

APLICACIÓN DE LENGUA ELECTRÓNICA EN LA EVALUACIÓN DE CALIDAD DE BACALAO

Ruiz Rico, M.; Fuentes López, A.; Fernández Segovia, I.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación de la lengua electrónica en la determinación de la vida útil de bacalao fresco almacenado en refrigeración. Para ello, se llevaron a cabo análisis físico-químicos, microbiológicos, así como medidas con las lenguas electrónicas. El pH y la humedad no mostraron variaciones significativas en el tiempo. El nitrógeno básico volátil total (NBVT) presentó un incremento progresivo a lo largo del período de almacenamiento evidenciándose así el deterioro sufrido durante los días de estudio. Entre el cuarto y el quinto día de almacenamiento las muestras superaron el límite de 35 mg NBVT/100 g, por lo que el pescado no sería apto para su consumo a partir de ese momento. Los valores iniciales de IMP no fueron muy altos, lo que evidencia que al inicio del estudio el pescado ya presentaba una cierta degradación, por la transformación de IMP en Ino. El rápido incremento en el valor K_1 al principio del estudio, indica que los cambios más importantes relacionados con el deterioro de las muestras tuvieron lugar durante los primeros días de almacenamiento. Todas las muestras superaron el límite de mesófilos de 10^6 ufc/g y de 10^3 ufc/g para enterobacterias a partir del cuarto día de estudio. Así, se podría concluir que la materia prima empleada en este estudio presentaba una vida útil inferior a 4 días. La lengua voltamétrica consiguió discriminar el día 0 y el día 1 de almacenamiento del resto de días. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los análisis físico-químicos y microbiológicos, en los que se evidenció una clara pérdida de frescura desde el día 0 al día 4. En los modelos obtenidos con el PLS para el NBVT y para mesófilos, los valores predichos se ajustaron satisfactoriamente a los valores reales lo que volvería a confirmar el potencial de la lengua voltamétrica en la evaluación del deterioro del bacalao fresco.

RESUM

L'objectiu d'aquest treball va ser avaluar l'aplicació de la llengua electrònica en la determinació de la vida útil de bacallà fresc emmagatzemat en refrigeració. Per a això, es van dur a terme anàlisi físicoquímics, microbiològics, així com mesurades amb les llengües electròniques. El pH i la humitat no van mostrar variacions significatives en el temps. El nitrogen bàsic volàtil total (NBVT) va presentar un increment progressiu al llarg del període d'emmagatzematge evidenciant-se així la deterioració soferta durant els dies d'estudi. Entre la quart i el cinquè dia d'emmagatzematge les mostres van superar el límit de 35 mg NBVT/100 g, per la qual cosa el peix

no seria apte per al seu consum a partir d'aquest moment. Els valors inicials de IMP no van ser molt alts, la qual cosa evidència que a l'inici de l'estudi el peix ja presentava una certa degradació, per la transformació de IMP en Ino. El ràpid increment en el valor K_1 al principi de l'estudi, indica que els canvis més importants relacionats amb la deterioració de les mostres van tenir lloc durant els primers dies d'emmagatzematge. Totes les mostres van superar el límit de mesòfils de 106 ufc/g i de 103 ufc/g per enterobactèries a partir del quart dia d'estudi. Així, es podria concloure que la matèria primera empleada en aquest estudi presentava una vida útil inferior a 4 dies. La llengua voltamètrica va aconseguir discriminar el dia 0 i el dia 1 d'emmagatzematge de la resta de dies. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en les anàlisi fisicoquímics i microbiològics, en els quals es va evidenciar una clara pèrdua de frescor des del dia 0 al dia 4. En els models obtinguts amb el PLS pel NBVT i per a mesòfils, els valors predits es van ajustar satisfactòriament als valors reals el que tornaria a confirmar el potencial de la llengua voltamètrica en l'avaluació de la deterioració del bacallà fresc.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the use of the electronic tongue in the shelf life assessment of fresh cod in cold storage. For this purpose, physical-chemical and microbiological analyses, as well as measurement with the electronic tongue were carried out. Moisture and pH did not show significant differences throughout the storage time. Total volatile basic nitrogen (TVBN) exhibited a gradual increase during the storage, showing the spoilage that samples underwent throughout the days of study. Samples exceeded the limit of 35 mg TVBN/100 g between the fourth and fifth day of storage, therefore the fish would be not fit for consumption from that moment. The initial values of IMP were not very high, which demonstrates that at the beginning of the study the fish already showed certain degree of spoilage, because of the degradation of IMP to Ino. The rapid increase in the K_1 value in the first days of study indicates that the most important changes related to the spoilage of the samples took place during the first days of storage. All samples exceeded the limit of 10^6 cfu/g of mesophilic and 10^3 cfu/g of *Enterobacteriaceae* from the fourth day of study. Thus, it could be concluded that the raw material used in this study had a shelf life less than 4 days. The voltammetric tongue could differentiate between day 0 and day 1 of storage from the other days. These results agree with those obtained in the physical-chemical and microbiological analyses, which showed a clear decrease of freshness from day 0 to day 4. In the models obtained with PLS for TVBN and mesophilic, predicted values successfully fitted to the experimental values, which would confirm the potential of the voltammetric tongue in the evaluation of spoilage of fresh cod.

PALABRAS CLAVE: lengua electrónica, bacalao, análisis físico-químico, análisis microbiológico.

1. INTRODUCCIÓN

El pescado tiene un papel muy importante en la alimentación mundial, constituyendo la base de la alimentación en numerosos países.

El principal problema de la comercialización de este tipo de alimentos es que son altamente perecederos, especialmente el pescado fresco, por lo que es necesario establecer mecanismos rápidos y no destructivos para la determinación de su calidad y vida útil, garantizando así la seguridad del producto. Numerosas investigaciones se han centrado en la búsqueda de métodos para evaluar la frescura, vida útil y calidad en pescado, así como para el control de los procesos de elaboración de productos de la pesca. Los métodos de los que actualmente dispone la industria para este fin se basan en medidas de parámetros químicos, bioquímicos, físico-químicos, microbiológicos y sensoriales. La mayoría de estos métodos son destructivos y requieren una larga puesta a punto, equipos caros y personal altamente cualificado. Por todo ello, sería interesante el desarrollo de técnicas rápidas de control que pudieran aplicarse en cualquier etapa de la comercialización para detectar la calidad y la vida útil del pescado.

La utilización de biosensores en el campo de la tecnología de los alimentos ofrece múltiples posibilidades. Los biosensores presentan ventajas frente a las técnicas de análisis convencionales por su alta especificidad, sencillez y rápida respuesta. Entre los diferentes tipos de biosensores, destacan los sensores electrónicos por su bajo coste, rápida respuesta y la posibilidad de automatización, lo que permite su aplicación en un amplio tipo de muestras (Mello, 2002). Actualmente, los sensores electrónicos, tipo lengua electrónica o equipos de espectroscopía de impedancia, están siendo objeto de estudio para su posible aplicación en el control de calidad y control de procesos en la industria alimentaria, ya que podrían suponer una excelente alternativa a las técnicas clásicas de control.

El planteamiento y desarrollo de la lengua electrónica es muy reciente y el principio en el que se basa es similar a la nariz electrónica (Leake, 2006). Inicialmente esta técnica comenzó a aplicarse sobre alimentos líquidos, como vinos, zumos o aceites vegetales, entre otros (Huang et al., 2007; Moreno i Codinach et al., 2008); y también se ha aplicado sobre extractos líquidos de alimentos sólidos, como pescado (Rodríguez-Mendez et al., 2009). En los últimos años se están llevando a cabo estudios sobre el empleo de lenguas electrónicas aplicadas al análisis y control en productos sólidos como la carne, frutas y verduras (Han et al., 2008; Campos et al., 2010; Labrador et al., 2010). Su aplicación directa en pescado y productos de la pesca ha sido poco estudiada, pero los resultados obtenidos en este campo son prometedores (Barat et al., 2008).

Las lenguas electrónicas se pueden definir como sistemas basados en múltiples sensores de baja selectividad o sensibilidad cruzada que, conjugados con herramientas de reconocimiento de patrones o de análisis multivariante, permiten la clasificación de muestras o la cuantificación de alguno de sus parámetros fisicoquímicos (Gutés et al., 2007). La principal diferencia entre las lenguas electrónicas y otras técnicas de análisis es, por tanto, el uso de sensores que no están diseñados para detectar una especie

en concreto. Así, las funciones de las lenguas electrónicas son la clasificación y la cuantificación, como se ha comentado. De esta forma, se pueden aplicar en el estudio de muestras que presentan diferentes niveles de algún parámetro o parámetros o características que se quieren evaluar (frescura de carne o pescado, parámetros sensoriales, etc.). Las medidas realizadas sobre estas muestras se procesan mediante herramientas de reconocimiento de patrones o de análisis multivariante con el fin de establecer una clasificación de las mismas.

Una lengua electrónica se compone de tres elementos: los sensores, el sistema de medida y el sistema de procesamiento de datos. Los sensores por lo general tienen una sensibilidad cruzada a los distintos compuestos de la muestra y su número depende de la aplicación y de la técnica empleada. La misión del sistema de medida es captar las señales generadas por dichos sensores, digitalizarlas y transmitir las al sistema de procesamiento de datos. Éste recibe los datos de las medidas y, basándose en algoritmos de reconocimiento de patrones o en herramientas de análisis multivariante, clasifica las muestras o cuantifica alguna de sus características como pueden ser parámetros físico-químicos o microbiológicos. Para poder llevar a cabo esa clasificación o cuantificación, previamente debe realizarse un proceso de “aprendizaje” en el que muestras de características conocidas son procesadas para “entrenar” al sistema.

Estos tipos de sensores electrónicos pueden clasificarse en sensores potenciométricos, conductimétricos, impedimétricos, amperométricos, y voltamétricos. En voltametría se aplica una tensión controlada a la interfaz electrodo-disolución del electrodo de trabajo y se mide la corriente que circula por el mismo. Para ello, el sistema se diseña con un potencióstato trabajando en configuración de tres electrodos que son:

- El contraelectrodo o electrodo auxiliar (CE o AE): su misión es únicamente permitir la circulación de la corriente hacia el electrodo de trabajo.
- El electrodo de referencia (RE): debe ser muy estable ante cambios de concentración en la disolución de manera que la tensión en él pueda considerarse constante.
- El electrodo de trabajo (WE): es el electrodo sobre el que se quieren realizar las medidas. El objetivo es poder aplicarle una tensión controlada y medir la corriente que circula por él.

La técnica de lengua voltamétrica consiste en aplicar una serie de pulsos a diversos electrodos metálicos y muestrear la corriente que circula por los mismos. Posteriormente se procesan los datos correspondientes a la evolución temporal de la corriente mediante técnicas de análisis multivariante. La elección de la técnica voltamétrica más adecuada para cada experiencia dependerá del objetivo de la misma; es decir, de la variable del proceso electroquímico que se desea medir.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación de la lengua electrónica en la determinación de la vida útil de bacalao fresco almacenado en refrigeración.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Materia prima

La materia prima empleada en este estudio fue bacalao (*Gadus morhua*) fresco procedente de piscifactoría (CODFARMERS ASA, Oslo, Noruega), con un calibre medio de 2 kg. El pescado fue adquirido en un supermercado de Valencia donde se descabezó, evisceró y se dividió en dos filetes. El trasladado al laboratorio se llevó a cabo en refrigeración.

El estudio completo se realizó con 3 lotes de pescado. Cada lote fue adquirido a intervalos de 1 mes.

2.2. Preparación de las muestras

El trabajo se efectuó con 3 piezas de bacalao. De cada filete de bacalao se obtenían 3 muestras, obteniéndose de cada pescado 6 muestras en total (Figura 1). Así, cada lote de estudio estaba compuesto por 18 muestras.



Figura 1: Obtención de muestras a partir de dos filetes de bacalao.

Las porciones obtenidas fueron pesadas, envueltas en film plástico y codificadas en función de la pieza de procedencia y la zona.

2.3. Estudio de vida útil

Las muestras fueron almacenadas a 4 °C y analizadas a los 0, 1, 4, 5, 6 y 7 días de almacenamiento. Se llevaron a cabo análisis físico-químicos (humedad, pH, pérdida por goteo, nitrógeno básico volátil total, metabolitos derivados de la degradación del ATP y valor K_1), microbiológicos (microorganismos mesófilos y enterobacterias) y se hicieron medidas con el equipo de lengua voltamétrica.

2.4. Determinaciones analíticas

Los análisis físico-químicos y microbiológicos se llevaron a cabo por triplicado (3 piezas de pescado/análisis).

2.4.1. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

La determinación de humedad fue llevada a cabo según el método de la AOAC 950.46 (1997), mediante secado en estufa a 105 °C.

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

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 exudado/100 g de pescado).

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).

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. Además se realizó la confirmación de los mismos mediante la adición de patrón a las muestras (Johnson y Stevenson, 1978). 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):

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

donde las concentraciones de los 3 analitos fueron expresadas en $\mu\text{mol/g}$ de muestra

2.4.2. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

Para llevar a cabo los análisis de mesófilos y enterobacterias, se prepararon diluciones decimales a partir de las muestras, según el método descrito en la Norma UNE EN-ISO 6887-3 (AENOR, 2004). De cada dilución se sembraban 2 placas.

El recuento de aerobios mesófilos se llevó a cabo mediante siembra en profundidad en Agar Plate Count tras 72 h de incubación a 30 ± 1 °C (ISO 4833:2003). El recuento de enterobacterias se realizó mediante siembra en

doble capa en Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa tras 24 h de incubación a 37 ± 1 °C (Pascual y Calderón, 2000).

2.5. Medidas con el equipo de lengua electrónica

El equipo de lengua electrónica empleado está basado en voltametría de pulsos. Dicho equipo ha sido diseñado por el Grupo de Microelectrónica Híbrida del Instituto de Química Molecular Aplicada de la UPV. Se trabajó con dos lenguas electrónicas insertadas en un mismo equipo, cada una de ellas con cuatro elementos metálicos diferentes (Figura 2). La primera de ellas estaba compuesta por cuatro metales nobles: Iridio, Rodio, Platino y Oro; y la segunda de ellas con cuatro metales no nobles: Plata, Cobalto, Cobre y Níquel. El tratamiento de los datos se hizo en conjunto, es decir, se tomaron todos los datos obtenidos por ambas lenguas, sin diferenciar los que procedían de metales nobles de los que procedían de metales no nobles.

El primer paso para llevar a cabo las medidas fue confeccionar o diseñar un patrón de pulsos. El patrón de señales de tensión aplicado al electrodo de trabajo es función del alimento analizado y del parámetro buscado. En este caso, fue diseñado un patrón de pulsos con valores crecientes y decrecientes que se aplicó de forma consecutiva a cada uno de los electrodos.

El siguiente paso fue escoger la escala de corriente adecuada. Ésta debe situarse dentro del rango de las medidas que se van a realizar. La escala de corriente, por un lado, ha de ser lo suficientemente grande para que ninguna de las señales recogidas supere los límites de la escala evitando la saturación y, por otro lado, hay que evitar que dicha escala sea demasiado grande provocando ruido en el sistema que empeora la medida. Para ajustar el nivel óptimo, se realizaron algunos ensayos previos.

Una vez establecidos el patrón de pulsos y la escala de corriente se realizaron las medidas a temperatura ambiente. Para ello, deben tenerse en cuenta algunas precauciones en dos puntos clave del análisis, que son el contacto entre el electrodo y el alimento, y la limpieza de los electrodos.

En primer lugar, el contacto entre el electrodo y el alimento debe ser adecuado ya que la señal de corriente obtenida está directamente relacionada con la superficie de contacto, pudiendo conllevar medidas erróneas si el contacto no es adecuado. De ahí la complejidad de aplicar esta técnica en alimentos sólidos.

En segundo lugar, la limpieza de los electrodos debe asegurar la eliminación de la capa residual que se produce por reacciones de oxidación-reducción, corrosión, etc. Al estar la señal directamente relacionada con la superficie de contacto, la presencia de la capa residual variaría la señal. Debe asegurarse una limpieza correcta pero procurando no alterar la superficie del electrodo, por lo que se realiza en primer lugar un lijado, que produce irregularidades que incrementarán la superficie de contacto, y tras esto, un pulido para homogeneizar la superficie.

Se tomaban tres medidas de cada muestra o se incluía alguna medida adicional hasta obtener tres medidas con una baja dispersión.



Figura 2: Electrodo del equipo voltamétrico (electrodo de referencia y lenguas electrónicas).

2.6. Análisis estadístico

Para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en refrigeración sobre la calidad de bacalao, se realizó un ANOVA simple para cada uno de los parámetros físico-químicos y microbiológicos analizados. El tiempo de almacenamiento fue el factor y las variables fueron cada uno de los parámetros estudiados. Se empleó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

Por otro lado, con objeto de evaluar la capacidad de la lengua voltamétrica para determinar la vida útil del pescado, se llevaron a cabo diferentes análisis multivariantes. Así, se realizaron Análisis de Componentes Principales (PCA) y Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). El PLS maximiza la correlación entre variables independientes y variables dependientes (Martens & Martens, 2001). Los modelos de predicción PLS fueron creados usando un set de datos experimentales (set de calibración). El modelo fue validado con un nuevo set de datos experimentales (set de validación). Todos los análisis multivariantes se llevaron a cabo utilizando el programa MATLAB® PLS Tool-box (Eigenvector Research, Inc.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinaciones físico-químicas y microbiológicas

En la Figura 3 se muestra la evolución de la humedad, pH y pérdida por goteo durante el almacenamiento. Los valores de humedad y pH son similares a los encontrados en otros estudios de bacalao (Herland et al., 2010). La humedad se mantuvo prácticamente constante a lo largo del periodo de ensayo, no observándose diferencias significativas entre los diferentes días de almacenamiento (datos del ANOVA no mostrados). El pH tampoco presentó diferencias significativas durante el almacenamiento en refrigeración lo que coincide con los resultados obtenidos en otros estudios,

donde los valores de pH del músculo no presentan apenas variaciones durante el almacenamiento (Arkoudelos et al., 2007; Li et al. 2011). En relación a la pérdida por goteo se observó un ligero aumento del porcentaje de exudado a lo largo del tiempo de estudio. Esto podría deberse a la degradación proteica que se produce durante el almacenamiento del pescado, que da lugar a un ablandamiento del tejido y a una pérdida de la capacidad de retención de agua. Estos cambios se traducen en una mayor liberación de líquido conforme avanza el tiempo de almacenamiento.

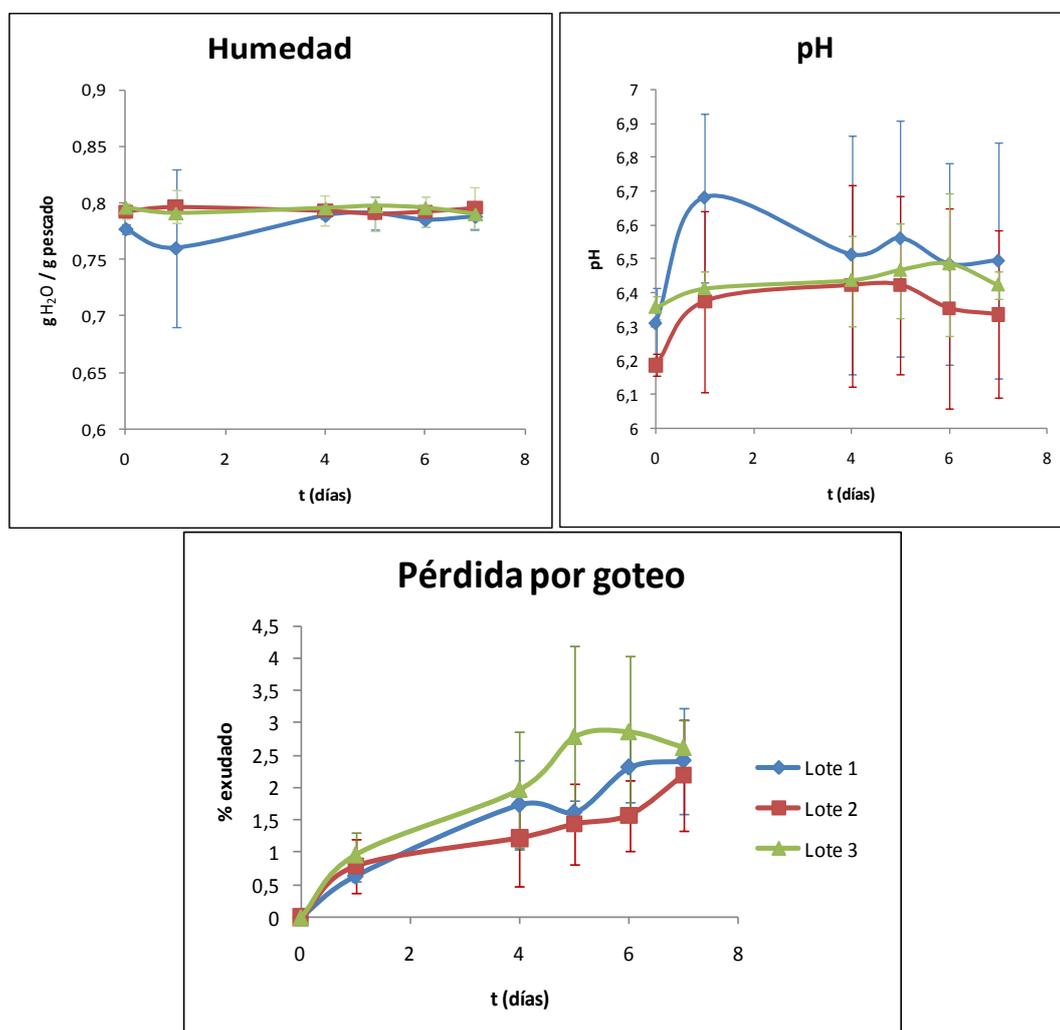


Figura 3: Evolución de la humedad, pH y pérdida por goteo durante el almacenamiento en refrigeración (Las barras de error representan la desviación estándar, $n=3$).

En la Figura 4 se muestra la evolución de nitrógeno básico volátil total (NBVT). Los valores iniciales en las muestras de bacalao de los lotes 2 y 3 coinciden con los valores obtenidos en otros estudios (Olafsdottir et al., 2006), mientras que las muestras del lote 1 presentaron valores superiores al resto; estas diferencias se mantuvieron durante el resto del almacenamiento. Este resultado podría deberse a que los valores de NBVT

dependen de diferentes factores, como las condiciones de almacenamiento durante el transporte y la comercialización, prácticas higiénicas durante el almacenamiento y manipulación, etc. Este parámetro presentó un incremento progresivo a lo largo del período de almacenamiento evidenciándose así el deterioro sufrido durante los días de estudio. Aunque varios autores han relacionado el incremento del NBVT con el deterioro microbiano (Fernández-Segovia *et al.*, 2007; Kykkidou *et al.*, 2009; Özogul *et al.*, 2009), hay una gran variabilidad en los límites de aceptabilidad de este parámetro en pescado fresco. En este sentido se han establecido límites de 25, 30 y 35 mg/100 g (Dalgaard, 2000). La Unión Europea ha establecido el límite de aceptación de 35 mg NBVT/100 g de pescado (CEE, 2005a), para las especies de pescado que pertenecen a la familia *Gadidae*, como el bacalao, valor que aparece representado en la Figura 4. Entre el cuarto y el quinto día de almacenamiento las muestras superaron los 35 mg NBVT/100 g, por lo que el pescado no sería apto para su consumo a partir de ese momento. Estos resultados habría que confirmarlos con los resultados microbiológicos que se detallan más adelante.

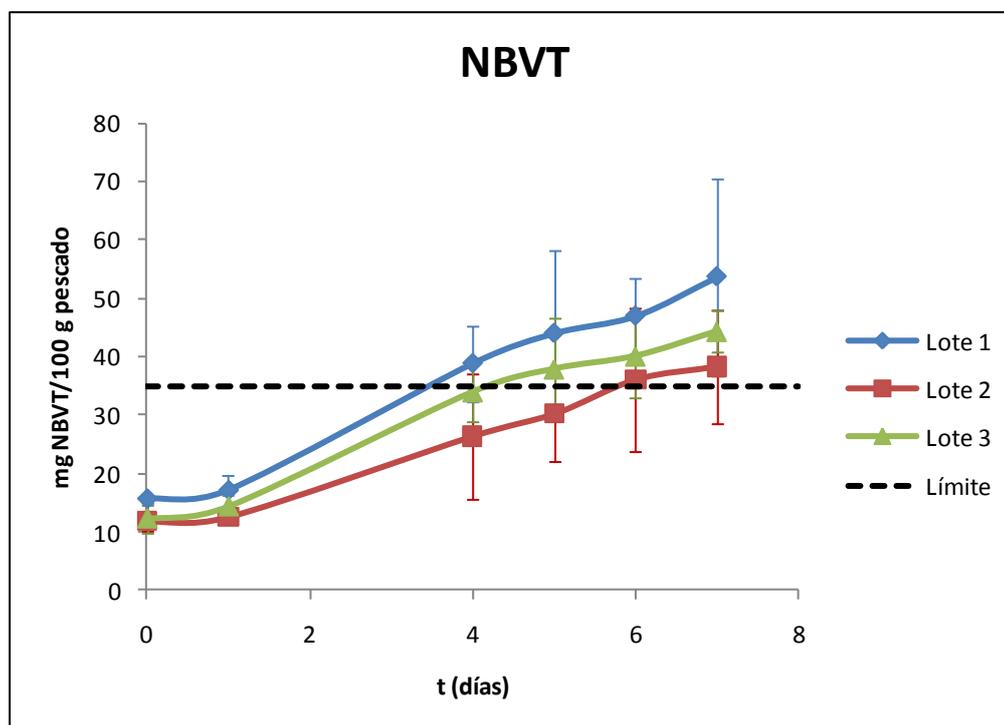


Figura 4: Evolución del NVBT durante el almacenamiento en refrigeración (Las barras de error representan la desviación estándar, n=3).

En la Figura 5 se muestra la evolución de inosín-5'-monofostato (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx). Estos analitos evidencian la degradación enzimática y microbiológica del ATP del pescado durante su almacenamiento. El IMP se produce como consecuencia de la degradación del ATP a ADP, éste a AMP, y por último, el AMP en IMP. Esta fase previa se produce rápidamente tras el sacrificio siendo muy difíciles de cuantificar, aunque el pescado esté muy fresco, por lo que se toma como metabolito de

partida el IMP. Los valores iniciales de IMP no fueron muy altos, con respecto a otros estudios en pescado fresco (Fuentes et al., 2010). Esto pone de manifiesto que al inicio del estudio el pescado ya presentaba una cierta degradación, por la transformación de IMP en Ino. Se observa que la concentración de IMP disminuyó rápidamente hasta niveles mínimos entre el día 0 y 1. Como consecuencia de ello, la concentración de inosina aumentó entre el día 0 y 1, y posteriormente disminuyó drásticamente. La concentración de hipoxantina se vio incrementada a lo largo del tiempo de estudio, especialmente a partir del día 1, debido a la degradación de IMP y de Ino. Estos resultados muestran que, en primer lugar, se produjo la degradación de IMP a inosina (del día 0 al día 1), siendo la Ino posteriormente degradada a hipoxantina.

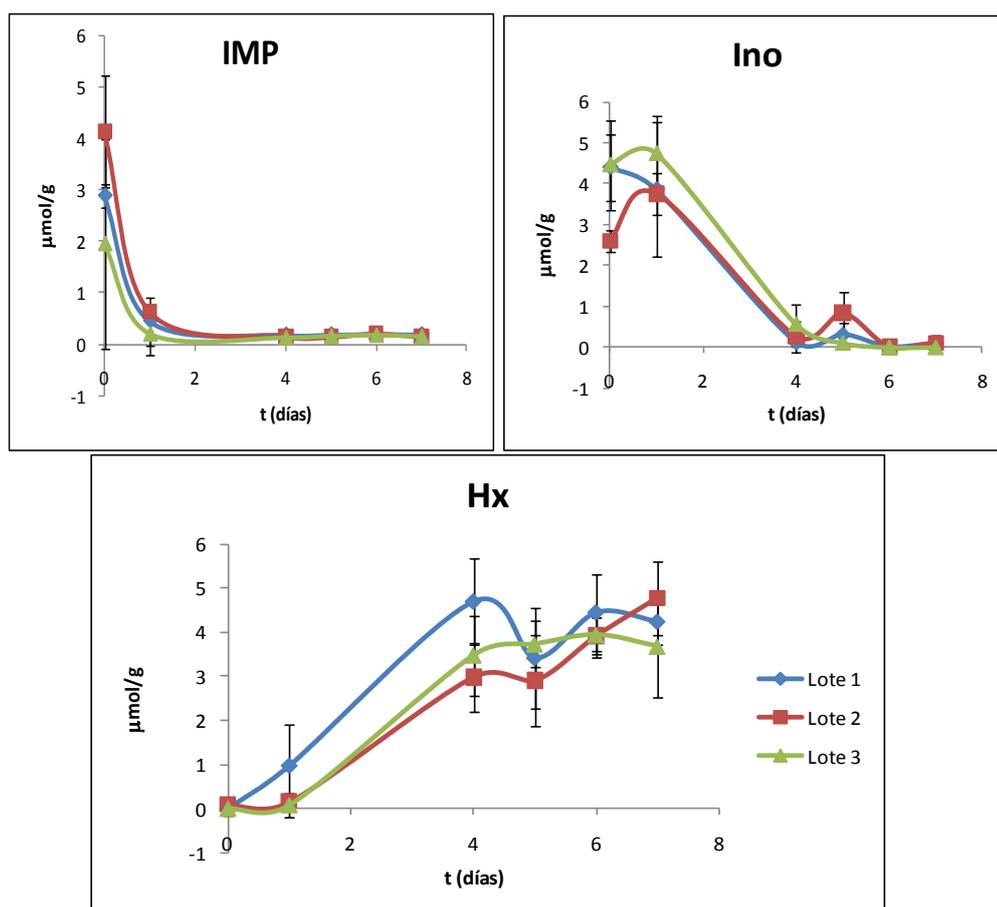


Figura 5: Evolución de IMP, inosina e hipoxantina durante el almacenamiento en refrigeración (Las barras de error representan la desviación estándar, n=3).

El valor K_1 , 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). En la Figura 6 se observa un incremento al principio del almacenamiento, alcanzándose valores muy altos a día 4, valores que se mantuvieron prácticamente constantes. Esto se debe a que los valores del

IMP llegaron a valores muy bajos tras los primeros días de almacenamiento. Estos resultados indican que los cambios más importantes relacionados con el deterioro de las muestras tuvieron lugar durante los primeros días de almacenamiento.

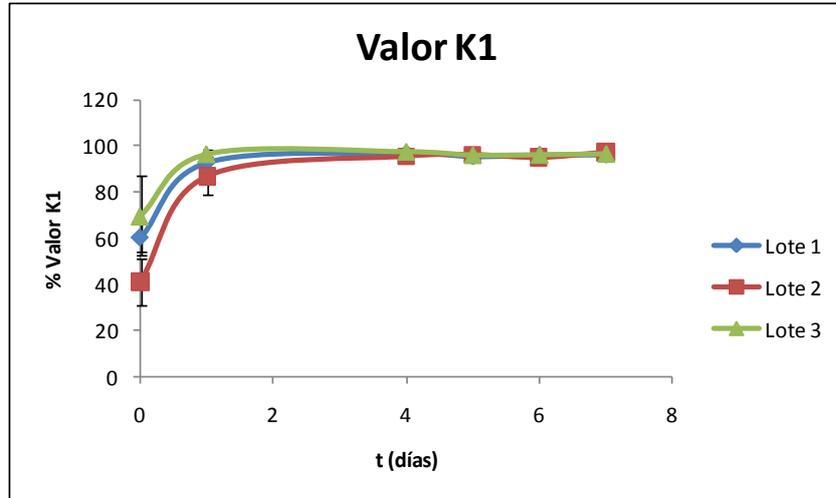


Figura 6: Evolución del valor K_1 durante el almacenamiento en refrigeración (Las barras de error representan la desviación estándar, $n=3$).

En la Figura 7 se muestra la evolución de los dos microorganismos estudiados.

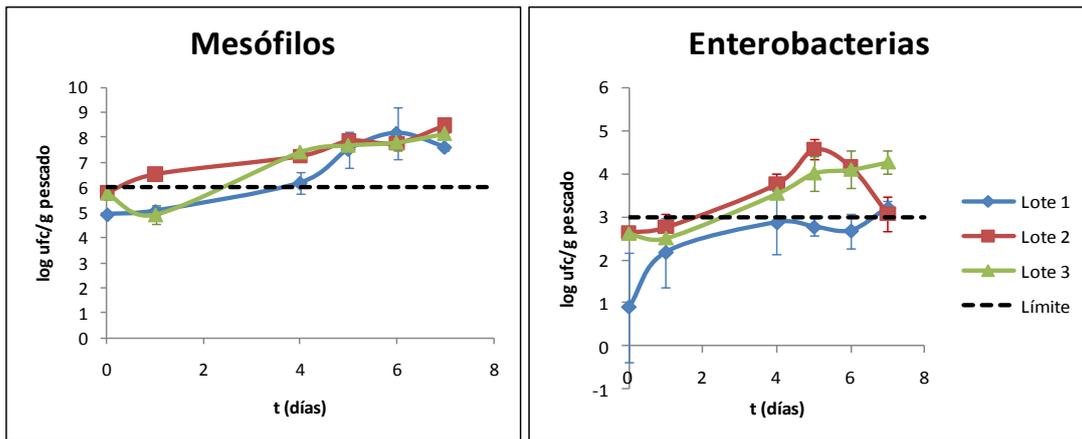


Figura 7: Evolución del recuento de mesófilos y enterobacterias durante el almacenamiento en refrigeración (Las barras de error representan la desviación estándar, $n=3$).

Los recuentos iniciales, tanto de microorganismos mesófilos como de enterobacterias, fueron elevados, lo que demuestra que el pescado de partida ya presentaba un ligero grado de deterioro, tal y como se ha comentado anteriormente. Durante el almacenamiento se observó un ligero aumento en el crecimiento de ambos microorganismos. Todas las muestras superaron el límite de mesófilos establecido de 6 ciclos logarítmicos por la

legislación (CEE, 2005b) a partir del cuarto día de estudio. En cuanto al nivel de enterobacterias, el límite de 3 ciclos logarítmicos, establecido en otros estudios (Fuentes et al., 2011), fue superado en la misma franja de tiempo que en el caso anterior. Estos resultados coinciden con los observados para el NBVT. Así, se podría concluir que la materia prima empleada en este estudio presentaba una vida útil inferior a 4 días.

3.2. Correlación entre la lengua electrónica y los análisis físico-químicos y microbiológicos.

En la Figura 8.a, 8.b y 8.c se muestran los resultados del análisis de componentes principales (PCA) realizado con los datos obtenidos con la lengua electrónica para el lote 1, 2 y 3, respectivamente, según el tiempo de almacenamiento. Los dos primeros componentes principales explican el 49%, 42% y el 54.31% de la variación total. Estos bajos porcentajes son debidos a que las medidas obtenidas con la lengua electrónica presentan una dispersión importante, ya que la señal depende de la superficie de contacto y al tratarse de un alimento sólido de superficie heterogénea era muy difícil conseguir un buen contacto en todas las medidas.

Se puede observar que en todos los lotes hay 3 agrupaciones, por una parte se agrupan las muestras analizadas a día 0, un segundo grupo lo forman las muestras analizadas a día 1 y en el tercer grupo aparecen solapadas las muestras almacenadas el resto de tiempos.

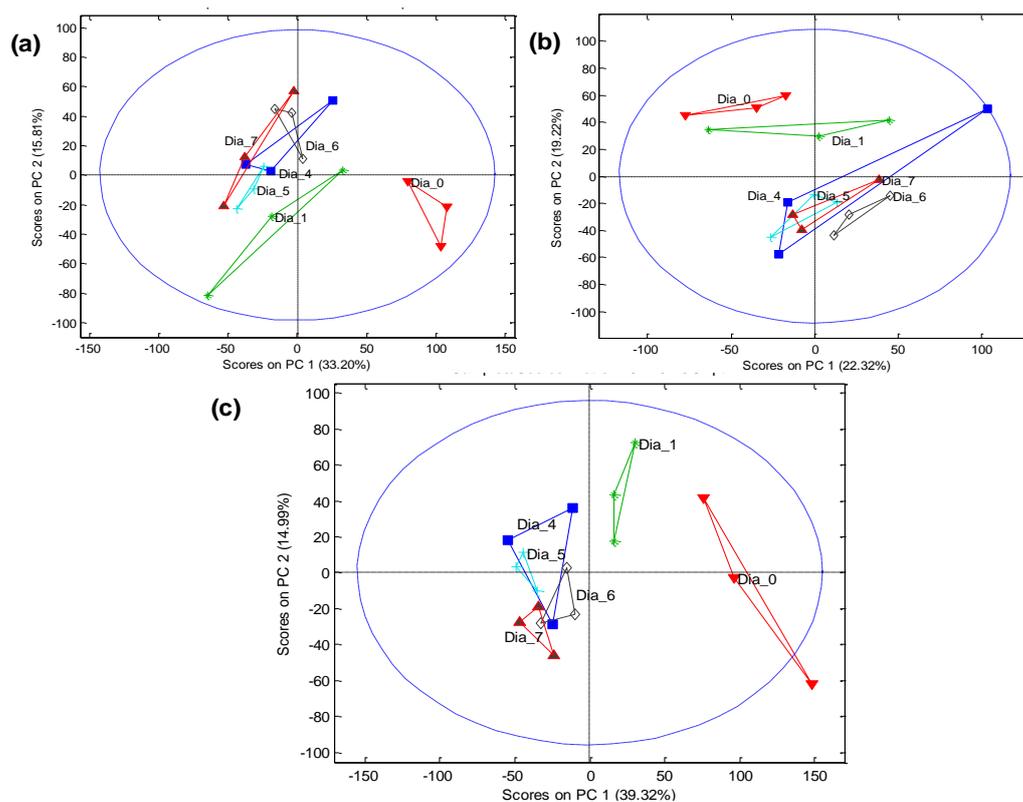


Figura 8: Análisis de componentes principales (PCA) de las medidas de lengua electrónica. (a) Lote 1, (b) Lote 2 y (c) Lote 3.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en los análisis físico-químicos y microbiológicos, en los que se evidenció una clara pérdida de frescura desde el día 0 al día 4. A partir de este día de análisis se consideró que el pescado no era apto para su consumo, debido al alto nivel de deterioro que presentaban las muestras almacenadas a tiempos iguales o mayores a 4 días. Para confirmar esta correlación, con los datos obtenidos en los análisis físico-químicos y microbiológicos se realizó un PCA por lotes, según el tiempo de almacenamiento (Figura 9), al igual que se había hecho con las medidas de la lengua. Para realizar este análisis se excluyeron los datos de humedad y pH, ya que el ANOVA simple había mostrado que la variación de estos dos parámetros no era significativa a lo largo del tiempo de almacenamiento. Los dos primeros componentes principales explican el 86%, 82% y el 93% de la variación total. En general se observan las mismas agrupaciones que en el caso de la lengua, por un lado están las muestras correspondientes a día 0, por otro las almacenadas 1 día, y el resto de días de almacenamiento aparecen solapados, con excepción del lote 1, en el que el día 4 aparece más cercano al día 1 que al resto de tiempos (Figura 9.a).

Estos resultados muestran que el equipo de lengua electrónica sería capaz de discriminar entre bacalao fresco apto para su consumo y bacalao deteriorado.

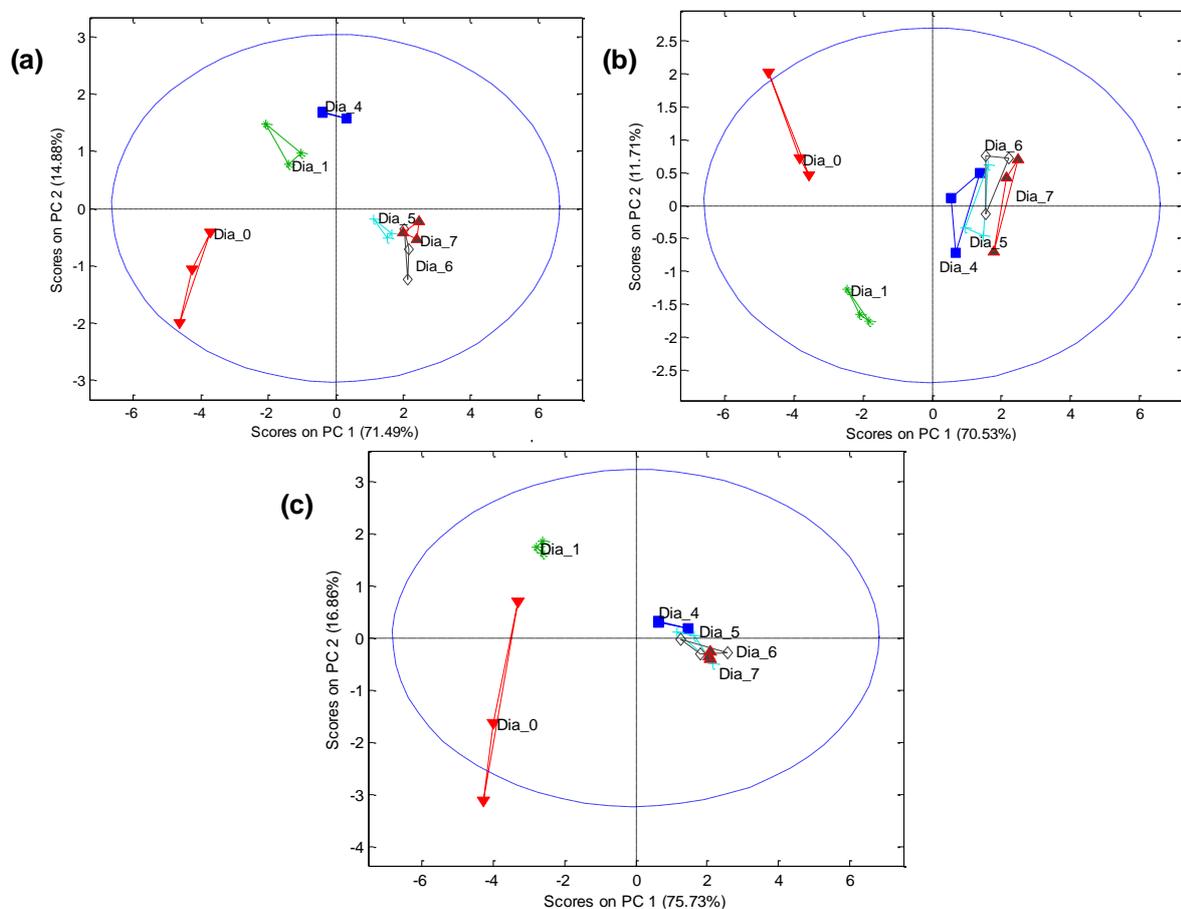


Figura 9: Análisis de componentes principales (PCA) de los parámetros físico-químicos y microbiológicos. (a) Lote 1, (b) Lote 2 y (c) Lote 3.

Debido a que ambos análisis estadísticos, PCA realizado a partir de las medidas realizadas con las lenguas electrónicas y PCA realizado a partir de los parámetros físico-químicos y microbiológicos, mostraron una agrupación similar de las diferentes muestras, se consideró interesante la utilización de herramientas estadísticas para predecir los valores de los parámetros físico-químicos y microbiológicos estudiados a partir de las medidas generadas por las lenguas voltamétricas. Con este objetivo, se establecieron modelos estadísticos (PLS) para todos los parámetros evaluados con la excepción de humedad y pH, cuya evolución durante el tiempo de almacenamiento no había sido significativa. Para la elaboración de los modelos estadísticos PLS, se emplearon el 66% de las muestras en la fase de calibración mientras el 33% restante de las muestras analizadas se empleó para la validación de los modelos previamente obtenidos, tal y como se ha comentado anteriormente.

Los modelos más robustos se obtuvieron para el NBVT y para el recuento de microorganismos mesófilos. En la tabla 1 se muestran los estadísticos obtenidos en todos los análisis.

Tabla 1: Estadísticos obtenidos en los análisis PLS de los parámetros físico-químicos y microbiológicos.

	R ²	RMSEP	Pendiente	Ordenada en el origen
Exudado	0.563	0.749	0.632	0.690
NBVT	0.795	5.594	1.030	0.293
IMP	0.627	1.232	0.299	0.528
INO	0.597	1.306	0.720	0.501
Hx	0.586	1.256	0.6391	0.860
Valor K ₁	0.725	13.212	0.377	54.087
Mesófilos	0.782	0.547	0.888	1.009
Enterobacterias	0.638	0.774	0.287	2.115

En la Figura 10.a y 10.b se representan los valores de NBVT y de mesófilos, respectivamente, obtenidos experimentalmente (línea roja) frente a los predichos por el modelo estadístico (línea verde).

En ambos casos, los valores predichos se ajustan satisfactoriamente a los valores reales (RMSEP con valores de 5.594 para NBVT y 0.547 para mesófilos). Teniendo en cuenta que el NBVT y el recuento de mesófilos son dos de los parámetros más importantes para establecer la vida útil del pescado, los resultados obtenidos con el PLS volverían a confirmar el potencial de la lengua voltamétrica en la evaluación del deterioro del bacalao fresco.

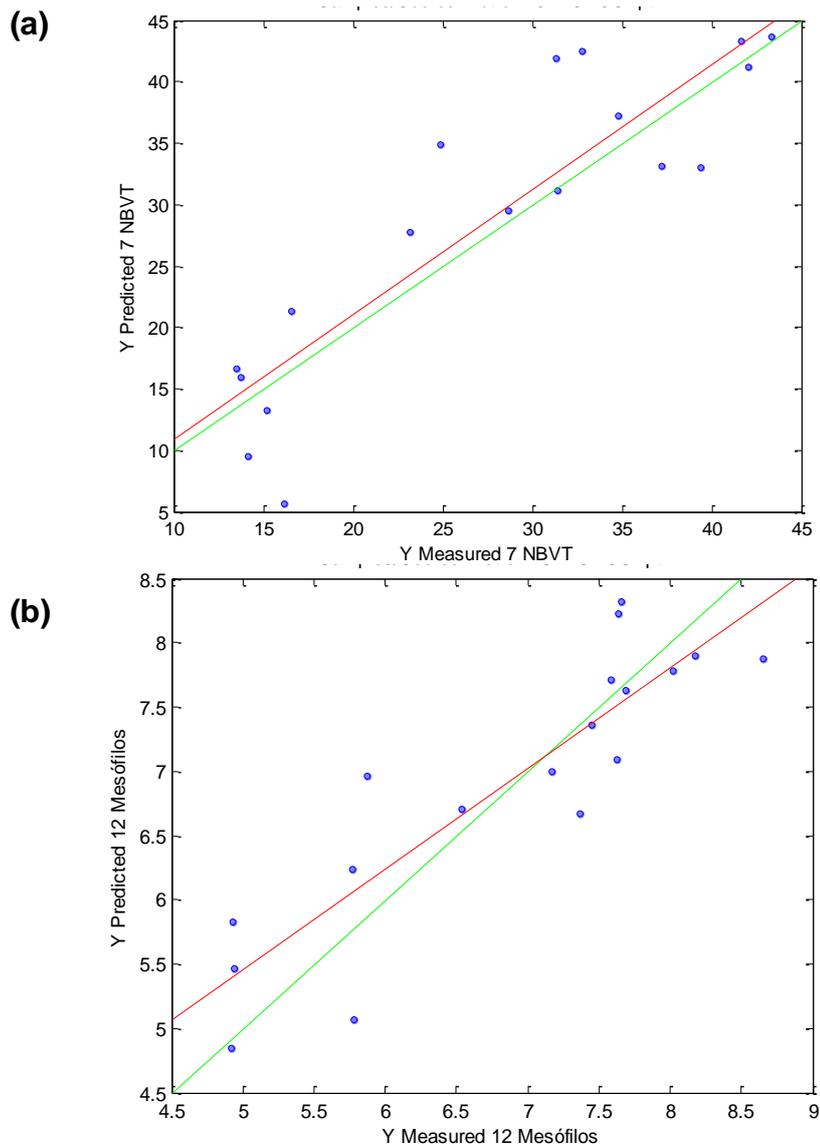


Figura 10: Valores predichos por el modelo obtenido con la lengua electrónica frente a datos experimentales de NBVT (a) y mesófilos (b).

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de los análisis físico-químicos y microbiológicos mostraron el deterioro del bacalao durante su almacenamiento en refrigeración. El bacalao fresco superó los límites de aceptación de NBVT establecidos por la legislación entre el día 4 y 5 de almacenamiento. De igual forma, la evolución de IMP, Ino, Hx y valor K_1 evidenciaron una importante pérdida de frescura en los primeros días de almacenamiento. La evolución de la calidad microbiológica nuevamente mostró que se alcanzaron valores indicativos de deterioro en la misma franja temporal, por lo que el pescado ya no sería apto para su consumo, a partir del día 4 de almacenamiento en refrigeración.

El equipo de lengua electrónica fue capaz de discriminar entre el pescado fresco (días 0 y 1) y el pescado deteriorado (a partir del día 4 de estudio), corroborando la degradación detectada en el estudio físico-químico y microbiológico. Los modelos estadísticos obtenidos a partir de las medidas de las lenguas electrónicas permitieron predecir satisfactoriamente algunos de los parámetros físico-químicos y microbiológicos, especialmente el contenido en NBVT y aerobios mesófilos, considerados como dos de los mejores parámetros indicadores del deterioro en pescado. La buena correlación de los valores obtenidos mediante las lenguas electrónicas con estos parámetros pone de manifiesto que esta técnica es una herramienta útil para la determinación de la vida útil de bacalao fresco.

Este trabajo constituye un gran avance en el desarrollo de métodos rápidos basados en lenguas electrónicas para la evaluación de frescura en pescado.

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 Universitat Politècnica de València, a la que los autores quieren expresar su agradecimiento. Así mismo, A. Fuentes quiere agradecer la ayuda del Campus de Excelencia Internacional de la Universitat Politècnica de València.

Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional, a mis directoras por todo lo aprendido, a Rafa y Miguel por su gran ayuda, y a mis compañeros de laboratorio por hacer el trabajo más fácil.

6. REFERENCIAS

- A.O.A.C., Association of Official Analytical Chemists (1997). Official Methods of Analysis, 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA.
- Arkoudelosa, J.; Stamatidis, N.; Samarasa, F. (2007). Quality attributes of farmed eel (*Anguilla anguilla*) stored under air, vacuum and modified atmosphere packaging at 0°C. *Food Microbiology*, **24**, 728–735.
- Barat, J.M.; Gil, L.; García-Breijo, E.; Aristoy, M.C.; Toldrá, F.; Martínez-Manez, R.; Soto, J. (2008). Freshness monitoring of sea bream (*Sparus aurata*) with a potentiometric sensor. *Food Chemistry*, **108(2)**, 681-688.
- Campos, I.; Masot, R.; Alcañiz, M.; Gil, L.; Soto, J.; Vivancos, J. L.; García-Breijo, E.; Labrador, R.H.; Barat, J.M.; Martínez-Manez, R. (2010). Accurate concentration determination of anions nitrate, nitrite and chloride in minced meat using a voltammetric electronic tongue. *Sensors and Actuators*, **B 149**, 71-78.
- 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.
- 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.
- Fuentes, A.; Fernández-Segovia, I.; Tribuzi, G.; Barat, J. M. (2010). Estudio de la efectividad de agua electrolizada ácida en la vida útil de lubina fresca. *Alimentaria*, **419**, 92-100.
- 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.
- Gutés, A.; Céspedes, F.; Del Valle, M. (2007). Electronic tongues in flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, **600**, 90-96.
- Han, J.; Huang, L.; Gu, Z.; Tian, S., Deng, S. (2008). Evaluation of meat quality and freshness based on the electronic tongue. *Journal of Chinese Institute of Food Science & Technology*, **8(3)**, 125-132.
- Herland, H.; Esaiassen, M.; Cooper, M.; Olsen, R. L. (2010). Quality of farmed Atlantic cod: effects of season and storage. *Aquaculture Research*, **4 (8)**, 1203–1210
- Huang, X.Y.; Zhang H.Y.; Zhao, J.W. (2007). Research and application of electronic tongue technology in food industry. *Food Science & Technology*, **7**, 20-24.
- ISO (2003). ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30 degrees C.
- Johnson, E.; Stevenson, R. (Eds.). (1978). Quantitative analysis in basic liquid chromatography (pp. 223). Hansen Way, Palo Alto, CA.; Varian Associates.
- 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.
- Labrador, R. H.; Masot, R.; Alcañiz, M.; Baigts, D.; Soto, J.; Martínez-Mañez, R.; García-Breijo, E.; Gil, L.; Barat, J. M. (2010). Prediction of NaCl, nitrate and nitrite contents in minced meat by using a voltammetric electronic tongue and an impedimetric sensor. *Food Chemistry*, **122**, 864-870.
- Leake, L.L. (2006). Electronic noses and tongues. *Food Technology*, **60(6)**, 96-102.
- Li, X.; Li, J.; Zhu, J.; Wang, Y.; Fu, L.; Xuan, W. (2011). Postmortem changes in yellow grouper (*Epinephelus awoara*) fillets stored under vacuum packaging at 0 °C. *Food Chemistry* **126**, 896–901.
- Malle, P. y Tao, S.H 1987. Rapid Quantitative Determination of Trimethylamine using Steam distillation. *Journal of Food Protection*, **50(9)**, 756-769.
- Martens, H., & Martens, M. (2001). *Multivariate Analysis of Quality. An Introduction*. John Wiley & Sons, Inc.
- Mello, L. D.; Kubota, L. T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food chemistry*, **77**, 237–256.
- Moreno i Codinachs, L.; Kloock, J. P.; Schoening, M. J.; Baldi, A.; Ipatov, A.; Bratov, A.; Jimenez-Jorquera, C. (2008). Electronic integrated multisensor tongue applied to grape juice and wine analysis. *Analyst*, **133(10)**, 1440-1448.
- Norma UNE EN-ISO 6887-3 (AENOR, 2004). Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 3: Reglas específicas para la preparación de pescados y productos de la pesca
- Olafsdottir, G.; Lauzon, H. L.; Martinsdóttir, E.; Oehlenschläger, J.; Kristbergsson, K. (2006). Evaluation of shelf life of superchilled cod (*Gadus morhua*) fillets and the influence of temperature fluctuations during storage on microbial and chemical quality indicators. *Journal of food science*, **71 (2)**, 97-109.
- 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; Calderón V. (2000). *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. Díaz de Santos, Madrid, España.

Rodríguez-Méndez, M. L.; Gay, M.; Apetrei, C.; De Saja, J.A. (2009). Biogenic amines and fish freshness assessment using a multisensor system based on voltammetric electrodes. Comparison between CPE and screen-printed electrodes. *Electrochimica Acta*, **54**, 7033-7041.