



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

APLICACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA EL ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA FRESCURA DE PESCADO

MASTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS

Nombre del Alumno: Édgar Pérez Esteve

Directores: José Manuel Barat Baviera

Raúl Grau Meló

Directora del trabajo experimental: Ana Fuentes López

Centro: Departamento de Tecnología de Alimentos (UPV)

APLICACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA EL ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE DE LA FRESCURA DE PESCADO

Pérez-Esteve, E.; Fuentes, A.; Barat, J.M.; Grau, R.

RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado la aplicación de la espectroscopía de impedancia para evaluar la frescura de pescado mediante el empleo de un equipo de espectroscopía de impedancia desarrollado en la Universidad Politécnica de Valencia. La experiencia se realizó a partir de 6 lotes de dorada (*Sparus aurata*) procedentes de dos piscifactorías diferentes. Se estudió la evolución de diferentes parámetros físico-químicos (humedad, grasa, pH y N-BVT) y las medidas de impedancia (módulo y fase a diferentes frecuencias), durante 15 de almacenamiento en refrigeración. Tras analizar los resultados obtenidos mediante análisis estadísticos multivariantes (análisis discriminante y PLS) se concluyó que es posible utilizar esta técnica para predecir el contenido de N-BVT en las muestras, el cual es considerado como un indicador del deterioro del pescado. En base a estos resultados, podemos afirmar que la técnica de espectroscopía de impedancia podría ser utilizada como técnica de determinación de la frescura de pescado.

RESUM

En el present treball s'ha estudiat l'aplicació de l'espectroscòpia d'impedància per avaluar la frescor de peix mitjançant l'ús d'un equip d'espectroscòpia d'impedància desenvolupat a la Universitat Politècnica de València. L'experiència es va realitzar a partir de 6 lots de dorada (*Sparus aurata*) procedents de dues piscifactories diferents. Es va estudiar l'evolució de diferents paràmetres físico-químics (humitat, greix, pH i N-BVT) i les mesures d'impedància (mòdul i fase a diferents freqüències), durant 15 d'emmagatzematge en refrigeració. Després d'analitzar els resultats obtinguts mitjançant anàlisis estadístiques multivariants (anàlisi discriminant i regressió PLS) es va concloure que és possible utilitzar aquesta tècnica per predir el contingut de N-BVT en les mostres, el qual és considerat com a un indicador del deteriorament del peix. En base a aquests resultats, podem afirmar que la tècnica d'espectroscòpia d'impedància podria ser utilitzada com a tècnica de determinació de la frescor de peix.

ABSTRACT

In the present study, the use of the impedance spectroscopy has been studied to assess fish freshness by using an impedance spectroscopy equipment developed at the Polytechnic University of Valencia. The experiment was carried out with 6 batches of seabream (*Sparus aurata*) from two different farms. The evolution of different physical and chemical parameters (moisture, fat, pH and TVBN) and impedance measurements (modulus and phase at different frequencies) was studied during 15 days of cold storage. After analyzing the obtained results by multivariate statistical analysis (discriminant analysis and PLS regression), it was concluded that this technique can be used to predict TVBN content in the samples, which can be considered as an indicative of fish spoilage. Based on these results, we can say that the technique of impedance spectroscopy could be used as a technique for determining fish freshness.

PALABRAS CLAVE: espectroscopía de impedancia; frescura; parámetros físico-químicos; NBVT; regresión PLS; análisis discriminante

1. INTRODUCCIÓN

Control calidad del pescado

La calidad del pescado es un concepto complejo que incluye factores relacionados con la nutrición, la microbiología, la bioquímica y la fisicoquímica. De todos ellos, a la hora de la comercialización y consumo de pescado, se utiliza un único atributo que incluye a los anteriores denominado frescura.

La frescura hace referencia al grado de deterioro que ha sufrido el pescado consecuencia de la acción de enzimas autolíticas endógenas y/o por el desarrollo de una flora de contaminación variada. Estos cambios están favorecidos por la composición química y el pH poco ácido del músculo de pescado. La flora contaminante se asienta básicamente sobre la piel y el intestino, y se extiende y multiplica en otros tejidos donde existen sustancias nutritivas adecuadas (sustratos de bajo peso molecular: aminoácidos, aminas volátiles) y un pH relativamente elevado. Como resultado, aparecen compuestos volátiles (trimetilamina, amoníaco, mercaptanos...) que confieren mal olor al pescado, se reblandece el músculo y se oxidan los lípidos y las hemoproteínas, modificando el color de la carne. (Pascual-Anderson, 2000).

Para evaluar la frescura, se han utilizado tradicionalmente diferentes técnicas, incluyendo métodos sensoriales, físicos, químicos y microbiológicos (Morales y col., 1996). Este tipo de pruebas tradicionales, pese a su objetividad, tienen varias limitaciones como son la necesidad de contar con jueces expertos cuando se utilizan pruebas sensoriales, la destrucción de la muestra cuando se utilizan parámetros químicos o una duración de los análisis de más de 2 o 3 días, cuando se realizan pruebas microbiológicas. Es por esto que, con el objetivo de acortar tiempos y abaratar costes, manteniendo la fiabilidad de los métodos tradicionales, se están buscando nuevas maneras de evaluar la frescura de pescado.

En este sentido, con el objetivo de desarrollar equipos de control de calidad que se puedan implantar tanto en la industria como en laboratorios, se está investigando la posible utilización de sensores no destructivos. Estos nuevos equipos presentarían como ventajas un análisis de bajo coste, buena fiabilidad, fácil manejo, alta portabilidad para mediciones on-line e in-situ y una mejora del rendimiento (Panagou et al., 2008).

Concretamente, métodos instrumentales de medida de textura y color, análisis de imagen, espectroscopía de UV, potenciometría, y otras técnicas como narices electrónicas y la espectroscopía de impedancia, se están estudiando como una alternativa a los métodos tradicionales. No obstante, pese a sus ventajas, todavía no se ha encontrado ningún método que por sí solo pueda ser propuesto para definir y medir la frescura del pescado (Barat et al., 2008).

Impedancia

La espectroscopía de impedancia es uno de los métodos no destructivos que pueden ser utilizados para determinar la caracterización composicional y estructural de materiales y estructuras biológicas. Se basa en la medición de la oposición que presenta un determinado material al paso de una corriente eléctrica y se compone de dos partes: una parte real Z' (resistencia) y una parte imaginaria Z'' (capacitancia). Por tanto, debido a que la impedancia es un valor complejo (sumas vectoriales) se opta por expresarla como un módulo y una fase calculados a partir de los valores de Z' y Z'' .

Estos valores de módulo y fase dependen del tipo de muestra, el electrodo utilizado (material, forma, longitud, diámetro y separación), así como del rango de frecuencia utilizado. Por este motivo, esta técnica se caracteriza por ofrecer los resultados del análisis como una matriz de datos, lo cual implica que para poder evaluar estas medidas se necesita utilizar procedimientos matemáticos avanzados, entre los que se encuentran las técnicas de análisis multivariantes. (Vidacek et al., 2008)

Técnicas de análisis multivariante

Se entiende por análisis multivariante a un conjunto de técnicas estadísticas que tratan de un modo simultáneo más de dos variables. Aunque se conocen desde hace más de 20 años, su verdadero desarrollo se ha producido en la última década, naciendo así el análisis multivariante actual. Con el fin de utilizar la mejor herramienta estadística en función del problema, los estadísticos han clasificado estas técnicas en cuatro grupos atendiendo a su objetivo: reducción del número de variables, discriminación, predicción y agrupación.

De todas ellas, las que más aplicación tienen en análisis de datos procedentes de sensores quimiométricos son aquellas con capacidad de reducción de la dimensión. A través de estos análisis, la información contenida en el número de variables originales (J) queda condensada en un número reducido de nuevas variables Z_f (componentes, dimensiones, variables latentes, constructores...) definidas como combinación lineal de las J variables primitivas. Estas nuevas variables Z_f no son observables directamente, están incorrelacionadas entre sí, no tienen unidades, y sólo es posible darles explicación desde la investigación técnica.

Objetivo

El objetivo del presente estudio fue evaluar la viabilidad de la técnica de espectroscopía de impedancia para determinar la frescura de diferentes lotes de dorada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia Prima

La materia prima utilizada para el estudio fue dorada (*Sparus aurata*) procedente de piscifactoría y de calibre 400-600 g. En este estudio, se empleó pescado de dos piscifactorías diferentes, denominadas a lo largo del estudio población G y población E, según su procedencia. Se denominó población G a las muestras procedentes de Interfish Aquaculture S. A. ubicada en Larimna, (Lokrida, Grecia) y población E a las adquiridas en Acuicola Marina S. A., ubicada en Burriana (Castellón, España). De cada una de las poblaciones se utilizaron 3 lotes diferentes, de manera que se utilizó un total de 6 lotes de dorada.

2.2 Preparación de la materia prima

A su llegada al laboratorio, las doradas fueron descabezadas, evisceradas y fileteadas obteniendo dos filetes de cada pescado. Los filetes se colocaron de manera individual en bolsas estériles de poliamida-polietileno 20-60 (Verpackungen GmbH, Sulzberg, Germany), las cuales fueron termoselladas y almacenadas en refrigeración (4°C) durante el periodo de estudio. Las muestras fueron analizadas periódicamente a días 0, 1, 2, 5, 7, 9, 12 y 15 de almacenamiento.

2.3 Determinaciones físico-químicas

Durante el periodo de estudio se determinaron los valores de humedad, grasa, pH y Nitrógeno Básico Volátil Total (N-BVT). Todas las determinaciones físico-químicas de las muestras de pescado se realizaron por triplicado.

Las determinaciones de humedad y grasa se realizaron a partir de los procedimientos 650.46 y 991.36, descritos por la AOAC (1997).

La determinación del contenido en Nitrógeno Básico Volátil Total (N-BVT) se realizó mediante el procedimiento descrito por Malle y Tao (1987).

La medida de pH se realizó mediante un pH-metro (Crison Basic 20+, Crison Instruments S.A, Barcelona, España) con electrodo de punción. Las medidas de pH se tomaron directamente en 4 zonas del filete (figura 1).

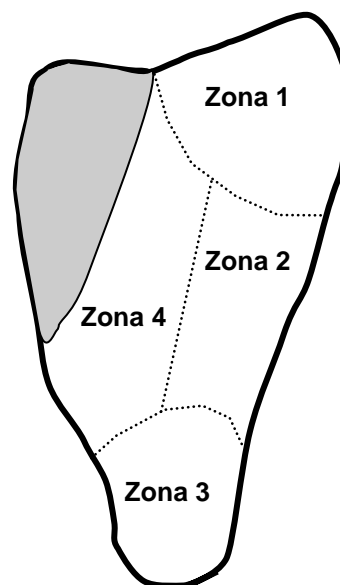


FIGURA 1. Esquema del un filete de dorada donde se detallan las diferentes zonas de punción para las determinaciones de pH y de espectroscopía de impedancia.

2.4. Medida de la impedancia bioeléctrica

Las medidas de impedancia se realizaron utilizando un equipo compuesto por una aplicación software que se ejecuta en un PC y de un equipo electrónico desarrollado por el Instituto de Química Molecular Aplicada (IQMA) de la Universidad Politécnica de Valencia.

La aplicación software lleva a cabo un barrido en frecuencias obteniendo el módulo y la fase de la matriz compleja que se está analizando en el rango configurado de 1 Hz a 1 MHz. El equipo electrónico recibe la información enviada por el ordenador y genera la señal senoidal. A continuación se muestrean las señales de tensión y corriente en el electrodo y los datos recogidos son enviados al PC. El PC recoge las muestras y lleva a cabo un análisis de Fourier (DFT) para determinar la amplitud y la fase de la impedancia de la señales de tensión y corriente en el electrodo. A partir de esos datos, el software calcula el módulo y la fase de la impedancia de la matriz compleja analizada para la frecuencia actual y quedan recogidos en un fichero de datos, repitiendo el mismo proceso para el resto de las frecuencias.

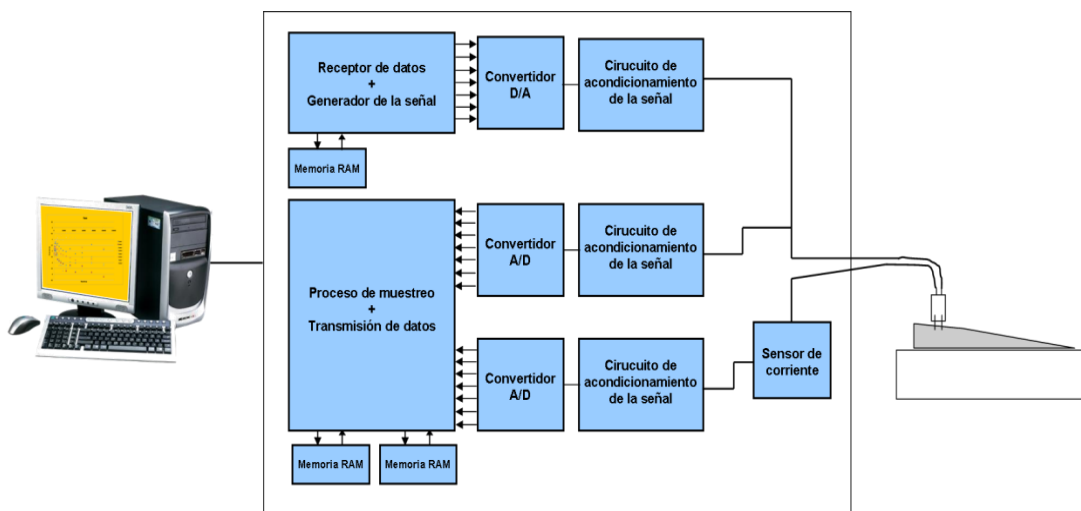


FIGURA 2. Diagrama de bloques del equipo de impedancia

Para el estudio se utilizó como sensor un electrodo doble, compuesto por dos agujas de acero inoxidable de 1 mm de diámetro y 1,5 cm de longitud, colocadas a una distancia entre sí de 1 cm.

Las medidas se realizaron sobre las mismas zonas descritas anteriormente para las determinaciones pH (figura 1) insertando completamente el electrodo con un ángulo aproximado de 45°.

Durante la medida de la impedancia las muestras permanecieron en el interior de una caja de poliespam sobre una capa de hielo aislada por film plástico, con el objetivo de mantener la temperatura estable en un valor próximo a 7-8 °C, no registrándose en ningún caso oscilaciones superiores a 1.5 °C

2.6 Análisis estadístico de los datos

El estudio estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo utilizando el programa Statgraphics Centurion XV (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA). Mediante la herramienta ANOVA se evaluó la significancia de las diferencias entre las medidas físico-químicas de las muestras a lo largo de los días de almacenamiento con el objetivo de estudiar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes lotes, tomando un nivel de significación establecido de $\alpha=0,05$.

Mediante la herramienta análisis discriminante, basada en la búsqueda de la combinación lineal de las variables independientes que mejor permite discriminar entre grupos previamente definidos (variables categóricas), se estudió la capacidad de la espectroscopía de impedancia para diferenciar entre poblaciones, lotes y tiempo de almacenamiento a partir de los datos de impedancia.

Por último, mediante un modelo de Mínimos Cuadrados Parciales, también conocido como Partial Least Squares (PLS), se estableció una ecuación para predecir el valor de las diferentes variables físico-químicas en función de los datos de módulo y fase de impedancia. Tras la estimación del modelo de predicción, se evaluó su rendimiento mediante una validación "*cross-validation*", la cual se basa en la separación de los valores correspondientes a una muestra, la creación de un modelo con los datos restantes, y la utilización de este modelo para la predicción de la variable que ha sido separada. El número de componentes que se extrae es un parámetro importante en un modelo PLS, de manera que sólo se investigaron aquellos modelos construidos con un número de componentes inferior a 10. Por otra parte, con el objetivo de optimizar el modelo, para cada uno de los análisis, se utilizaron varios métodos de estandarización como son la centralización, el autoescalado y la transformación logarítmica (Gómez-Carracedo et al., 2007)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de la materia prima

En la tabla 1 se muestran los valores de humedad, grasa, N-BVT y pH promedio de las cuatro zonas, de las muestras frescas procedentes de los diferentes lotes.

TABLA 1. Caracterización de la materia prima

Población	Lote	Humedad	Grasa	N-BVT	pH ¹
G	1	72,78±1.34 ^a	5,97±1.15 ^a	16.08±1.04 ^a	6.20±0.05 ^a
G	2	73,21±2.00 ^a	5,39±0.09 ^a	16.93±1.94 ^{ab}	6.31±0.05 ^b
G	3	73,32±0.60 ^a	7,07±0.54 ^a	19.47±1.06 ^c	6.10±0.06 ^c
E	1	68,94±3.37 ^b	10,43±1.5b ^{bc}	18.96±0.08 ^c	6.02±0.07 ^d
E	2	69,93±0.96 ^b	11,30±1.03 ^b	18.80±0.00 ^{bc}	6.20±0.05 ^a
E	3	69,84±0.43 ^b	9,58±0.21 ^c	18.89±0.16 ^c	6.08±0.06 ^c
		***	***	*	***

Letras iguales en una misma columna indican la pertenencia a grupos homogéneos.

* 0.05>p>0.01; *** p<0.001

¹ Valor promedio de pH para las 4 zonas de estudio

Los valores obtenidos en la caracterización físico-química de la materia prima coinciden con los datos obtenidos por otros autores para esta misma especie y sistema de cría (Kyrana et al., 1997; Cakli et al., 2007; Orban et al., 1996).

Para comprobar la existencia de diferencias significativas en función del lote de pescado, se realizó un análisis de la varianza simple (ANOVA), considerando como variable cada uno de los parámetros físico-químicos y como factor el lote analizado. El análisis estadístico mostró la existencia de diferencias significativas (p<0.001) entre los lotes pertenecientes a las dos poblaciones de estudio en cuanto a los valores de grasa y humedad, de manera que las muestras procedentes de la población G presentaron valores significativamente superiores en humedad y menores en grasa que la población E. Las diferencias en el contenido de lipídico podrían atribuirse a diferentes aspectos relacionados con la edad del individuo, climatología, alimentación,... Estas diferencias podrían condicionar las diferencias en el contenido en humedad, ya que en el pescado, el contenido en humedad y grasa está directamente relacionado, de manera que en su conjunto constituye aproximadamente un 80% del total de la composición del mismo (Belitz y Grosch, 1997). Así, un aumento en el contenido graso se produciría a expensas de una reducción del contenido en agua, por lo que existe una correlación inversa entre el contenido en humedad y grasa.

En el caso del contenido en N-BVT, se encontraron diferencias significativas entre los diferentes lotes, aunque estas diferencias no se asocian a la existencia de dos poblaciones. Por otra parte, considerando que la concentración de N-BVT en pescado recién capturado oscila entre los 5 y los 20 mg/100 g, que niveles de 30-35 mg/100 g son generalmente considerados como el límite de aceptación para pescado almacenado en hielo (Connell, 1995; Huss, 1995), y que todas las muestras analizadas se encontraban por debajo de este límite, se pudo afirmar que atendiendo a este parámetro, todas las muestras presentaban un rango de frescura aceptable en el momento del análisis.

Respecto al valor de pH promedio de cada uno de los filetes, el análisis estadístico mostró la existencia de diferencias significativas entre los diferentes lotes ($p < 0.001$). Cuando se analizó el pH diferenciando entre las 4 zonas donde se tomaron las medidas, descritas en la figura 1, se observó que el valor de pH en los lotes frescos depende de la zona de punción, de manera que en la zona 1 (zona próxima a la cabeza) presenta mayores valores de pH que el resto de zonas. No se encontraron diferencias significativas en los valores de pH del resto de zonas (Figura 2).

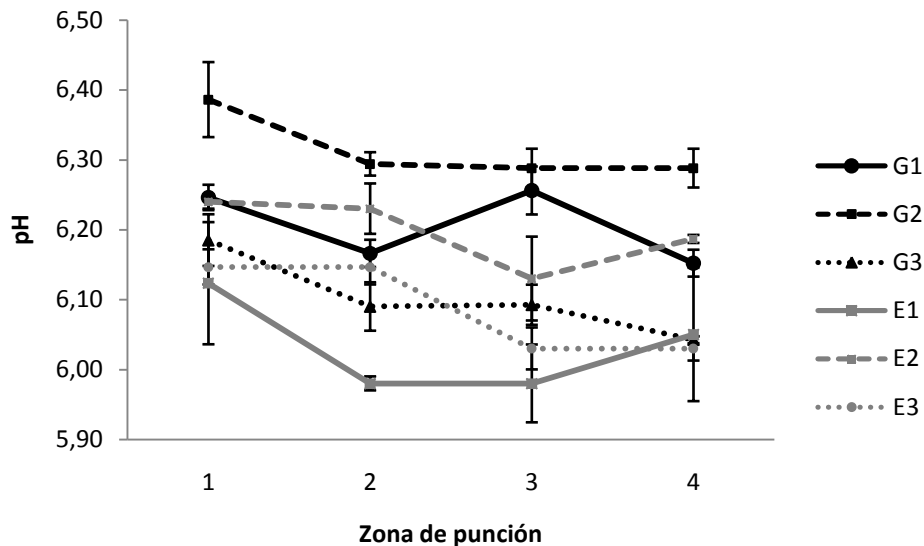


FIGURA 3. Valores de pH (media + SD) de los diferentes lotes en cada una de las 4 zonas de punción.

3.2 Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo del estudio de almacenamiento

Durante el estudio de almacenamiento en refrigeración se determinaron los valores de humedad, grasa, pH y N-BVT para cada lote. No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para los parámetros de humedad y grasa durante el periodo de almacenamiento en refrigeración.

Los valores de pH permanecieron prácticamente estables durante todo el periodo de estudio, oscilando entre 6,0 y 6,2 en los filetes de la población E y entre 6,2 y 6,4 los filetes de la población G (Figura 4). Estos valores se consideran normales para la etapa post-mortem, ya que, aunque en general el valor típico de pH del pescado vivo está alrededor de 7,0, después de su captura este valor desciende a 6,2 – 6,5 por el acúmulo de ácido láctico en el músculo (Huss, 1995; Pascual Anderson, 2000). Posteriormente, vuelve a aumentar de forma gradual debido a la producción de metabolitos alcalinos de origen bacteriano. Por ello, tal y como han señalado diferentes autores, existiría una relación directa entre los valores de pH y los recuentos de microorganismos totales (Kyrana y Lougovois, 2002). No obstante, hay que destacar también que, respecto a los valores de pH de dorada fresca consultados en bibliografía se observa cierta variabilidad (Cakli et al., 2007; Kyrana y Lougovois, 2002; Orban et al., 2002), lo que confirmaría que el pH del músculo de pescado depende de múltiples factores y por tanto, son posibles estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los valores de pH de las diferentes poblaciones.

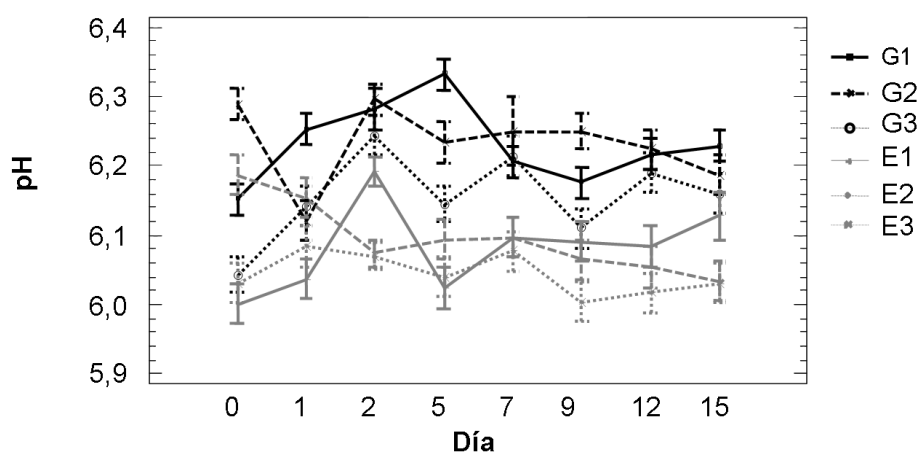


FIGURA 4. Gráfico de interacción e las variables día y lote en el valor de pH (promedio e intervalos LSD de Fisher)

Cabe destacar también la interacción existente entre el valor de pH y la zona de medida de la misma. En la figura 5 se muestra cómo a partir del día 0 de almacenamiento, para el cual era la zona 1 la que presentaba un valor de pH significativamente más elevado que el resto en cada uno de los lotes (figura 3), se produce un cambio, y son los valores de la zona 3 superiores a los de las zonas 1 y 2 y zona 4, respectivamente. De esta manera, podemos decir que es la zona próxima a la cola es la que mayores aumentos de pH presenta respecto a la materia prima fresca, seguidos por las zonas musculares del centro de la pieza y la zona próxima al vientre. Así, podemos decir que es la zona de la cola la que se degrada más rápidamente, pues es la que antes empieza a acumular metabolitos alcalinos.

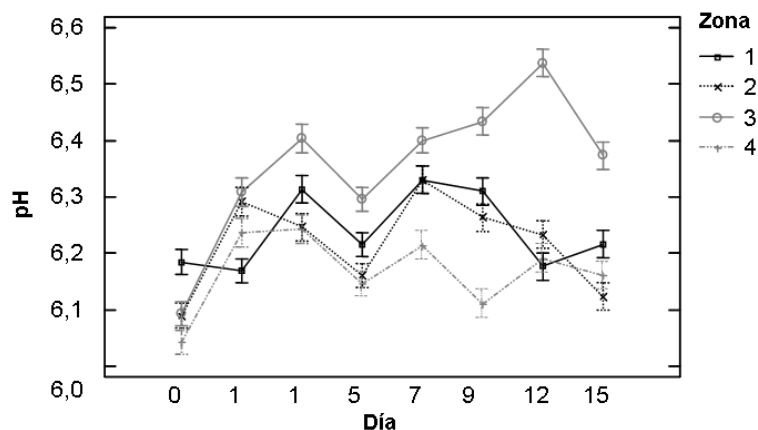


FIGURA 5. Gráfico de interacción de las variables zona y día en el valor de pH (promedio e intervalos LSD de Fisher) a lo largo del periodo de almacenamiento para las 4 zonas de medida

Respecto al contenido en N-BVT, tal y como se observa en la figura 6, los valores permanecieron prácticamente estables durante los primeros días de estudio. Sin embargo, a partir del día 5 de almacenamiento, el contenido en N-BVT empieza a aumentar progresivamente, siendo este aumento más acusado para las muestras procedentes de Grecia. Por otra parte, considerando que el límite legal de aceptación para el N-BVT establecido por la Unión Europea (CEE, 2005) para pescado fresco es de 30 mg N/100 g pescado (línea horizontal en la figura), podemos decir que, mientras que las muestras de la población E serían aptas para el consumo durante todo el tiempo del estudio, algunas muestras de la población G quedarían fuera del consumo antes de la primera semana de almacenamiento. Estas diferencias de comportamiento de la población G respecto a la E, podrían deberse a posibles daños o contaminación cruzada durante la manipulación o transporte, una rotura de la cadena de frío o a llevar varios días en almacenamiento antes de la venta.

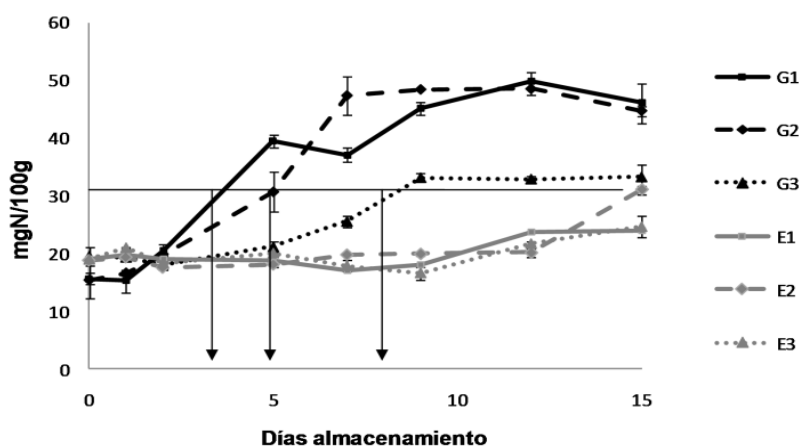


FIGURA 6. Evolución del contenido en N-BVT (media y SD) durante el almacenamiento

3.3 Caracterización de la materia prima mediante la medida de su espectroscopía de impedancia

En las figura 7 se muestran las curvas típicas de módulo y fase obtenidas en la medida de espectroscopía de impedancia para cada una de las 50 frecuencias ensayadas.

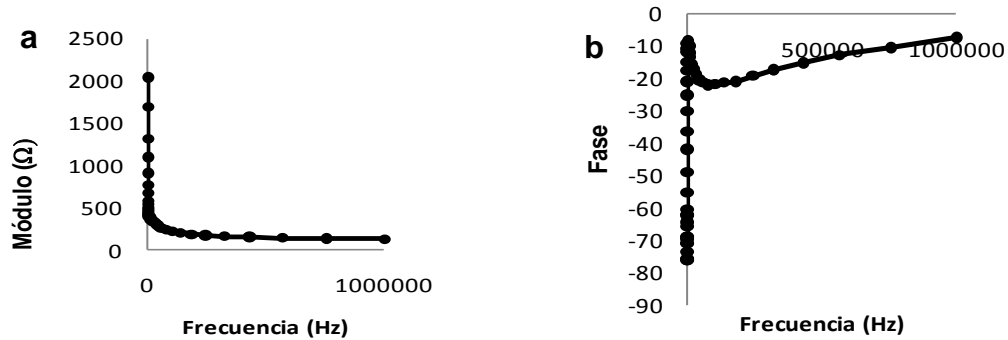


FIGURA 7. Representación de las curvas típicas de módulo (a) y fase (b)

A partir del conjunto de datos obtenidos durante la medida de impedancia de los lotes en su día 0, y utilizando un análisis discriminante en el cual se incluyó como factor de clasificación el lote y como datos los 50 valores de módulo y fase de módulo y fase obtenidos en cada una de las medidas de impedancia, se evaluó la capacidad de la técnica de espectroscopía de impedancia para diferenciar entre los filetes de las dos poblaciones de pescado utilizadas en el estudio. En la figura 8 se puede observar cómo la Función 1 determinó la agrupación de los lotes en dos grupos diferenciados, coincidiendo estos grupos con las poblaciones G y E de nuestro estudio. Dentro de cada una de estas dos poblaciones, la Función 2 permitió la diferenciación entre cada uno de de los lotes de ambas poblaciones.

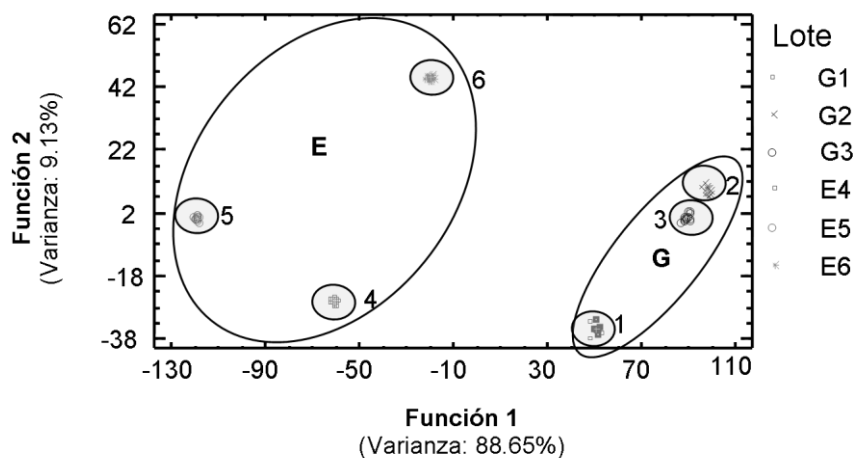


FIGURA 8. Representación de las dos funciones discriminantes para las muestras de dorada en función del lote.

Estos resultados coinciden con las diferencias encontradas en los análisis de humedad y grasa sobre la materia prima (tabla 1), donde se observaba que las muestras pertenecientes a la población G son homogéneas entre sí, tanto para humedad como para grasa, mientras que las muestras de la población E se agrupan en un solo grupo atendiendo a los valores de humedad, pero en dos según la cantidad de grasa.

El efecto de la zona donde se toma la medida sobre los valores de módulo y fase registrados se evaluó mediante un análisis discriminante, donde se introdujeron todas las frecuencias de módulo y fase obtenidas para la caracterización de los filetes frescos de cada uno de los lotes por separado, comprobándose la posibilidad de diferenciar cuatro grupos. En la figura 9 se muestran los resultados del análisis discriminante para el lote E1. En ella se observa que la zona 1 es la más alejada del resto. Estos resultados coinciden con los observados en la figura 2, donde se muestra cómo es la zona 1 la que presenta valores de pH más elevados. Por otra parte, se puede observar cómo los valores de las zonas 2 y 4 se presentan próximos, y que el lote 3 puede relacionarse con el lote 1 atendiendo a la función 2. Resultados similares se observaron en los análisis discriminantes del resto de lotes analizados.

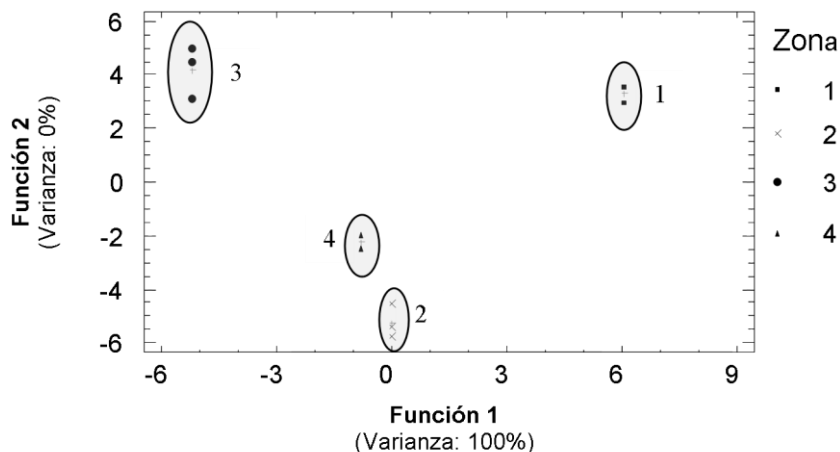


FIGURA 9. Análisis discriminante de los valores de impedancia en función de la zona de medida

3.4 Evolución de las medidas de impedancia (módulo y fase) durante el almacenamiento

En la figura 10 se presenta un análisis discriminante construido a partir de los datos de módulo y fase de impedancia obtenidos en las medidas de las muestras de las poblaciones G (f.10a) y E (f.10b) en cada uno de los días de análisis del estudio. Como se observa, en ambos casos es posible, a partir de las dos primeras funciones discriminantes, establecer tres grupos en función de los días de almacenamiento que tienen las muestras. No obstante, esta separación es más clara en la figura 10b, en la cual además es posible la agrupación entre días independientemente del lote evaluado.

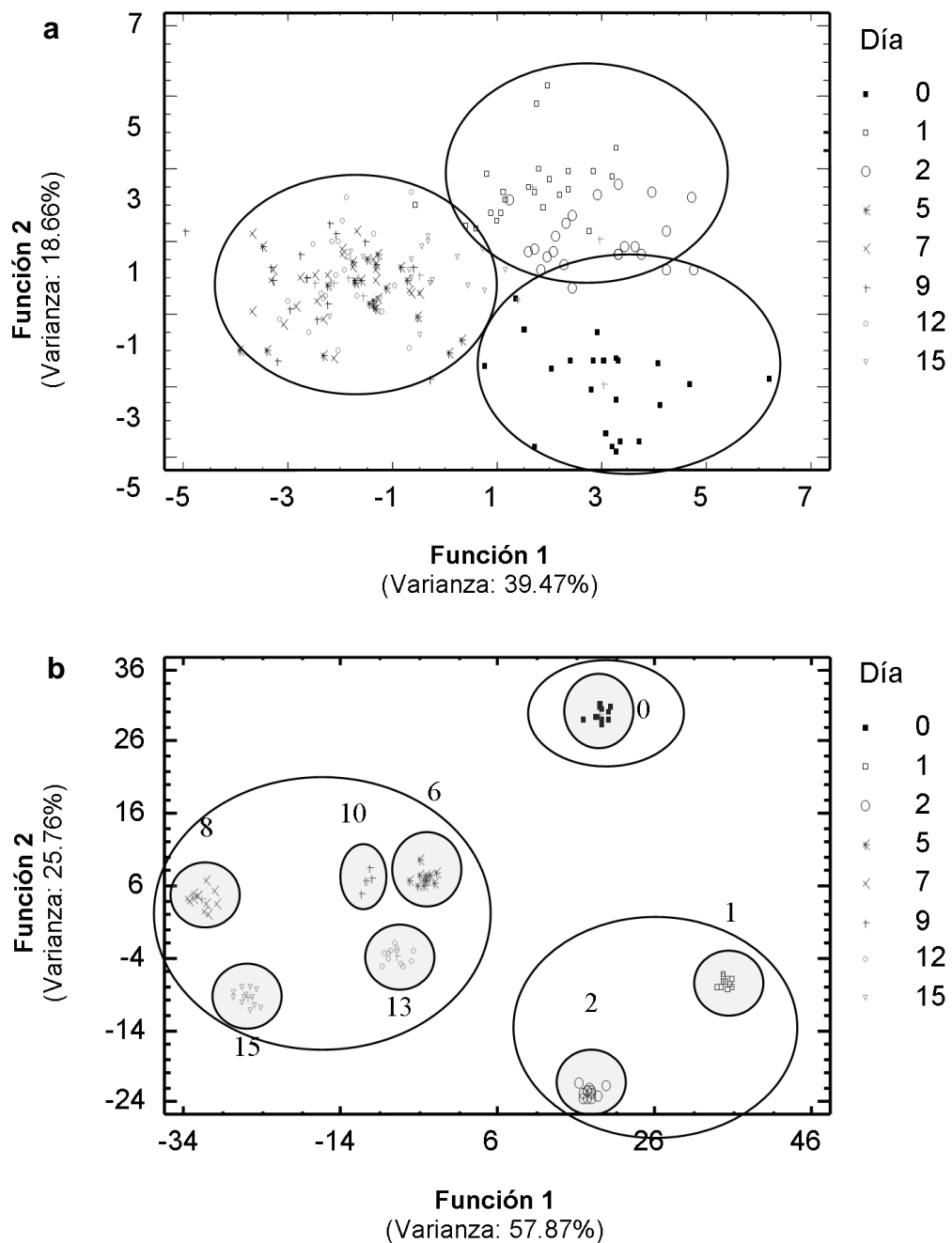


FIGURA 10. Gráfica de funciones discriminantes de los valores de impedancia en función del día de almacenamiento para la población G (10.a) y E (10.b)

Este hecho podría atribuirse a que las muestras pertenecientes a la población G, hubieran sufrido algún daño o rotura de la cadena de frío durante el transporte o presentaran un mayor tiempo post-mortem en el momento de la compra, lo cual explicaría el mayor contenido en N-BVT y el hecho de superar antes el valor de 30 mg de N/100g de producto.

Por otra parte, y atendiendo a los resultados mostrados en la figura 10.b para las muestras de la población E, se puede decir que la clasificación en tres grupos atendiendo al tiempo de almacenamiento, puede tener relación con los cambios estructurales que sufren las muestras de pescado, y que han sido descritas por otros autores. Caballero et al (2009) comprobaron que durante los dos primeros días post-mortem la estructura muscular se mantiene intacta. A partir del segundo día la adhesión entre fibras disminuye y se produce un desprendimiento de las miofibrillas. Por último a partir del día 4, y se produce una desintegración del músculo provocada por la ruptura y pérdida de las membranas celulares de las fibras. A partir del día 10, y particularmente a partir del día 14 de almacenamiento, estos cambios comienzan a ser más evidentes. Todos estos cambios son consecuencia de los cambios bioquímicos y estructurales que sufre el pescado tan pronto como es capturado y muere por parte de dos principales agentes de alteración: enzimas y bacterias endógenas. Los efectos resultantes se hacen aparentes en diferentes momentos, pudiendo distinguirse dos fases que se solapan. La primera es la autólisis, que puede ser considerada, en un sentido pasivo, como una pérdida de frescura, esto es, como una alteración consecuente con la rotura del equilibrio de las funciones metabólicas del pez; más tarde, la actividad bacteriana produce los efectos más pronunciados de una alteración evidente y finalmente el pescado se vuelve incomedible. (Davis, 1995)

La capacidad comprobada de la espectroscopía de impedancias para evaluar e identificar estos cambios producidos durante el deterioro del músculo de pescado durante del almacenamiento, puede deberse a que con el aumento del deterioro muscular causado por los microorganismos o enzimas, la concentración de productos metabólicos iónicos disueltos aumenta, y esto tiene como efecto un aumento de la conductividad, y por tanto una disminución de la impedancia del sistema (Marshall and Wicss-Lehig, 1997).

3.5 Obtención de modelos PLS para establecer la relación entre impedancia y pH, días de almacenamiento, N-BVT

Para cada uno de los diferentes parámetros considerados en este estudio, se obtuvieron diferentes modelos de predicción PLS. Los procedimientos PLS están diseñados para construir un modelo estadístico que relaciona múltiples variables independientes con múltiples variables dependientes. Actualmente, este es uno de los procedimientos más útiles para predecir una variable respuesta a partir de muchos factores, siendo una de sus aplicaciones más estudiadas la de establecer modelos empíricos basados en la correlación de datos de referencia con otros de dimensión superior, mostrando una fuerte correlación entre ellos y permitiendo predecir así una propiedad de interés (física, química o sensorial) (Helland, 2001; Bajwa et al., 2009)

Los diferentes modelos se construyeron a partir de la selección de diferentes variables: totalidad de módulos y fases, sólo los módulos, sólo las fases, sólo algunos rangos de frecuencia, y aplicando o no tanto el auto-escalado como la transformación logarítmica de las variables. De todos ellos, se seleccionó el modelo de predicción que mayor variabilidad recoge, atendiendo a los valores de R^2 y Press de cada uno de los análisis.

El valor de R^2 indica el porcentaje de la varianza que es explicado por el modelo, mientras que el valor Press hace referencia a la suma de cuadrados de los errores de la predicción para la variable, y se corresponde con la desviación al cuadrado entre el valor observado y estimado. Se considera un buen modelo aquel que minimiza el valor de Press. No obstante, por el principio de parsimonia, el cual concluye que si existen dos modelos que solucionan el problema planteado de forma no significativamente diferente es preferible elegir aquel que sea más sencillo por ser más fácilmente interpretable y reducir los riesgos de sobreajuste a la muestra, y por tanto se debería buscar aquel modelo que contenga el menor número posible y componentes y que no difiera demasiado del valor mínimo Press. (Valencia et al., 2003).

TABLA 2. Resultados de las regresiones PLS

	PLS-C	Calibración		Predicción
		R^2	Press	R^2
Días	10	0.54	2896	0.33
Humedad	8	0.62	852	0.53
Grasa	8	0.66	534	0.59
pH	7	0.45	1	0.38
N-BVT	8	0.79	5106	0.72

PLS-C Número de componentes considerados en el modelo PLS

En la Tabla 2 se muestran los valores de R^2 y Press, tanto de calibración como de predicción, de los modelos seleccionados para la descripción de nuestras muestras. Estos modelos fueron construidos considerando todos los valores de módulo y fase para cada una de las frecuencias ensayadas una vez autoescalados. En algunos casos, la utilización exclusiva de valores de módulo o valores fase, supusieron una mejora del R^2 de predicción hasta en un 4%. No obstante, con el objetivo de estandarizar los procedimientos, se ha preferido operar de modo semejante con todos los parámetros.

Como se observa, el parámetro para el cual se ha encontrado una mejor correlación con las medidas de impedancia fue el porcentaje de N-BVT, (R^2 de predicción = 0.72) (Figura 11). En menor medida se ajustaron los porcentajes de humedad, grasa, días de almacenamiento y pH. De esta manera podemos decir que la evolución de la impedancia se correlaciona, sobre todo, con la degradación del músculo del pescado durante el almacenamiento.

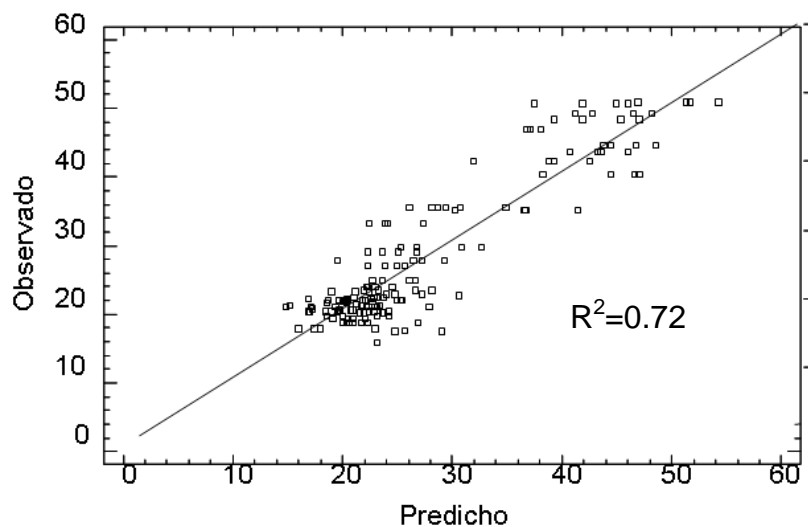


FIGURA 11. Comparación de los porcentajes de N-BVT determinados analíticamente con los predichos por el modelo PLS

Por otra parte, los valores iniciales de grasa y humedad propios de cada una de las muestras, parecen no afectar a los modelos de predicción del deterioro, atendiendo al escaso porcentaje de variabilidad que se puede explicar mediante un modelo PLS y a que la introducción de estos datos en la construcción de los modelos de predicción de N-BVT no modifican el ajuste del modelo obtenido.

Cuando los mismos análisis estadísticos se realizaron diferenciando las 4 zonas diferentes de de punción, se observó que para todos y cada uno de los parámetros analizados la R^2 , tanto de calibración como de predicción, disminuyó mientras que los valores de Press aumentaron, y el número de componentes extraídos disminuyó, llegando en algunos casos hasta 1. De esta manera, el tratamiento de los datos diferenciando entre las cuatro zonas de medida simplifica los modelos obtenidos, aunque hace que se pierda parte de la varianza explicada, pudiendo esto último deberse a que con la disminución del número de valores con los que se construye el modelo, éste pierde potencia de ajuste y de predicción.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la capacidad de utilización de la espectroscopía de impedancia como herramienta de predicción de la frescura de pescado. No obstante, antes de proponer este equipo como una alternativa ante los métodos de evaluación tradicionales, cabría optimizar el protocolo de medida de la espectroscopía de impedancia mediante la optimización de los rangos de frecuencia utilizados y el desarrollo de nuevos electrodos, lo que podría mejorar el ajuste de los modelos PLS.

Por otra parte, se ha comprobado la necesidad de distinguir entre las diferentes zonas del filete a la hora de realizar la punción de los electrodos de impedancia, ya que los valores de impedancia obtenidos dependían de la zona donde se realizó la misma.

Como continuación del estudio se propone incluir otros índices de deterioro del pescado como la determinación del contenido en aminos biógenos, la medida de las propiedades mecánicas, el análisis sensorial o recuentos microbiológicos, y establecer su relación con la impedancia. Por otra parte, cabría estudiar la eficacia del equipo de impedancia para evaluar los cambios en la calidad de la dorada tras el tratamiento de congelación, ya que ha sido demostrado que los principales daños en los tejidos durante la congelación se relacionan muy bien con las características de impedancia de los tejidos (Tian-Hua et al., 2004)

5. AGRADECIMIENTOS

A José Barat, por confiar en mi desde hace ya casi dos años y darme la oportunidad de trabajar en aquello que me gusta. A Raúl, Chus, Isa, Javi y Puri, por hacerme sentir parte sus proyectos de investigación.

A Amparo, Chelo y Marta, por su excelente y cálida acogida desde el comienzo de mi trabajo en el instituto. A los compañeros del laboratorio, por el buen ambiente de trabajo y cooperación que siempre se crea, y en especial a Diana, quien desde lo lejos me sigue mandando ánimos semana tras semana.

A Rafa y Miguel, por su respuesta inmediata ante cualquier problema con el equipo de impedancia.

A mis padres y amigos, por aguantar verme tan poco el pelo, y pese a eso, seguir estando ahí.

Y sobre todo gracias a Ana, quien ha sido la fuente de conocimiento, de experiencia, de consejo y de paciencia conmigo y con mi trabajo, que un día tras otro he necesitado.

6. REFERENCIAS

- AOAC. 1997. Official Methods of análisis, 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.
- Bajwa, S. G.; Kandaswamy, J.; Apple, J. K. 2009. Spectroscopic evaluation of the nutrient value of ground beef patties. *Journal of food engineering*, 92 (454-460)
- Barat, J. M.; Gil, L.; Garc, L.; Gar, E.; ARistoy, M. C.; ToldrC, F.; Mart; Martoldr, R; Soto, J. 2008. Freshness monitoring of sea bream (*Sparus aurata*) with a potentiometric sensor. *Food Chemistry*, 108 (681–688)
- Belitz, H.D; Grosch, D. 1997. Peces, ballenas, crustáceos y moluscos. En: *Química de los alimetos*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, pp. 667-689.
- Caballero, M. J.; Betancor, M.; Escrig, J. C.; Montero, D.; Espinosa de los Monteros, A.; Castro, P.; Ginés, R.; Izquierdo, M. 2009. Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture*, 291 (210-216)
- Cakli, S.; Kilinc, B.; Cadun, A.; Dincer, S.; Tolasa, S. 2007. Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18 (391-397)
- Connell, J. J. 1995. Method of assessing and selecting for auality. En: *Control fish quality* (4th ed). Fishing News Books Ltd, Surrey, pp 157, 159-160.
- Consejo de la Comunidad Económica Europea (CEE). 2005. 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.
- Davis, H. K. 1995. Calidad y alteración del pescado crudo. En: Ruitter, A. (ed). *El pescado y los productos derivados de la pesca*. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, pp. 226-233
- Gómez-Carracedo, M. P.; Andrade, J. M.; Rutledge, D. N.; Faber, N. M. 2007. Selecting the optimum number of partial least squares components for the calibration of attenuated total reflectance-mid-infrared spectra of undesigned kerosene samples. *Analytica Chimica Acta* 585, (253–265)
- Helland, S. 2001. Some theoretical aspects of partial least squares regression. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*. 58 (97–107)
- Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. En Huss, H. H. (Ed.) *FAO Fisheries Technical Paper* 348, Rome, pp. 195.
- Kyran, V. R.; Lougovois, V.; Valsamis, D. 1997. Assessment of shelf-life or maricultured gilthead sea bream (*Saparus aurata*) stored in ice, *International Journal of Food Science and Technology*, 32 (339-347)
- Kyranan, V. R.; Lougovois, V. P. 2002. Sensory and chemical and microbial assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 37 (319-328)
- Malle, P; Tao, S.H. 1987. Rapid Quantitative Determination of Trimethylamine using Steam distillation. *Journal of Food Protection*, 50-9 (756-769).
- Marshall, D.L., Lehigh, P.L.W., 1997. Comparison of impedance, microbial, sensory, and pH methods to determine shrimp quality. *J. Aquatic Food Product Tech.* 6 (17–31)
- Morales, P.; Haza, A. I.; Ikken, Y.; Martinez, A.; Sanz, B.; Hernandez, P. E. 1996. Freshness and quality of fish: inspection and evaluation. II Evaluation methods. *Alimentación, equipos y tecnología*, 15 (139-147)
- Orban, E.; Sinesio, F. Paoletti, F. 1997. The functional properties of the Proteins, Texture and the Sensory Characteristics of Frozen Sea Bream Fillets (*Sparus aurata*) from Different Farming Systems. *LWT - Food Science and Technology*, 30 (214-217)
- Orban, E.; Di Lena, G.; Casini, I., Navigato, T.; Casini, I.; Santaroni, G.; Marzetti, A.; Carponi, R. 2002. Quality characteristics of sea bass intensively reared and from lagoon as affected by growth conditions and the aquatic environment. *Journal of Food Science* 67, (542-546)
- Pascual-Anderson, M. R. 2000. Microbiología alimentaria. En: *Metodología para alimentos y bebidas*. Ed. Díaz de Santos, S. A., 2ª edición, Madrid, pp 441

- Panagou, E.Z.; Sahgal, N.; Magan, N.; .E. Nychas G.-J. 2009. Table olives volatile fingerprints: Potential of an electronic nose for quality discrimination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134 (902-907)
- Tian-Hua, Y.; Jing, L.; Yi-Xin, Z. 2004. Using electrical impedance detection to evaluate the viability of biomaterials subject to freezing or thermal injury. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (1793–1800)
- Valencia Delfa, J. L; Diaz-Llanos, J; Sainz Calleja. 2003. Número de componentes a retener por validación cruzada. En: *Regresión PLS en las ciencias experimentales*. Editorial Complutense S. A., Madrid, pp. 47-50
- Vidacek, S.; Medic, H.; Botka-Petrak, K.; Nezak, J.; Petrak, T. 2008. Bioelectrical impedance analysis of frozen sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Food Engineering*, 88 (263-27).