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación de la espectroscopía de impedancia en la diferenciación de dorada congelada-descongelada y

dorada fresca, así como en la determinación de la vida útil de esta especie de pescado.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Preparación de las muestras

La materia prima de partida fue dorada (*Sparus aurata*) procedente de la piscifactoría Frescamar Alimentación, S.L. (Burriana, Castellón), de calibre 350-500 g, sacrificada el mismo día de adquisición. El transporte se realizó en hielo en cajas de poliespán. A su llegada al laboratorio, las doradas se pesaron, se envolvieron en film plástico y se asignó un código a cada muestra. Se trabajó con dos lotes de muestra. El lote 1, compuesto por 30 muestras, se destinó al estudio de congelación, mientras que el lote 2, formado por 18 muestras, se empleó para el estudio de vida útil del pescado fresco. En la figura 1 se muestra el esquema de trabajo seguido en este estudio.

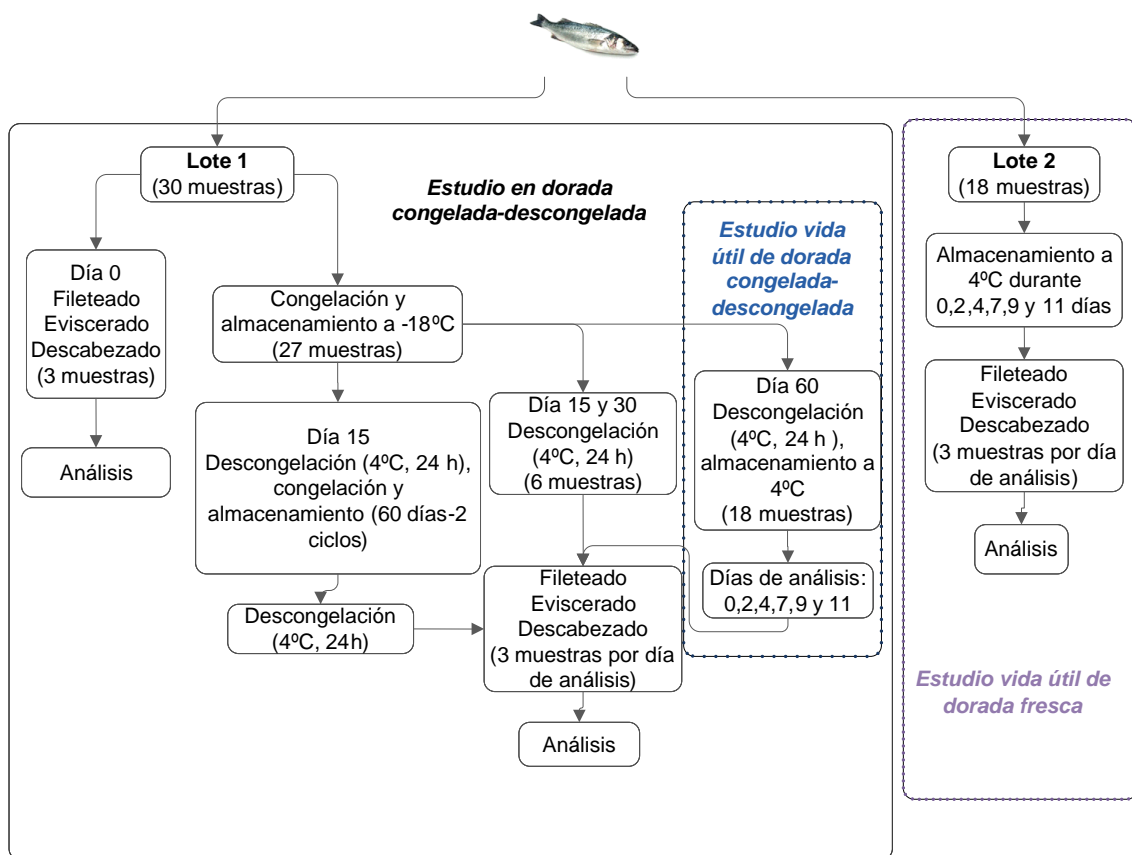


Figura 1. Diseño experimental.

2.2 Estudio de congelación

En el estudio de congelación se analizaron inicialmente 3 muestras de dorada fresca y las 27 restantes se congelaron a -18 °C y almacenaron en congelación durante diferentes tiempos (15, 30 y 60 días). A cada uno de estos tiempos, se descongelaron 3 muestras en refrigeración (4°C, 24 h) y se llevaron a cabo las determinaciones analíticas descritas en el apartado siguiente.

Por otra parte, para comprobar si el número de ciclos de congelación afectaba a la calidad de la dorada, a los 15 días de almacenamiento en congelación se descongelaron 3 muestras (4 °C, 24 h), se volvieron a congelar y a almacenar a -18 °C durante un total de 60 días (60–2 ciclos). Antes de ser analizadas, estas muestras se descongelaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Por último, para determinar si la congelación tenía efecto en la vida útil de la dorada, a los 60 días de almacenamiento en congelación se descongelaron las muestras restantes (4 °C, 24 h), se almacenaron en refrigeración y se analizaron periódicamente (día 0, 2, 4, 7, 9 y 11).

2.3 Estudio de vida útil en dorada fresca

Las muestras correspondientes al lote 2 fueron almacenadas en refrigeración y analizadas a los 0, 2, 4, 7, 9 y 11 días de almacenamiento.

2.4 Determinaciones analíticas

2.4.1 Análisis físico-químicos

Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado (3 pescados/análisis).

La determinación de humedad se realizó según el método de la AOAC 950.46 (1997).

El pH de las muestras se midió directamente sobre los filetes empleando un pH-metro con electrodo de punción acoplado, tomando 6 lecturas en puntos diferentes del filete.

La determinación del contenido en nitrógeno básico volátil total (NBVT) se realizó mediante destilación por arrastre de vapor y valoración con ácido sulfúrico, según el método descrito por Malle y Tao (1987).

La oxidación lipídica se evaluó mediante el test del ácido tiobarbitúrico (índice del TBA), según el procedimiento colorimétrico descrito por Vyncke (1995).

Los compuestos relacionados con la degradación del ATP, inosina monofosfato (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx) fueron determinados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en un cromatógrafo Jasco (Essek, UK) con detector Diode-Array, siguiendo el método descrito por Barat *et al.* (2008). La identificación de los metabolitos estudiados se realizó por comparación de los tiempos de retención de los analitos en las muestras con los de patrones analizados en las mismas condiciones. Se confirmó por el método de adición de patrón. El método de cuantificación empleado fue el

del estándar externo. Con las concentraciones de IMP, Ino y Hx se calculó el valor del parámetro K_1 , empleando la ecuación (1):

$$K_1(\%) = \frac{[\text{Ino}] + [\text{Hx}]}{[\text{IMP}] + [\text{Ino}] + [\text{Hx}]} \times 100 \quad (1)$$

Para determinar la pérdida por goteo, se eliminaba el film plástico que envolvía a las muestras conteniendo el exudado, las muestras se secaban con un papel absorbente y se pesaban. La pérdida por goteo se calculaba por diferencia entre el peso inicial y final del pescado, y fue expresada en % exudado (g perdidos por 100 g de pescado).

Para el estudio de las propiedades mecánicas del músculo de pescado se realizó un ensayo de doble de compresión o TPA (Texture Profile Analysis), empleando una prensa universal TA-XT2[®] (Stable Micro Systems, Surrey, UK) con una célula de carga de 250 N. Con el objeto de que las muestras fueran lo más homogéneas posible durante todo el estudio, se tomaron porciones rectangulares de una misma zona del filete, de dimensiones 4 x 3 cm aproximadamente. En este ensayo se utilizó un émbolo (P/75, ANAME) plano y circular de 7.5 cm de diámetro, que comprimió dos veces consecutivas la muestra hasta un 50% de su altura y a una velocidad de 0.8 mm/s, para simular el movimiento de la mandíbula durante la masticación. El análisis de las curvas fuerza-desplazamiento dadas por este equipo permitió obtener los parámetros texturales de dureza, elasticidad, cohesividad, adhesividad, masticabilidad, gomosidad y resiliencia.

2.4.2 Determinaciones microbiológicas

Para llevar a cabo los análisis microbiológicos, a partir de las muestras de pescado, se prepararon diluciones decimales, tal y como se describe en la Norma UNE EN-ISO 6887-3 (AENOR, 2004). El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se hizo mediante siembra en profundidad en Agar Plate Count (PCA), después de 72 h de incubación a 30°C (ISO 4833:2003). El recuento de enterobacterias se realizó mediante siembra en doble capa en Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG, Scharlau), y las placas se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h (Pascual y Calderón, 2000). Ambas determinaciones se realizaron por duplicado.

2.4.3 Medidas con el equipo de espectroscopía de impedancia.

El equipo de espectroscopía de impedancia empleado en el presente estudio fue diseñado en el Instituto de Química Molecular Aplicada (IQMA) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). El equipo de impedancia realiza un barrido de frecuencias desde 1Hz hasta 1MHz, registrando los valores de impedancia a 50 frecuencias diferentes dentro del rango establecido. A partir de las señales de tensión y corriente en el electrodo y los datos recogidos el software del equipo calcula el valor del módulo y fase de la impedancia para cada una de las frecuencias seleccionadas.

En el presente estudio se emplearon dos tipos de sensores diferentes, ambos diseñados en el laboratorio de Microelectrónica Híbrida del Departamento de Ingeniería Electrónica del Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (UPV). Uno de los sensores, consistió en un electrodo doble (denominado ED) compuesto por dos agujas de acero inoxidable de 1,5 cm de longitud y 1 mm de diámetro, colocadas a una distancia de 1 cm sobre un bastidor metálico, el cual permitía mantener fija la separación de ambos electrodos durante la realización de las medidas. En el diseño del otro sensor empleado (denominado PF) se aplicó la tecnología híbrida de circuitos de capa gruesa (Thick-Film technology); mediante esta tecnología se adhiere a una pantalla una tela sobre la cual se ha fijado un film fotosensible, y mediante diferentes métodos de revelado fotográfico y empleando un fotolito del diseño del electrodo, se fija el negativo a la pantalla delimitando las zonas por donde pasará la pasta a través de la tela. El diseño en punta de este electrodo facilita la penetración del mismo a través de la muestra.

Las lecturas de impedancia se tomaron introduciendo completamente el sensor en el filete, en sentido perpendicular a las fibras musculares del pescado. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

2.5 Análisis estadístico.

Con el objeto de ver si el tiempo de almacenamiento en congelación y el número de ciclos de congelado tenían efecto sobre los parámetros físico-químicos y microbiológicos evaluados, se llevó a cabo un ANOVA simple para cada parámetro, tomando como factor el tiempo de almacenamiento en congelación (0, 15, 30, 60 días y 60-2 ciclos) y como variables cada uno de los parámetros estudiados.

Para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en refrigeración sobre la calidad de la dorada, se llevó a cabo un ANOVA simple para cada parámetro tomando como factor el tiempo de almacenamiento en refrigeración (día 0, 2, 4, 7, 9 y 11) y como variables cada uno de los parámetros estudiados. Este análisis se hizo en el estudio de vida útil de dorada congelada-descongelada y en el de dorada fresca.

Para evaluar si la congelación tenía efecto sobre la vida útil de la dorada almacenada en refrigeración se llevó a cabo un ANOVA simple para cada uno de los parámetros a cada tiempo de almacenamiento, siendo el factor el tipo de muestra (congelada-descongelada o fresca) y las variables los parámetros evaluados.

Por último, para evaluar la viabilidad del uso de la técnica de espectroscopía de impedancia en la detección de pescado congelado-descongelado, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA), seguido por un análisis discriminante. El PCA se llevó a cabo empleando los datos de módulo y fase registrados con el equipo de impedancia en el rango de frecuencias establecido. Las muestras evaluadas correspondieron a la dorada fresca a día 0 y las congeladas durante 15, 30, 60 días o 60-2 ciclos. El análisis discriminante se realizó con los valores de los componentes principales obtenidos en el PCA.

De igual forma, a través de un PCA y un análisis discriminante, se determinó la viabilidad de esta técnica para determinar la vida útil o grado de deterioro de las muestras.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estudio de congelación

3.1.1. Determinaciones físico-químicas y microbiológicas.

En la tabla 1 se muestran los valores correspondientes a los análisis fisicoquímicos y microbiológicos realizados en dorada fresca (día 0), y almacenada en congelación (15, 30, 60 días y 60-2 ciclos).

Los valores de pH presentaron un ligero aumento con el tiempo de almacenamiento en congelación, estando comprendidos en el rango observado en otros estudios (Barat *et al.*, 2008).

Los valores de NBVT no presentaron variaciones importantes durante el almacenamiento en congelación (tabla 1). En relación al índice de TBA, los valores en muestras congeladas fueron ligeramente superiores a los de dorada fresca, lo que significaría el inicio de la oxidación durante el almacenamiento en congelación. Sin embargo, los bajos valores de este parámetro en todas las muestras indicarían un bajo nivel de oxidación en todos los casos.

Respecto a los metabolitos de degradación del ATP, hay que destacar el alto valor de IMP en la dorada fresca en comparación con los obtenidos en otros estudios (Barat *et al.*, 2008), lo que pone de manifiesto el elevado grado de frescura que presentaba la materia prima. Los valores de IMP en las muestras congeladas fueron menores que en la muestra sin congelar. El contenido en Ino, por el contrario, fue mayor en las muestras congeladas, lo que confirmaría que parte de IMP se degradó a Ino a causa de la congelación, pero los valores alcanzados durante la congelación siguen siendo valores típicos de pescado fresco (Fernández-Segovia *et al.*, 2008). No hubo diferencias significativas en el contenido en Hx entre ninguna de las muestras. A partir de estos parámetros se calculó el valor K_1 que fue significativamente menor en la dorada fresca, lo que confirma el ligero deterioro que causó la congelación en el músculo de pescado, comentado anteriormente. Ni el tiempo de congelación ni el número de ciclos de congelado tuvieron efecto sobre estos parámetros, lo que indica una buena estabilidad de las muestras durante el almacenamiento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En relación a la textura, hay que destacar la disminución significativa del parámetro de dureza por efecto de la congelación, que también afectó a los parámetros de cohesividad, gomosidad y resilencia. Estos datos confirman que durante la congelación y la descongelación, el músculo de pescado sufre cambios debido a la desnaturalización de proteínas, que afectan directamente a la capacidad de retención de agua y a la textura del músculo (Orak y Kayisoglu, 2008). Al igual que ocurría en el resto de parámetros evaluados, ni el tiempo de congelación ni el número de ciclos de congelado tuvieron efecto sobre la textura.

El número de ciclos de congelación afectó a la pérdida por goteo, encontrándose una mayor cantidad de exudado en las muestras que se habían sometido a 2 ciclos de congelación.

El análisis microbiológico mostró una excelente calidad higiénico-sanitaria de la materia prima. La congelación no afectó a los recuentos de mesófilos y enterobacterias; sin embargo, las muestras que habían sido sometidas a dos ciclos de congelación presentaron niveles de enterobacterias superiores al resto, aunque seguían siendo bajos (2,03 ciclos logarítmicos).

Tabla 1. Resultados fisicoquímicos y microbiológicos para dorada fresca (día 0) y almacenada en congelación. MDA= Malonaldehído. Media \pm desviación estándar (n=3).

Parámetro	Tiempo en congelación (días)					α
	0	15	30	60	60 -2 ciclos	
Físico-químico						
Humedad (%)	73,03 \pm 1,86 ^a	71,87 \pm 0,75 ^{ab}	72,50 \pm 1,76 ^{ab}	69,96 \pm 0,96 ^b	70,71 \pm 2,36 ^{ab}	ns
pH	6,29 \pm 0,06 ^a	6,29 \pm 0,09 ^a	6,31 \pm 0,03 ^{ab}	6,40 \pm 0,04 ^{bc}	6,43 \pm 0,04 ^c	*
NBVT (mg/100g)	18,37 \pm 0,28 ^a	19,70 \pm 0,39 ^a	18,80 \pm 1,86 ^a	16,54 \pm 0,24 ^b	19,21 \pm 0,65 ^a	*
TBA (mg MDA/Kg)	0,044 \pm 0,030 ^a	0,390 \pm 0,207 ^b	0,757 \pm 0,050 ^c	0,409 \pm 0,004 ^b	0,311 \pm 0,094 ^b	***
Valor K ₁ (%)	10,68 \pm 2,70 ^a	18,37 \pm 2,50 ^b	29,86 \pm 9,00 ^c	15,00 \pm 7,25 ^b	18,33 \pm 3,09 ^b	*
IMP (μ mol/g)	13,11 \pm 0,04 ^a	8,14 \pm 0,36 ^{bc}	6,12 \pm 1,66 ^c	8,32 \pm 2,03 ^b	7,89 \pm 0,45 ^{bc}	***
Ino (μ mol/g)	0,068 \pm 0,059 ^a	0,465 \pm 0,066 ^b	0,686 \pm 0,217 ^{bc}	0,412 \pm 0,205 ^b	0,755 \pm 0,114 ^c	*
Hx (μ mol/g)	1,509 \pm 0,498 ^a	1,391 \pm 0,340 ^a	1,837 \pm 0,313 ^a	1,118 \pm 0,834 ^a	1,038 \pm 0,355 ^a	ns
Pérdida goteo (%)	--	1,333 \pm 0,389 ^a	1,589 \pm 0,292 ^a	1,687 \pm 0,150 ^a	2,213 \pm 0,304 ^b	**
Textura						
Dureza (N)	108,8 \pm 2,8 ^a	60,5 \pm 14,0 ^c	80,7 \pm 3,3 ^b	78,0 \pm 3,9 ^{bc}	71,3 \pm 15,9 ^{bc}	**
Adhesividad (N*s)	-0,69 \pm 0,11 ^a	-0,57 \pm 0,30 ^a	-0,60 \pm 0,15 ^a	-0,50 \pm 0,04 ^a	-0,80 \pm 0,26 ^a	ns
Elasticidad	1,93 \pm 0,19 ^a	2,42 \pm 0,45 ^b	1,85 \pm 0,19 ^a	1,85 \pm 0,03 ^a	2,08 \pm 0,23 ^{ab}	ns
Cohesividad	2,66 \pm 0,18 ^a	3,02 \pm 0,19 ^b	3,28 \pm 0,08 ^b	3,14 \pm 0,08 ^b	3,08 \pm 0,20 ^b	**
Gomosidad (N)	289,4 \pm 19,2 ^a	181,9 \pm 35,6 ^c	264,7 \pm 17,5 ^{ab}	245,2 \pm 16,9 ^{ab}	217,9 \pm 37,1 ^{bc}	**
Masticabilidad (N)	560,9 \pm 85,5 ^a	430,2 \pm 40,3 ^b	489,5 \pm 50,1 ^{ab}	454,1 \pm 37,1 ^b	447,8 \pm 39,8 ^b	ns
Resiliencia	0,21 \pm 0,02 ^a	0,14 \pm 0,01 ^b	0,13 \pm 0,004 ^b	0,13 \pm 0,002 ^b	0,14 \pm 0,02 ^b	***
Microbiología (log ufc/g)						
Mesófilos aerobios	2,533 \pm 1,131 ^a	2,307 \pm 0,100 ^a	2,377 \pm 0,180 ^a	2,387 \pm 0,085 ^a	2,463 \pm 0,199 ^a	ns
Enterobacterias	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,150 \pm 0,260 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	2,030 \pm 0,030 ^b	***

Letras iguales en una misma fila indican la pertenencia a grupos homogéneos. Nivel de significación (α): ns no hay diferencia significativa; * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

3.1.2. Espectroscopía de impedancia

La técnica de espectroscopía de impedancia se empleó como herramienta para evaluar el efecto de la congelación sobre el tejido muscular de dorada. Con este objeto se compararon las medidas de impedancia de dorada fresca (día 0) y congelada durante 15, 30 y 60 días, así como las muestras sometidas a dos ciclos de congelación (60-2 ciclos). El equipo de

espectroscopía de impedancia genera para cada una de las medidas realizadas un total de 100 valores, correspondientes a los módulos y fases de las 50 frecuencias analizadas, que se recogen dentro del rango de frecuencias desde 1 Hz hasta 1 MHz. Debido a que los módulos y fases de la impedancia son variables altamente correlacionadas, se precisa de una herramienta estadística de síntesis de la información, que permita reducir el número de variables del estudio. De este modo, se empleó un Análisis de Componentes Principales (PCA) con el objeto de obtener un número más reducido de variables ortogonales, es decir, lo que denominamos componentes principales (PCs). A partir de estos PCs se aplicó un análisis discriminante (DA), con el objeto de evaluar la capacidad de la espectroscopía de impedancia para diferenciar entre los distintos tipos de muestra. Las figuras 2a y 2b muestran la representación de las dos primeras funciones discriminantes para el sensor ED y PF, respectivamente.

Para el electrodo ED se observa que, según la función F1 (que explica el 96,25% de variabilidad), las muestras de dorada fresca se encuentran claramente separadas de las muestras que habían sido congeladas (figura 2a). Por tanto, el equipo de espectroscopía de impedancia con electrodo doble como sensor de medida es una herramienta útil para discriminar entre muestras de pescado que han sido sometidas a un proceso de congelación, si bien no es capaz de diferenciar entre los tiempos de almacenamiento en congelación o en función de los ciclos de congelación. Estos resultados podrían correlacionarse con los cambios estructurales y autolíticos comentados en el apartado anterior.

Respecto al sensor PF, los diferentes tipos de muestras aparecen agrupados aunque no se observa una separación clara en función del proceso de congelación, tiempo de almacenamiento o ciclos de congelado (figura 2b), por lo que este tipo de electrodo no sería adecuado para la diferenciación entre este tipo de muestras. Estos resultados confirman la importancia del diseño del sensor de medida (geometría y naturaleza del electrodo).

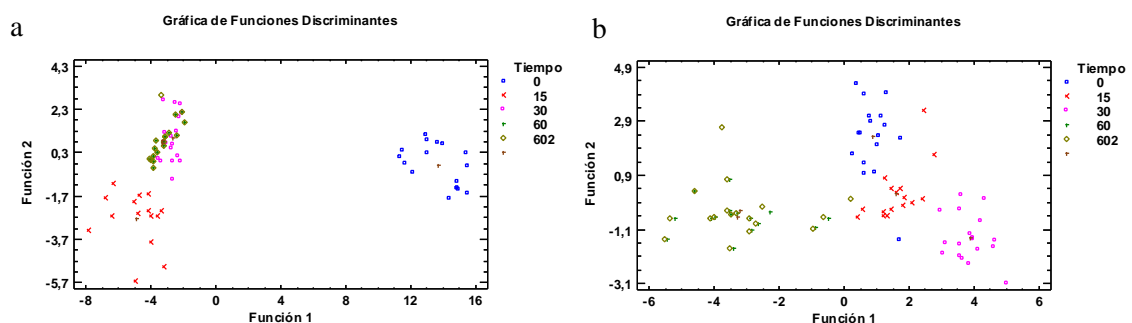


Figura 2. Gráfico de las dos primeras funciones discriminantes (F1 y F2) para las medidas de impedancia tomadas con el electrodo doble (ED) (a) y con el de punta de flecha (PF) (b), en las muestras de dorada fresca (día 0) y de dorada almacenada en congelación durante 15, 30 y 60 días, y en

muestras sometidas a 2 ciclos de congelación, almacenadas durante 60 días (602).

3.2. Estudio de vida útil

3.2.1. Determinaciones físico-químicas y microbiológicas.

Para evaluar la vida útil de la dorada durante 11 días de almacenamiento en refrigeración, se estudiaron los mismos parámetros descritos en el apartado anterior. Las muestras de dorada fresca y de dorada almacenada en congelación durante 60 días y descongelada, se almacenaron a 4 °C y se llevaron a cabo las medidas y análisis descritos a día 0, 2, 4, 7, 9 y 11, tal y como se ha detallado en el apartado de Material y Métodos.

En la figura 3 se puede observar la evolución en los parámetros de humedad, pH, NBVT, TBA y pérdida por goteo a lo largo del almacenamiento en refrigeración de dorada congelada-descongelada y dorada fresca.

No hubo diferencias significativas en la evolución de humedad a lo largo del almacenamiento ni entre las distintas muestras. El pH inicial de las muestras frescas fue superior al de las muestras descongeladas, debido a que, como se vio en el apartado anterior, durante el almacenamiento en congelación el pH había aumentado progresivamente. Esta diferencia inicial se mantuvo durante todo el periodo de estudio, ya que el pH permaneció prácticamente constante a lo largo del almacenamiento. Por lo tanto, en el estudio de vida útil, el comportamiento de este parámetro fue similar para ambas muestras, no siendo un buen indicador del deterioro en ninguno de los dos casos.

En la figura 3 se puede observar un aumento progresivo del contenido en NBVT para la dorada congelada-descongelada, a diferencia de la dorada fresca, donde este parámetro se mantuvo prácticamente constante y por debajo de las muestras descongeladas. Esto demuestra que la muestra fresca sufrió un menor deterioro. Aunque varios autores han relacionado el incremento del NBVT con el deterioro microbiano (Fernández-Segovia *et al.*, 2007; Kykkidou *et al.*, 2009; Özyurt *et al.*, 2009), hay una gran variabilidad en los límites de aceptabilidad de este parámetro en pescado fresco. Se han establecido límites de 25, 30 y 35 mg/100 g (Dalgaard, 2000) y la Unión Europea ha establecido el límite de aceptación de 35 mg NBVT/100 g de pescado (CEE, 2005a). En este estudio los valores más altos alcanzados al final del almacenamiento fueron de 23 mg NBVT/100 g en dorada congelada-descongelada y de 18 mg NBVT/100 g para dorada fresca, por lo que en ningún momento se superó el límite establecido por la Unión Europea. Sin embargo, por los resultados microbiológicos que más adelante se comentan, se sabe que las muestras eran microbiológicamente inaceptables a partir del 7 día de almacenamiento. Estos resultados indicarían que no hubo una buena correlación entre este parámetro y el deterioro microbiano.

Con respecto al índice de TBA, la dorada fresca presentó valores prácticamente nulos durante todo el almacenamiento, lo que indica que los procesos oxidativos no contribuyeron al deterioro de estas muestras. Las

muestras congeladas-descongeladas presentaron valores superiores en todos los tiempos de análisis. Se han establecido diferentes valores de aceptabilidad para este parámetro. Nunes *et al.* (1992) observaron que los niveles de TBA considerados como límite de aceptabilidad en pescado almacenado en hielo eran de 5-8 mg malonaldehído (MDA)/kg; por otra parte Connell (1995) estableció que a partir de 1-2 mg MDA/kg el pescado es rechazado debido a sabores y aromas desagradables. Los valores alcanzados en las muestras congeladas-descongeladas fueron inferiores a 2 mg MDA/kg, lo que implica que la oxidación de los lípidos de la dorada descongelada fue muy limitada.

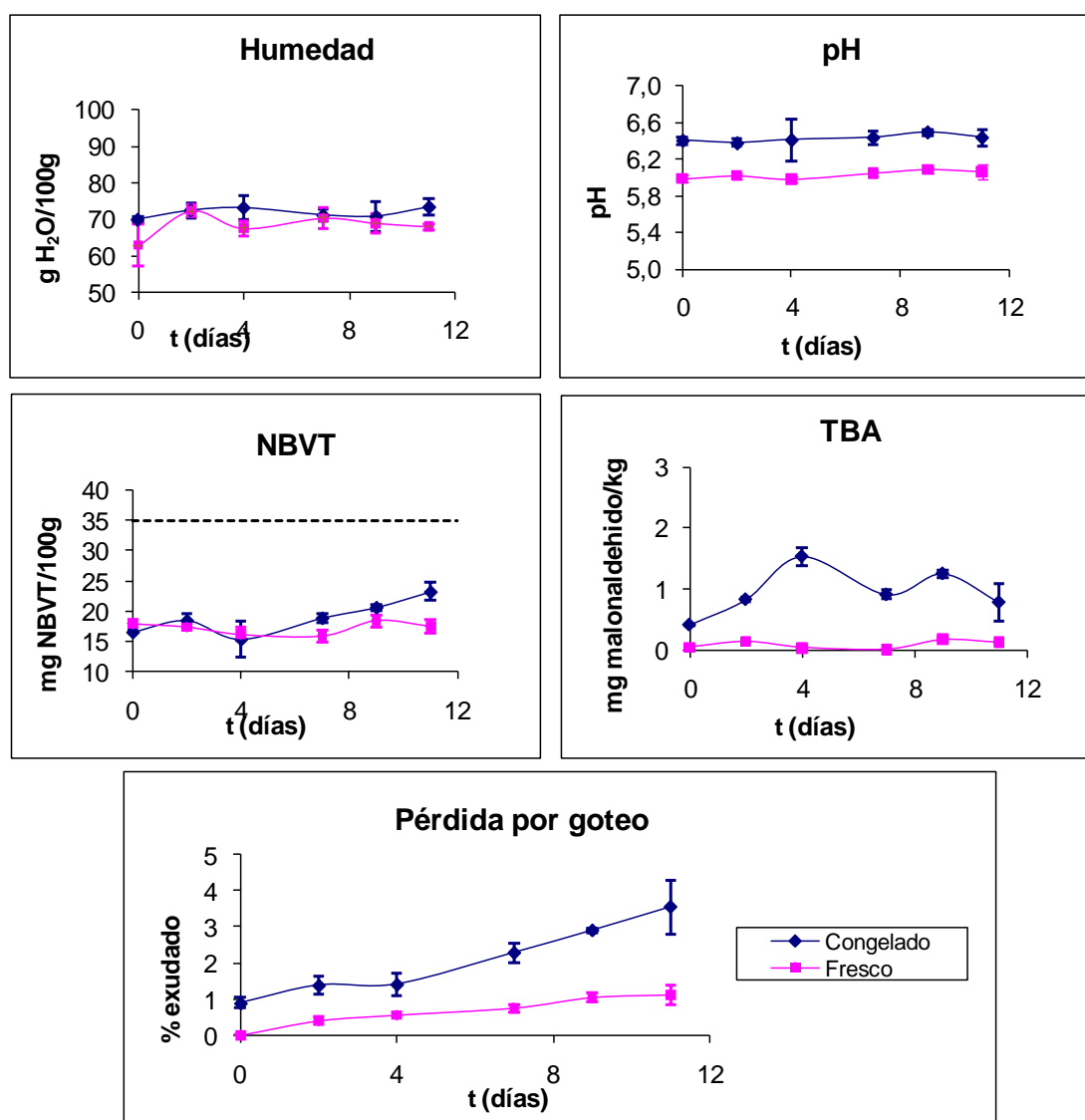


Figura 3. Evolución de humedad, pH, NBVT, TBA y pérdida por goteo durante el almacenamiento en refrigeración de dorada congelada-descongelada y fresca. (Las barras de error representan la desviación estándar, n=3).

En relación a la pérdida por goteo, en la figura 3 se puede apreciar un aumento progresivo del porcentaje de exudado a lo largo del almacenamiento en refrigeración, siendo este incremento significativamente mayor en el caso de las muestras que habían sido previamente congeladas. Estos resultados son debidos a la desnaturalización de proteínas del músculo de pescado ocasionada por la congelación, que se traduce en una pérdida de la capacidad de retención de agua y, por tanto, en una mayor liberación de líquido durante el almacenamiento.

Con respecto a los metabolitos de degradación del ATP, en las figuras 4a y 4b se muestra la evolución de IMP, Ino y Hx, en dorada congelada-descongelada y en dorada fresca, respectivamente. En ambos tipos de muestra se observa que los valores de IMP disminuyeron progresivamente durante el almacenamiento, aumentando ligeramente el contenido en inosina y manteniéndose prácticamente constante la concentración de hipoxantina. Esto significa que a lo largo del periodo de estudio se dieron cambios degradativos (autolíticos y microbiológicos) en las muestras, pero fueron limitados, ya que el IMP se degradó a Ino, pero la degradación de Ino a Hx no tuvo lugar. Las muestras de dorada fresca presentaron valores de IMP superiores a las descongeladas, lo que indica una ligera degradación de este metabolito por acción de las bajas temperaturas de congelación, tal y como se vio en el apartado anterior.

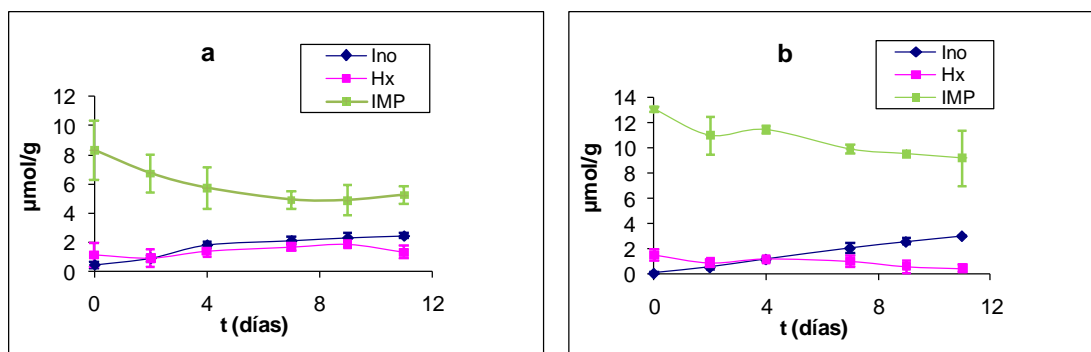


Figura 4. Evolución de inosín-5'-monofosfato (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx) durante el almacenamiento a 4 °C de dorada congelada-descongelada (a) y fresca (b). (Las barras de error representan la desviación estándar, n=3).

En la figura 5 se muestra la evolución del valor K_1 , que puede ser considerado como indicador global de la evolución de IMP, Ino y Hx. Este parámetro ha sido establecido como un indicador de calidad y frescura para un gran número de especies de pescado (Ehira y Uchiyama, 1987). Al inicio del estudio (día 0) no hubo diferencias significativas entre el valor K_1 de ambas muestras; sin embargo, este índice aumentó de forma más acusada durante el almacenamiento en la dorada que había sido previamente congelada, lo que indica nuevamente un mayor nivel de deterioro de estas muestras.

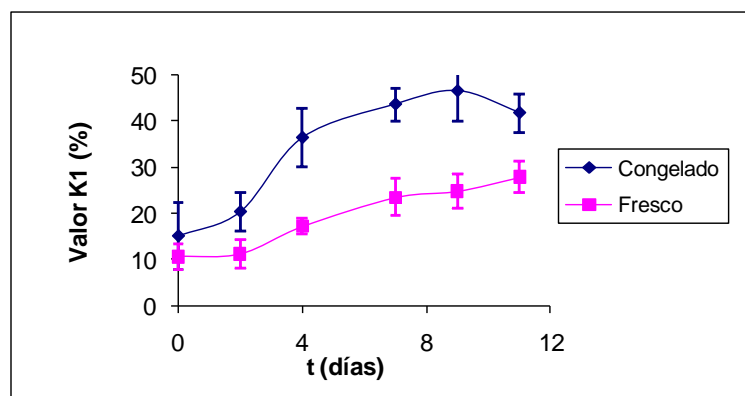


Figura 5. Evolución del valor K_1 durante el almacenamiento en refrigeración de dorada congelada-descongelada y fresca. (Las barras de error representan la desviación estándar, $n=3$).

En la figura 6 se muestran la evolución de los parámetros de textura obtenidos mediante el ensayo de TPA. A día 0 la muestra fresca presentó valores significativamente mayores de dureza, gomosidad, masticabilidad y resiliencia, lo que vuelve a corroborar el efecto de la congelación sobre la estructura del músculo. La dorada fresca experimentó una pérdida de dureza a lo largo del tiempo de almacenamiento, mientras que los valores de la muestra descongelada no mostraron diferencias significativas con el tiempo. El resto de parámetros tuvieron, en general, el mismo comportamiento, excepto la cohesividad y elasticidad que se mantuvieron constantes en ambos tipos de muestras durante el periodo de estudio. Este comportamiento podría indicar que en las muestras descongeladas los cambios en la textura que ocasionó el proceso de congelado-descongelado fueron de tal magnitud que el almacenamiento en refrigeración no afectó a la estructura ya deteriorada del músculo. Sin embargo, la textura de la dorada fresca, que inicialmente evidenciaba una estructura más compacta del músculo, fue deteriorándose con el paso del tiempo en refrigeración. De esta forma, al final del almacenamiento casi todos los parámetros de textura evaluados mostraron valores similares en ambos tipos de muestra.

En relación a la evolución microbiana en la figura 7 se muestran los recuentos de aerobios mesófilos y enterobacterias. Los recuentos de ambos microorganismos fueron bajos al inicio del estudio, lo que pone de manifiesto la excelente calidad higiénico-sanitaria de las muestras. El límite de aceptabilidad para mesófilos se puede establecer en 10^6 ufc/g (CEE, 2005a), ya que si se supera este valor el pescado está deteriorado o cerca del deterioro (Arashisar *et al.*, 2004; Özogul *et al.*, 2004). El nivel de mesófilos aumentó durante el almacenamiento de forma progresiva. Durante los primeros días de estudio la dorada fresca presentó recuentos menores de mesófilos; sin embargo, a partir del día 7, tanto las muestras de pescado congelado-descongelado como las de pescado fresco alcanzaron el límite de los 6 ciclos logarítmicos. En el caso del recuento de enterobacterias, el aumento observado a partir del día 4 fue similar para ambos tipos de muestras, que alcanzaron el límite de aceptación de 3 ciclos logarítmicos empleado en otros estudios (Fuentes *et al.*, 2011) a partir del día 8 de

almacenamiento. Estos resultados indican que, de acuerdo a la calidad microbiológica de las muestras, la vida útil de la dorada fresca sería del mismo orden que la dorada que había sido previamente congelada.

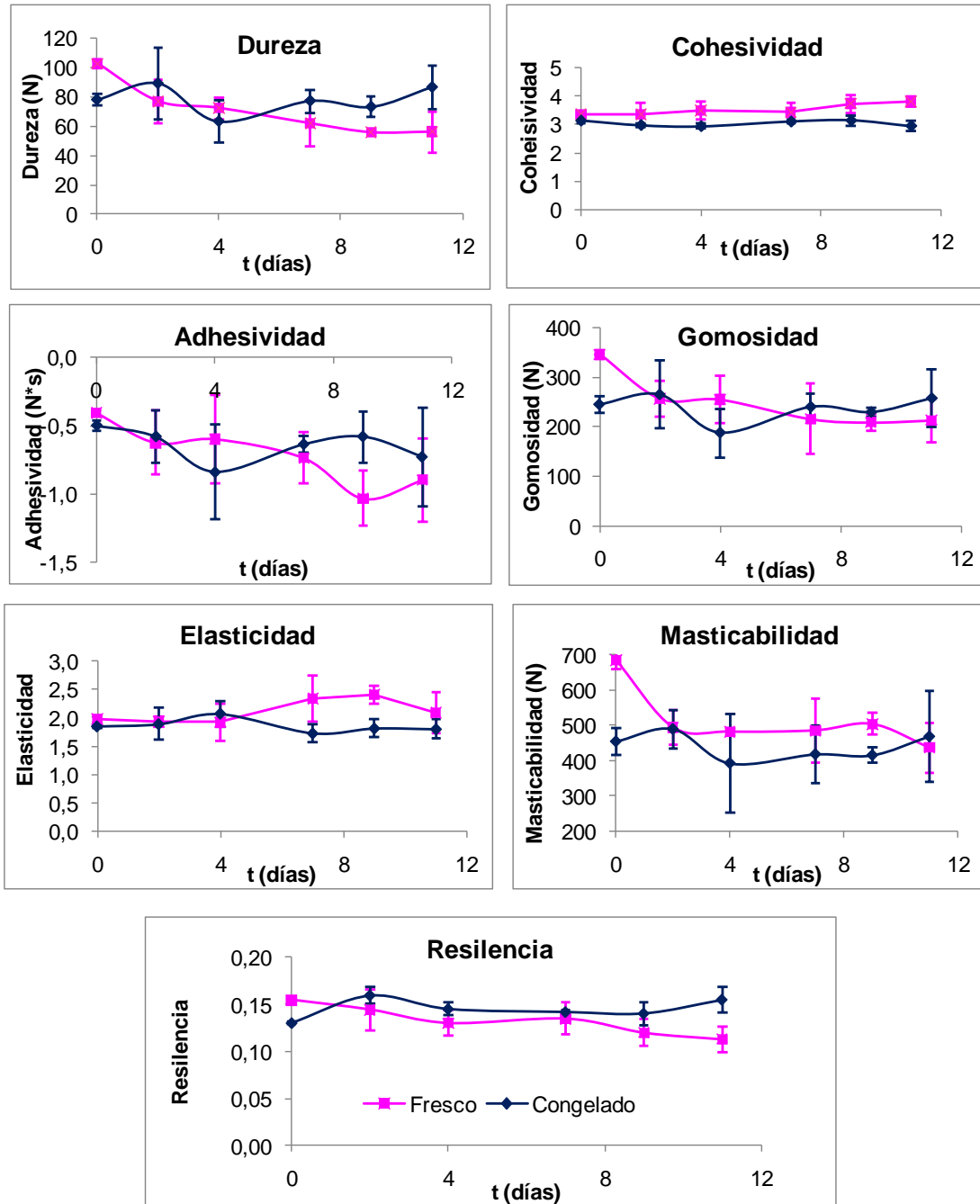


Figura 6. Evolución de los parámetros de textura durante el almacenamiento en refrigeración de dorada congelada-descongelada y fresca. (Las barras de error representan la desviación estándar, n=3).

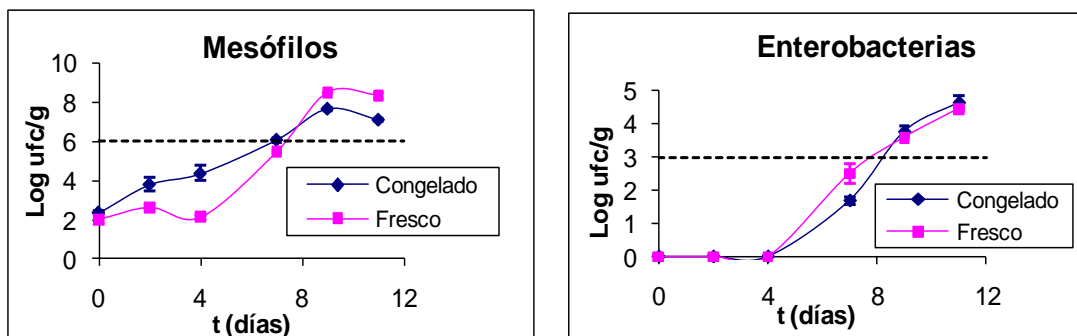


Figura 7. Evolución de los recuentos de mesófilos y enterobacterias durante el almacenamiento en refrigeración de dorada congelada-descongelada y fresca. (Las barras de error representan la desviación estándar, n=3).

3.2.2. Espectroscopía de impedancia

Para estudiar la viabilidad de la espectroscopía de impedancia como herramienta para evaluar la vida útil de dorada durante su almacenamiento en refrigeración se empleó el mismo procedimiento estadístico descrito para la evaluación del efecto de la congelación. En este caso, se emplearon los valores de espectroscopía de impedancia recogidos durante los 11 días de almacenamiento en refrigeración tanto para las muestras de dorada fresca como de dorada congelada-descongelada.

La figura 8 muestra la representación de las dos primeras funciones discriminantes para las medidas realizadas con el sensor ED (a) y con el PF (b) para las muestras de dorada fresca. Tal y como se puede observar en la gráfica, la utilización del sensor ED consiguió discriminar claramente entre las muestras a día 0 (día de sacrificio), pero no consiguió diferenciar el resto de tiempos de almacenamiento en refrigeración. La clara diferenciación entre el día 0 de almacenamiento y el resto de días de análisis, podría deberse a que las muestras correspondientes a día 0 estarían en rigor mortis cuando fueron analizadas, lo que se traduce en cambios asociados a la estructura del músculo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Lepetit *et al.* (2002), que concluyó que, después del *rigor mortis*, la impedancia eléctrica de la carne disminuye linealmente con la resistencia mecánica de las fibras musculares.

El comportamiento observado para el sensor PF fue similar al descrito en el estudio de congelación (figura 8b), las muestras se agruparon sin observarse una clara separación en función del tiempo de almacenamiento. Este hecho vuelve a poner de manifiesto que este tipo de sensor no es adecuado para el objetivo de este estudio.

Respecto al estudio de vida útil realizado con las muestras de dorada congelada-descongelada, se observa que ninguno de los electrodos ensayados consiguió discriminar satisfactoriamente las muestras en función del tiempo de almacenamiento en refrigeración, ya que los diferentes grupos aparecen entremezclados en las figuras (figuras 9a y 9b).

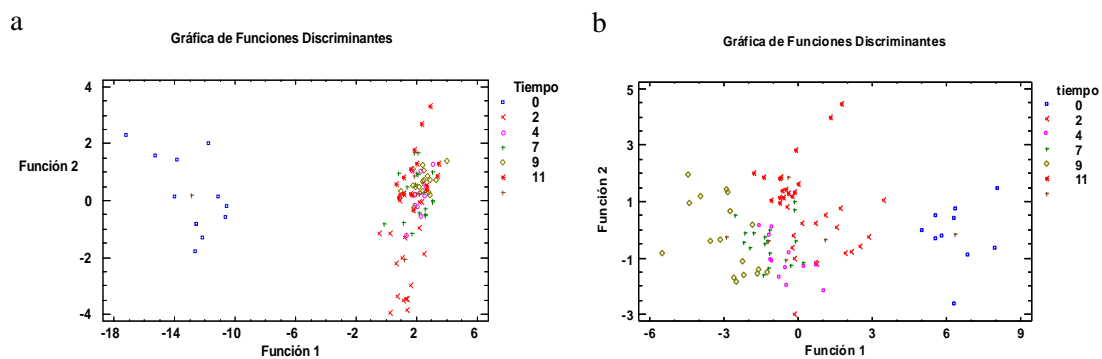


Figura 8. Gráfico de las dos primeras funciones discriminantes (F1 y F2) para las medidas de impedancia tomadas con el electrodo doble (ED) (a) y con el de punta de flecha (PF) (b), en el estudio de vida útil de dorada fresca.

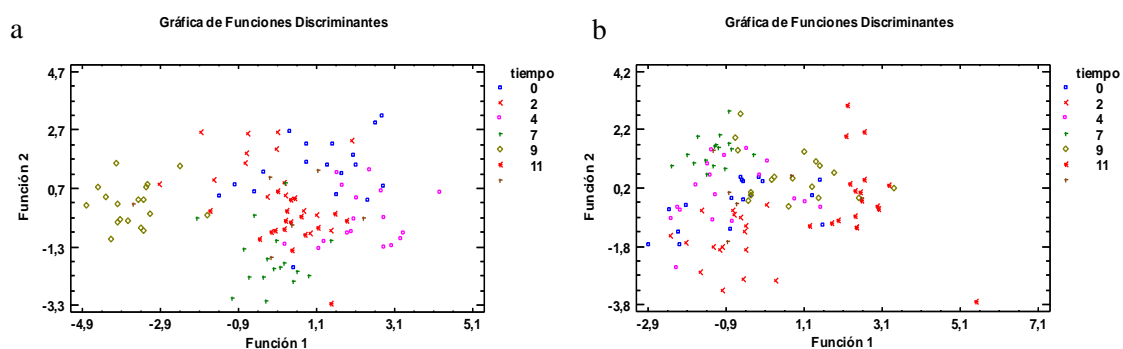


Figura 9. Gráfico de las dos primeras funciones discriminantes (F1 y F2) para las medidas de impedancia tomadas con el electrodo doble (ED) (a) y con el de punta de flecha (PF) (b), en el estudio de vida útil de dorada congelada-descongelada.

De los resultados obtenidos en el estudio de vida útil empleando la espectroscopía de impedancia se puede concluir que no se pudo establecer una correlación directa entre las medidas obtenidas con ambos sensores y el grado de frescura del producto. Debido a que esta técnica sí que ofreció resultados satisfactorios para detectar el daño ocasionado por el efecto de la congelación en el tejido muscular del pescado, sería interesante plantear nuevas experiencias empleando electrodos alternativos, que permitan detectar el deterioro del músculo durante su almacenamiento.

4. CONCLUSIONES

La congelación no tuvo efecto sobre el NBVT ni sobre la calidad microbiológica; sin embargo provocó una ligera degradación del IMP, un aumento en el índice de TBA y, por tanto, en la oxidación del músculo, así como cambios en la estructura de la dorada que se tradujeron en una disminución de la dureza del músculo. Estos cambios fueron detectados mediante el equipo de espectroscopía de impedancia con el electrodo doble, con el cual se podría discriminar entre dorada congelada-descongelada y

dorada fresca. El sensor de punta de flecha no permitió discriminar entre ambos tipos de muestra, lo que evidencia la importancia del diseño del sensor de medida. En general, ni el tiempo de almacenamiento en congelación ni el número de ciclos de congelado fueron perceptibles en los parámetros evaluados ni con la técnica de espectroscopía empleada.

En el estudio de vida útil, los parámetros físico-químicos estudiados evidenciaron un mayor grado de deterioro durante el almacenamiento en refrigeración, para las muestras de dorada descongelada en comparación con dorada fresca. Sin embargo, el deterioro microbiológico se alcanzó prácticamente a los 7 días de almacenamiento en ambos tipos de muestra.

La técnica de espectroscopía de impedancia no consiguió discriminar entre los distintos tiempos de almacenamiento en refrigeración, lo que indica que los sensores empleados en este estudio no son adecuados para estimar la vida útil de dorada.

Debido a que la técnica de espectroscopía de impedancia con el electrodo doble ha sido capaz de detectar el daño ocasionado por la congelación en el músculo de pescado, sería interesante plantear nuevas experiencias empleando electrodos alternativos, que permitan detectar el deterioro del pescado durante su almacenamiento en refrigeración y predecir así la vida útil.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto “Empleo de Sensores Electrónicos en el Control de Calidad de Pescado y Productos Derivados” (PAID-06-09-2940), financiado por la Universidad Politécnica de Valencia, a la que los autores quieren expresar su agradecimiento.

Agradezco a Dios, mis padres, codirectoras y director por todo el apoyo, aprendizaje y acompañamiento. De manera muy especial a Pablo por tú valioso apoyo, además de ser el precursor de esta bonita experiencia en la UPV.

6. REFERENCIAS

- AOAC. 1997. Official Methods of analysis, 16th Ed. Association of Official Analytical chemists, Arlington, Virginia.
- Arannilewa, S. T.; Salawu, S. O.; Sorungbe, A. A.; Ola-Salawu, B. B. (2006). Effect of frozen period on the chemical, microbiological and sensory quality of frozen tilapia fish (*Sarotherodon galiaenus*). Nutrition & Health, 18(2), 185-192.
- Arashiar, S.; Hisar, O.; Kaya, M.; Yanik, T., (2004). Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. International Journal of Food Microbiology 97:209-214
- Barat J.M.; Gil L.; Breijo E.; Aristoy M.C.; Toldrà F.; Martínez R.; Soto J. (2008). Freshness monitoring of sea bream (*Sparus aurata*) with a potentiometric sensor. Food Chemistry, 108: 681–688.
- CEE (2005a). Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la Comisión de 5 de diciembre de 2005 por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos (...). Sección II, Capítulo I: Valores límite de nitrógeno básico volátil total (NBVT) para determinadas categorías de productos de la pesca y métodos de análisis que deberán utilizarse. Diario Oficial de la Unión Europea, L338, 36.

- CEE (2005b). Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. . Diario Oficial de la Unión Europea, L338, 1.
- Connell, J. J. (1995). Control of fish quality (4th ed.). Oxford: Fishing News Books.
- Dalgaard, P. (2000). Freshness, quality and safety in seafoods. Flair-Flow Europe Technical Manual. F-FE 380A/00.
- Ehira, S. y Uchiyama, H. (1987). Determination of fish freshness using the k value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness. D. E. Kramer, & J. Liston (Eds.), Seafood quality determination, 185-207.
- Fernández-Segovia, I.; Escriche, I.; Fuentes, A.; Serra, J. A. (2007). Microbial and sensory changes during refrigerated storage of desalted cod (*Gadus morhua*) preserved by combined methods. International Journal of Food Microbiology, 11: 64-72.
- Fernández-Segovia, I.; Escriche, I.; Serra, J.A. (2008). Evolution of volatile fraction and ATP related compounds during storage of desalted cod (*Gadus morhua*). Food Science and Technology International, 14(5): 37-47.
- Fuentes, A.; Fernández-Segovia, I.; Barat, J.M; Serra, J.A. (2011). Influence of sodium replacement and packaging on quality and shelf life of smoked sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). LWT-Food Science and Technology , 44: 917-923.
- Geddes, L. A. y Baker, L. E. (1989). Principles of Applied Biomedical Instrumentation. Wiley-Interscience.
- Iglesias, J.; Medina, I.; Bianchi, F.; Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M. (2009). Study of the volatile compounds useful for the characterisation of fresh and frozen-thawed cultured gilthead sea bream fish by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. Food Chemistry, 115(4), 1473-1478.
- ISO (2003). Norma ISO 4833:2003. Microbiología de los alimentos para el consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30°C.
- Karoui, R.; Thomas, E.; Dufour, E. (2006). Utilisation of a rapid technique based on front-face fluorescence spectroscopy for differentiating between fresh and frozen-thawed fish fillets. Food Research International, 39(3), 349-355.
- Kykkidou, S.; Giatrakou, V.; Papavergou, A.; Kontominas, M. G.; Savvaidis, I. N. (2009). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 °C. Food Chemistry, 11: 169-175.
- Lepetit, J. ; Sale, P. ; Favier, R.; Dalle, R. (2002). Electrical impedance and tenderisation in bovine meat. Meat Science, 60(1), 81-62.
- Malle, P. y Tao, S.H 1987. Rapid Quantitative Determination of Trimethylamine using Steam distillation. Journal of Food Protection, 50-(9), 756-769.
- Masot, R. (2010). Desarrollo de un sistema de medida basado en espectroscopía de impedancia para la determinación de parámetros fisicoquímicos en alimentos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Nunes, M.L., Cardinal, M., Mendes, R., Campos, R. M., Bandarra, N. M., Lourenço, H. M., *et al.* (1992). Effect of season and ice storage on proteins and lipids of sardine (*Sardine pilchardus*) minces and surimi. In H.H. Huss, M. Jakobsen, & J. Liston (Eds.). Quality assurance in the fish industry, (pp. 73-81). Amsterdam: Elsevier.
- Orak, H. H. y Kayisoglu, S. (2008). Quality changes in whole, gutted and filleted three fish species (*Gadus euxinus*, *Mugil cephalus*, *Engraulis encrasicolus*) at frozen storage period (-26 degrees C). Acta Scientiarum Polonorum - Technologia Alimentaria, 7(3), 15-28.
- Özogul, K.; Özyurt, G.; Kuley, E.; Özkutuk, S. (2009). Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. Food Chemistry, 114, 505-510.
- Pascual, M.R. y Calderón V. (2000). Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos, Madrid, España.
- Vyncke, W. (1995). The determination of total volatile bases in eye fluid as a non-destructive spoilage assessment test for fish. Archiv-fuer-Lebensmittelhygiene, 46: 96-98.

Wu, L.; Ogawa, Y.; Tagawa, A. (2008). Electrical impedance spectroscopy analysis of eggplant pulp and effects of drying and freezing-thawing treatments on its impedance characteristics. *Journal of Food Engineering*, 87: 274-280.