



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

EVALUACIÓN DE VIDA ÚTIL DE DORADA EMPLEANDO SENSORES VOLTAMÉTRICOS Y COLORIMÉTRICOS

MÁSTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

ALUMNA: Susana Ribes Llop

DIRECTORA: Isabel Fernández Segovia

CO-DIRECTORA: Ana Fuentes López

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

EVALUACIÓN DE VIDA ÚTIL DE DORADA EMPLEANDO SENSORES VOLTAMÉTRICOS Y COLORIMÉTRICOS

Ribes Llop, S.; Fuentes López, A.; Fernández Segovia, I.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar dos métodos de análisis, uno basado en la aplicación de lengua voltamétrica y otro en sensores cromogénicos, en la determinación de la vida útil de dorada fresca almacenada en refrigeración. Para ello, se llevaron a cabo periódicamente análisis físico-químicos, microbiológicos y medidas con las lenguas electrónicas sobre las muestras de pescado. De forma paralela se tomaron fotografías de los reactivos colorimétricos. El pH, la pérdida por goteo, los metabolitos de descomposición del ATP, el valor K_1 y los recuentos microbianos, mostraron valores típicos del pescado fresco desde el día 0 al día 4 de análisis; sin embargo, a día 7 de almacenamiento los niveles de estos parámetros correspondían a pescado deteriorado. La lengua voltamétrica no fue una herramienta útil en la determinación del grado de frescura de dorada almacenada en refrigeración, ya que no consiguió discriminar entre los distintos tiempos de almacenamiento. Sin embargo, el PCA llevado a cabo con los datos obtenidos en las medidas de color clasificó las muestras en distintos grupos; los días 0 y 2 aparecían en un único grupo, estando los datos del día 4 próximos a dicho grupo. Las muestras de los otros tres días (7, 9 y 11) se separaban en tres grupos distintos, siendo la distancia mayor a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los análisis físico-químicos y microbiológicos, que mostraron una clara pérdida de la frescura a partir del día 4 de almacenamiento. En los análisis PLS llevados a cabo, se obtuvieron modelos de predicción robustos para mesófilos y enterobacterias, lo cual confirma el potencial de la matriz colorimétrica para evaluar el deterioro de dorada.

RESUM

L'objectiu d'aquest treball va ser avaluar dos mètodes de treball, u d'ells basat en l'aplicació de la llengua voltamètrica i, l'altre en sensors cromogènics, en la determinació de la vida útil de daurada fresca emmagatzemada en refrigeració. Per a això, es van dur a terme periòdicament anàlisis físicoquímics, microbiològics i mesures amb la llengua electrònica sobre les mostres de peix. De forma paral·lela es van prendre fotografies dels reactius colorimètrics. El pH, la pèrdua per goteig, metabolits de descomposició de l'ATP, el valor K_1 , i els recomptes microbians, van mostrar valors típics del peix fresc des del dia 0 al dia 4 d'anàlisis; no obstant això, a dia 7 d'emmagatzemament els nivells d'aquests paràmetres corresponien a peix deteriorat. La llengua voltamètrica no va ser una ferramenta útil en la determinació del grau de frescor de la daurada

emmagatzemada en refrigeració, ja que no va ser capaç de discriminar entre els distints temps d'emmagatzemament. No obstant això, el PCA dut a terme amb les dades que es van obtenir de les mesures de color classificà les mostres en diferents grups; els dies 0 i 2 apareixen en un únic grup, estant les dades del dia 4 pròximes a aquest. Les mostres dels altres tres dies (7, 9 i 11) es separen en tres grups diferents, sent major la distància a mesura que augmenta el temps d'emmagatzemament. Aquests resultats coincideixen amb els que es van obtenir en els anàlisis fisicoquímics i microbiològics, que van mostrar una clara pèrdua de la frescor a partir del dia 4 d'emmagatzemament. En els anàlisis PLS duts a terme, es van obtenir models de predicció robusts per a mesòfils i enterobacteries, la qual cosa confirma el potencial de la matriu colorimètrica per avaluar el deteriori de daurada .

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate two analyses methods, one of them based on the use of voltammetric tongue and the other one on chromogenic sensors, on the self-life assessment of sea bream in cold storage. For this purpose, physico-chemical and microbial analyses, as well as measurements with the voltammetric tongue were carried out on fish samples periodically. In parallel, photographs of the dyes were taken. The pH, drip loss, ATP-related compounds, K_1 -value and microbial counts, showed values typical of fresh fish, from day 0 to 4; however, the levels of these parameters at day 7 of storage corresponded to spoiled fish. The voltammetric tongue was not a useful tool to evaluate the freshness degree of sea bream in cold storage, since it could not distinguish between the different storage times. However, the PCA performed with data obtained with the colour measurements classified samples in different groups; days 0 and 2 were included in one unique group, data from day 4 being close to this group. Samples of the other three days (7, 9 and 11) were separated into three different groups, the distance being increased with increasing storage time. These results agree with those obtained in the physico-chemical and microbiological analyses, which showed a clear loss of freshness from day 4 of storage. In the PLS analyses performed, robust predictive models were obtained for mesophilic and *Enterobacteriaceae*, which confirms the potential of the colorimetric array in the evaluation of sea bream spoilage.

PALABRAS CLAVE: sensores electrónicos, sensores cromogénicos, métodos de análisis, dorada, vida útil.

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de pescado a nivel mundial ha ido aumentando en los últimos años. El pescado y sus productos derivados son altamente apreciados por el consumidor, puesto que constituyen una importante fuente de proteínas de alto valor biológico y, en algunos casos, de grasas y vitaminas liposolubles (Belitz y Grosch, 1997). Asimismo, los productos pesqueros son alimentos muy perecederos. Tras la muerte del pez, tiene lugar la pérdida progresiva de su frescura y calidad. Esto se produce a través de una serie de reacciones post-mortem entre las que destacan las reacciones autodegradativas de tipo enzimático y los cambios microbiológicos (Sikorski, 1990). Estos procesos conducen a la aparición de olores, colores y sabores no deseados, así como a la acumulación de compuestos orgánicos y microorganismos que pueden representar un riesgo higiénico o toxicológico.

En la bibliografía se describen una gran variedad de métodos para la determinación de la calidad de pescado. Entre ellos, cabe destacar los métodos físicos, químicos, microbiológicos y sensoriales (Shouchun et al., 2010). Sin embargo, todos ellos son destructivos, muchos de ellos requieren una larga puesta a punto, equipos caros y personal altamente cualificado. Por este motivo se están estudiando métodos alternativos que sean rápidos, sencillos y económicos, que permitan determinar el grado de frescura, la calidad y la vida útil del pescado (Pons-Sánchez-Cascado et al., 2000).

En los últimos años, las lenguas electrónicas se han empezado a estudiar como alternativa a los métodos tradicionales de análisis para el control de los procesos y los productos agroalimentarios (Barat et al., 2008). Se trata de sistemas que, mediante técnicas electroquímicas como la potenciometría o la voltametría combinadas con herramientas de análisis multivariante, son capaces de clasificar muestras y cuantificar parámetros físico-químicos. Su principal ventaja frente a los métodos tradicionales es que permiten la realización de medidas rápidas y económicas, evitando el preprocesado de la muestra (Escuder et al., 2010). Su funcionamiento se basa en el empleo de sensores de sensibilidad cruzada permitiendo, de este modo, la medida de muestras en las que existen interferencias entre los distintos compuestos que las integran (Alcañiz et al., 2012). Las lenguas electrónicas han demostrado su potencial en la predicción de la frescura o deterioro de diferentes alimentos (Gil et al., 2008). La aplicación directa de lengua voltamétrica en pescado y productos de la pesca ha sido poco estudiada.

Por otra parte, el uso de sensores químicos cromogénicos es una técnica prometedora puesto que es barata, versátil, pueden ser impresos en el envase, los cambios de color pueden medirse fácilmente con el uso de cámaras u otros sistemas que permitan la captura de imágenes y, en ciertas circunstancias, permiten la detección a simple vista de los cambios de color a través de films transparentes (Huang et al., 2011). Aunque algunos indicadores cromogénicos ya han sido estudiados en la detección de deterioro de alimentos, éstos generalmente se basan en un solo compuesto y presentan ciertas limitaciones como la falta de especificidad, dando lugar a falsos positivos o falsos negativos. Los ensayos más prometedores, potentes

y versátiles para ser aplicados en matrices complejas, se basan en el uso de narices opto-electrónicas, construidas por una serie de reactivos colorimétricos capaces de ofrecer información acerca del grado de deterioro de un alimento, a través de cambios de color adecuado (Loughran & Diamond, 2000; Pacquit et al, 2006).

En los últimos años, el uso de matrices de sensores no específicos ha demostrado un enfoque adecuado para el análisis de sistemas complejos, y en la bibliografía, puede encontrarse un gran número de ejemplos de narices y lenguas electrónicas empleadas para el estudio de la frescura del pescado (Kuswandi et al, 2012). Sin embargo, los estudios de evaluación de calidad de pescado utilizando matrices cromogénicas son escasos (Alimelli et al, 2007; Huang et al, 2011).

El objetivo de este trabajo fue evaluar dos métodos de análisis, uno basado en la aplicación de la lengua voltamétrica y otro en sensores cromogénicos, en la determinación de la vida útil de dorada fresca almacenada en refrigeración.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Materia prima

La materia prima utilizada en este trabajo fue dorada (*Sparus aurata*) procedente de la piscifactoría Frescamar Alimentación, S.L. (Burriana, Castellón), cuyo calibre fue de 400-600 g. El sacrificio de las doradas se efectuó el mismo día de su adquisición. La materia prima se transportó al laboratorio en cajas de poliespán entre capas de hielo.

2.2. Reactivos colorimétricos

Los cinco colorantes empleados en el estudio fueron violeta de bromocresol, resorufin, azul de bromofenol, rojo de fenol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y un complejo dinuclear de rodio (sintetizado según procedimientos descritos por Esteban et al. (2010) y Moragues et al. (2011)). La selección de estos colorantes se basó en la información previamente obtenida del uso de narices opto-electrónicas y también, de la propia experiencia en el diseño de sondas colorimétricas (Salinas et al., 2012). La estructura química de los cinco colorantes se muestra en la Figura 1. Los soportes (óxido de aluminio y sílica gel) y los disolventes (diclorometano y etanol) fueron proporcionados por Scharlau Chemie, S.A. (Barcelona, Spain).

Las disoluciones fueron preparadas disolviendo una cantidad determinada de colorante y de soporte inorgánico (óxido de aluminio o sílica gel) en el disolvente apropiado (diclorometano o etanol), obteniendo un total de 8 materiales cromogénicos, tal y como se describe en la Tabla 1. Las disoluciones fueron agitadas durante 8 h para conseguir la máxima absorción del colorante en el material. Después de esto, el disolvente fue evaporado en un rotavapor para obtener los materiales.

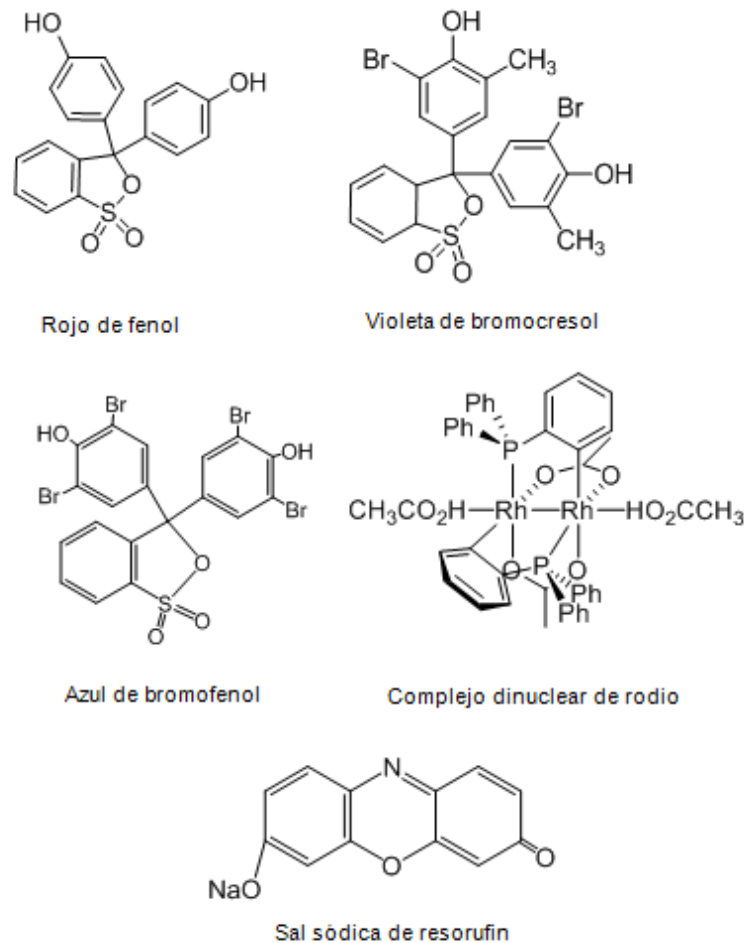


Figura 1. Estructura química de los colorantes utilizados en el estudio.

2.3. Preparación de las muestras

Se pesaron y codificaron 18 pescados, de los cuales 15 se pusieron individualmente en bandejas de aluminio de 2,7 L de capacidad, junto con un rack donde estaban los pocillos con los reactivos (Figura 2).

Como control se utilizaron tres bandejas que contenían los reactivos colorimétricos pero que no contenían pescado. En las bandejas control se introdujeron placas petri con agua para reproducir las condiciones de humedad de las muestras. Las bandejas fueron envueltas con film plástico y almacenadas a 4 °C durante 11 días. En la Figura 3, se muestra el procedimiento de trabajo seguido en este estudio.

Tabla 1. Preparación de colorantes.

Código	Colorante	Soporte	mg de colorante (g sólido) ⁻¹	mmol de colorante (g sólido) ⁻¹	Disolvente	Volumen de disolvente (mL)
1	Resorufin	Óxido de aluminio	40	0.17	Etanol	8
2	Violeta de bromocresol	Silica gel	40	0.07	Etanol	8
3	Violeta de bromocresol	Óxido de aluminio	4	0.007	Etanol	8
4	Azul de bromofenol	Silica gel	40	0.059	Etanol	8
5	Rojo fenol	Silica gel	40	0.113	Diclorometano	5
6	Complejo dinuclear de rodio	Silica gel	40	0.042	Diclorometano	6
7	Complejo dinuclear de rodio	Silica gel	80	0.083	Diclorometano	6
8	Complejo dinuclear de rodio	Silica gel	140	0.145	Diclorometano	6



Figura 2. Preparación de una bandeja con la muestra y los reactivos colorimétricos.

2.4. Estudio de vida útil

Se llevaron a cabo análisis físico-químicos, microbiológicos y se hicieron medidas con el equipo de lengua voltamétrica de las muestras de pescado fresco (día 0), así como de las muestras almacenadas durante 2, 4, 7, 9 y 11 días en refrigeración. Previamente a los análisis, las muestras eran descabezadas, evisceradas y fileteadas, obteniendo dos filetes de cada pescado.

De forma paralela se tomaron fotografías de todos los reactivos cromogénicos a cada día de análisis en cada una de las bandejas almacenadas.



Figura 3. Diseño experimental.

2.5. Determinaciones analíticas

2.5.1. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

Los análisis físico-químicos se llevaron a cabo por triplicado, es decir, se emplearon 3 doradas por análisis (n=3).

La determinación de la humedad se llevó a cabo según el método de la AOAC 950.46 (1997), mediante secado en estufa a 103 ± 2 °C.

El pH de las muestras se midió directamente sobre los filetes de dorada empleando, para ello, un pH-metro Crison micropH 2001 con un electrodo de punción acoplado, tomando 6 lecturas en diferentes puntos del filete.

Para determinar la pérdida por goteo o exudado, se eliminaba el film plástico que envolvía a las muestras. Éstas 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, inosín-5'-monofosfato (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx) fueron determinados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en un cromatógrafo Hitachi LaChrom Elite (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) con bomba (modelo L-2130), muestreador automático (modelo L-2200) y detector UV (modelo L-2400). , 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. La confirmación de los mismos se llevó a cabo 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: [IMP] = concentración de inosín-5'-monofosfato ($\mu\text{mol/g}$ de muestra); [Ino] = concentración de inosina ($\mu\text{mol/g}$ de muestra); [Hx] = concentración de hipoxantina ($\mu\text{mol/g}$ de muestra).

2.5.2. DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo por triplicado (3 doradas por análisis).

Para llevar a cabo las determinaciones microbiológicas, se prepararon diluciones decimales, siguiendo el método descrito en la Norma UNE EN-ISO 6887-3 (AENOR, 2004). De cada dilución se sembraban 2 placas.

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se realizó mediante siembra en profundidad en Agar Plate Count (PCA), después de 72 h de incubación a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ (ISO 4833:2003). El recuento de enterobacterias se llevó a cabo mediante siembra en doble capa en Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG, Scharlau), y las placas fueron incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18-24 h (Pascual y Calderón, 2000).

2.6. Medidas realizadas con el equipo de lengua electrónica

El equipo de lengua electrónica utilizado en este estudio, se basa en la voltametría de pulsos. Este equipo fue diseñado por el Grupo de Microelectrónica Híbrida del Instituto de Química Molecular Aplicada de la Universidad Politécnica de Valencia.

El trabajo se realizó con 1 electrodo de referencia y 2 lenguas electrónicas insertadas en un mismo equipo, las cuales, poseen cuatro elementos metálicos diferentes. La primera lengua electrónica, presentaba 4 metales nobles (Iridio, Rodio, Platino y Oro) y, la segunda, estaba compuesta por 4 metales no nobles (Plata, Cobalto, Cobre y Níquel). El tratamiento de los datos se efectuó en conjunto, es decir, se tomaron todos

los datos obtenidos por las lenguas, sin diferenciar aquellos que procedían de metales nobles de aquellos que procedían de metales no nobles.

Seguidamente, se escogió la escala de corriente adecuada para el análisis, debiendo situarse dentro del rango de medidas que se iban a efectuar. La escala de corriente debe ser lo suficientemente grande para que ninguna de las señales recogidas supere los límites de la escala evitando la saturación en todo momento. También hay que evitar que la escala sea demasiado grande ya que, este hecho, provocaría ruido en el sistema y empeoraría la medida.

A continuación, se realizaron las medidas de las muestras a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo 3 medidas por muestra. Es importante tener en cuenta dos aspectos clave antes de efectuar las medidas. El primero es el contacto entre el alimento y el electrodo, puesto que la señal de corriente está directamente relacionada con la superficie de contacto. Si el contacto no fuera satisfactorio, se podrían producir errores en las medidas. El segundo aspecto clave, es la limpieza de los electrodos, ya que se ha de eliminar la capa residual producida por reacciones de oxidación-reducción, reacciones de corrosión del material del electrodo, etc. Si la capa residual no es eliminada antes de llevar a cabo un nuevo ensayo, el resultado de la medida se verá distorsionado. La limpieza de los electrodos se realizó de la siguiente forma: lijado superficial de los electrodos y posterior pulido de los mismos haciendo uso de alúmina. Con esto se consigue aumentar la superficie de contacto y la homogeneización de la superficie del electrodo, respectivamente.

2.7. Fotografías de los reactivos colorimétricos

Las medidas de color se realizaron para cada compuesto cromogénico, tomando fotografías con una cámara Nikon D3000. El conjunto de datos se recogió a cada día de análisis con el software Photoshop Pro 5 tomando los valores RGB y $L^*a^*b^*$ de las fotografías correspondientes.

2.8. Análisis estadístico

Para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en refrigeración sobre la calidad de dorada, 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 llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA) con los datos obtenidos con el equipo de voltametría y un PCA con los resultados obtenidos por los análisis clásicos (parámetros físico-químicos y microbiológicos).

De igual forma se llevaron a cabo Análisis de Componentes Principales (PCA) con los resultados obtenidos de las medidas de los reactivos colorimétricos, seguido de análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). 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 Tabla 2 se presentan los datos correspondientes a la humedad, pH, NBVT y pérdida por goteo, de muestras de dorada frescas (día 0) y de las almacenadas en refrigeración a día 2, 4, 7, 9 y 11.

Los valores de humedad variaron entre 71,03 y 75,57 g/100 g, lo que coincide con distintos estudios de dorada de piscifactoría (Alasalvar et al., 2001; Goulas & Kontominas, 2007; Grigorakis et al., 2003; Grigorakis, 2007).

Los valores de pH fueron estables hasta el día 4 y a partir de ese día mostraron un ligero aumento. Los mayores valores observados al final del almacenamiento podrían estar relacionados con el desarrollo microbiano, ya que el metabolismo de los microorganismos daría lugar a compuestos básicos. El comportamiento del pH fue similar al observado por Grigorakis et al. (2003) y Barat et al. (2008) en la misma especie de pescado.

TABLA 2. Datos correspondientes a la humedad, pH, NBVT y pérdida por goteo, de muestras de dorada almacenadas en refrigeración (4°C) y analizadas a día 0, 2, 4, 7, 9 y 11. Media \pm desviación estándar (n=3).

Tiempo de almacenamiento (días)	Humedad (g H ₂ O/100 g)	pH	NBVT (mg/100g)	Pérdida por goteo (%)
0	71,61 \pm 2,30 ^a	6,29 \pm 0,02 ^a	18,88 \pm 0,74 ^a	----
2	71,03 \pm 1,45 ^a	6,29 \pm 0,04 ^a	18,23 \pm 1,24 ^a	0,34 \pm 0,18 ^{ab}
4	72,96 \pm 0,93 ^{ab}	6,30 \pm 0,05 ^a	18,84 \pm 0,72 ^a	0,45 \pm 0,35 ^{ab}
7	71,96 \pm 0,77 ^{ab}	6,34 \pm 0,08 ^a	17,13 \pm 0,11 ^a	0,99 \pm 0,41 ^c
9	75,57 \pm 0,53 ^c	6,47 \pm 0,03 ^b	18,20 \pm 0,37 ^a	0,66 \pm 0,32 ^{bc}
11	74,28 \pm 1,45 ^{bc}	6,37 \pm 0,04 ^a	21,33 \pm 2,54 ^b	1,73 \pm 0,11 ^d
p-valor	*	**	*	***

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

Los valores de NBVT aumentaron ligeramente a día 11 de almacenamiento. El pequeño incremento observado en este trabajo fue similar a la evolución de NBVT en dorada durante el almacenamiento en hielo y en refrigeración encontrado en otros estudios (Grigorakis et al. 2003; Méndez, 2011). Civera, Turi, Parisi, y Fazio (1995, citado por Grigorakis et al., 2003) también observaron un lento incremento del NBVT en tres especies de la familia *Sparidae* durante el almacenamiento en refrigeración. Según varios autores, el aumento de este parámetro está relacionado con la

actividad de las bacterias responsables del deterioro y con enzimas endógenas (Fernández-Segovia et al., 2007; Kykkidou et al., 2009; Özogul et al., 2009). Sin embargo, en este estudio la evolución del NBVT no se pudo relacionar con el crecimiento microbiano. Esto podría deberse a que la variación de este parámetro depende del contenido en nitrógeno no proteico del pez, que a su vez depende del tipo de alimentación, estación de captura, tamaño del pez y otros factores medioambientales (Goulas & Kontominas, 2007).

En cuanto a la pérdida por goteo se observó un ligero aumento del porcentaje de exudado a lo largo del período de análisis. 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.

En la Figura 4 se muestra la evolución de las concentraciones de inosín-5'-monofostato (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx) y, la evolución del valor K_1 durante el almacenamiento en refrigeración. Los primeros procesos autolíticos que ocurren en el tejido muscular del pescado se relacionan los nucleótidos y los hidratos de carbono. La degradación de ATP tiene lugar por reacciones de desfosforilación y desaminación dando lugar a adenosín difosfato (ADP), adenosín monofosfato (AMP), inosín-5'-monofostato (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx). Antes del comienzo del *rigor mortis* el glucógeno y el ATP casi han desaparecido, acumulándose IMP y, posteriormente, Ino. Cuando los niveles de estos dos metabolitos empiezan a disminuir, el contenido de Hx asciende progresivamente. Los procesos autolíticos descritos se producen de la misma forma en todos los pescados, pero la velocidad varía en función de la especie. Esto hace que la determinación de nucleótidos, pueda utilizarse para evaluar el grado de frescura (Huss, 1995). Los niveles de IMP fueron altos al principio del estudio (mayores a 10 $\mu\text{mol/g}$). La concentración de este metabolito disminuyó progresivamente a lo largo del almacenamiento, aunque al final del estudio los niveles aún eran mayores a 5 $\mu\text{mol/g}$. El contenido inicial de Ino fue bajo, aumentando durante el periodo de almacenamiento hasta alcanzar valores de 3,6 $\mu\text{mol/g}$. Sin embargo, el contenido de Hx fue bajo durante los 11 días de estudio. Esto significa que la degradación de Ino a Hx fue muy lenta, siendo la inosina el principal metabolito de degradación del IMP al final del almacenamiento. Aunque en algunos estudios la Hx ha sido un buen indicador de frescura, en este trabajo no se encontró correlación con la frescura de la dorada, como ha sucedido en otros estudios con esta misma especie de pescado (Alasalvar et al., 2001; Grigorakis et al.; 2003; Lougovois et al., 2003). Esto podría deberse a que la formación de Hx varía considerablemente entre distintas especies de pescado (Huss, 1988).

En otros estudios de dorada se encontró el mismo patrón general de degradación de ATP con baja formación de Hx, preservación de IMP y bajos niveles de Ino, así como concentraciones similares de estos compuestos (Alasalvar et al., 2001; Grigorakis et al.; 2003; Lougovois et al., 2003).

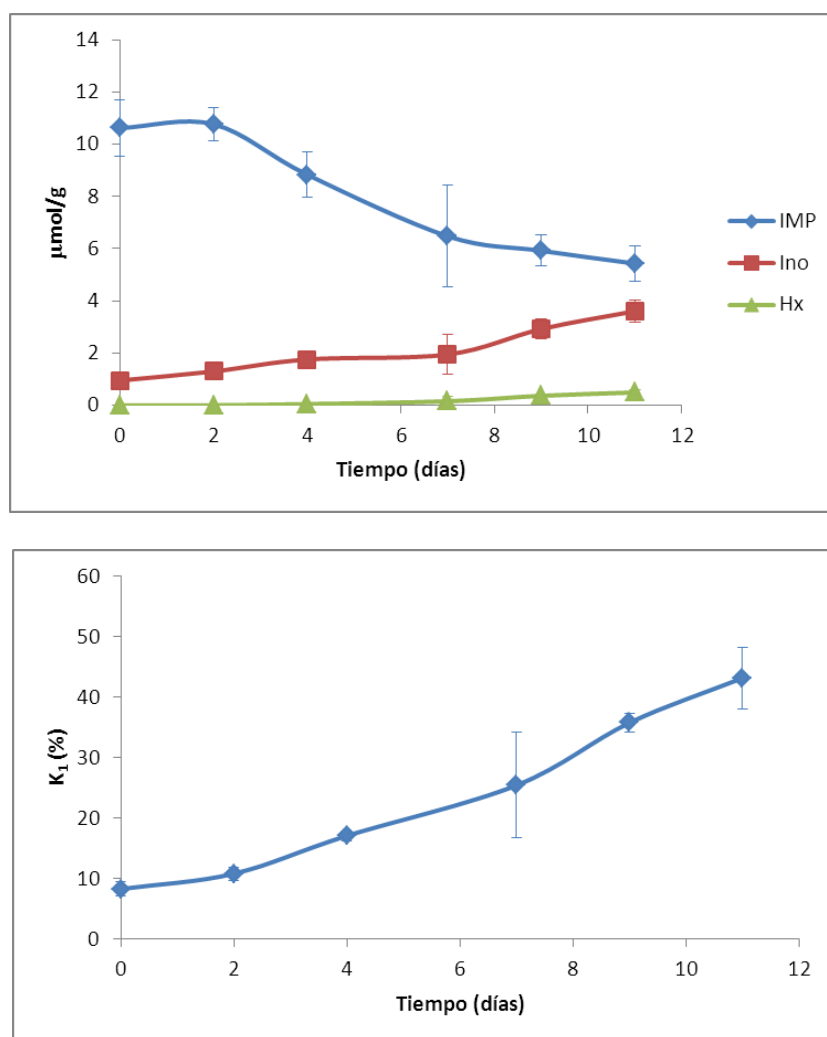


FIGURA 4. Evolución de inosín-5'-monofostato (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx), y evolución del valor K_1 durante el almacenamiento de dorada en refrigeración. (Las barras de error representan la desviación estándar, $n=3$).

Debido a las variaciones en la cantidad original de ATP presente en el músculo de diferentes pescados, la determinación de los compuestos individuales (IMP, Ino o Hx), podría no estar dando una información precisa sobre la frescura del pescado. El valor K_1 que mide la extensión de la degradación de IMP reduce esta variabilidad. El valor K_1 se ha establecido como un indicador de calidad y de frescura para diversas especies de pescado (Ehira y Uchiyama, 1987) y se ha utilizado ampliamente con este fin (Barat et al., 2008; Fernández-Segovia et al., 2008; Mørkøre et al., 2010; Shahidi et al., 1994). En este estudio el valor K_1 aumentó durante el almacenamiento desde valores del 8% (día 0) hasta el 43% (día 11) (Figura 4). Según Lougovois et al. (2003) la dorada muy fresca tendría un valor menor del 10%, mientras que el pescado al final de su vida útil tendría valores de K_1 entre 33-35%, lo que coincide con nuestros resultados; aunque

en este estudio, cuando el pescado alcanzó los límites del deterioro microbiano (día 7), el valor K_1 era ligeramente inferior.

En la Figura 5 se observa la evolución del recuento de mesófilos y enterobacterias durante el periodo de estudio. Los recuentos iniciales de ambos microorganismos fueron bajos, poniendo de manifiesto la excelente calidad higiénico-sanitaria de las muestras.

Los recuentos de mesófilos aumentaron gradualmente a lo largo del almacenamiento. En este trabajo se estableció 10^6 cfu/g como límite para la evaluación del deterioro microbiano, basándonos en otros estudios (Arashisar et al., 2004; Pascual & Calderón, 2000; Özogul et al., 2004). Las muestras alcanzaron este límite de aceptación a día 7 de almacenamiento.

No se encontraron enterobacterias a días 0, 2 y 4 de almacenamiento. Sin embargo, teniendo en cuenta el límite de 3 log cfu/g establecido en otros estudios (Fuentes et al., 2011), se encontraron altos niveles de este microorganismo (2.8 log cfu/g) a día 7.

De este modo, se puede decir que las muestras empleadas en este trabajo, presentaban una vida útil de 7 días.

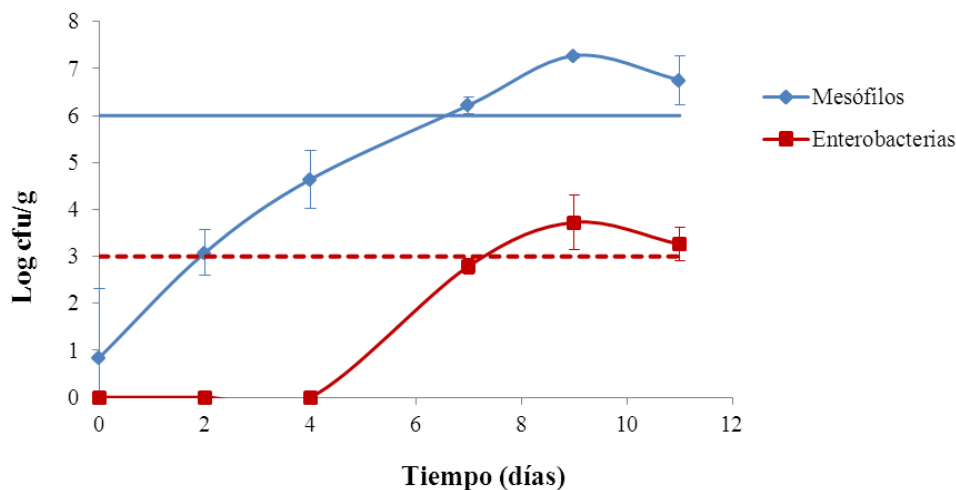


FIGURA 5. Evolución del recuento de mesófilos y enterobacterias durante el almacenamiento de dorada en refrigeración. (Las barras de error representan la desviación estándar, $n=3$). Las líneas horizontales representan el límite de aceptabilidad para mesófilos (azul) y enterobacterias (roja).

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

En el análisis de componentes principales (PCA) realizado con los datos obtenidos con la lengua electrónica según el tiempo de almacenamiento de las muestras, no se observó ninguna discriminación de las muestras en función del tiempo de almacenamiento (resultados no mostrados). Estos

resultados ponen de manifiesto que la lengua voltamétrica no sería adecuada para la determinación del grado de frescura de dorada almacenada en refrigeración. Esto podría ser debido a la dificultad que presenta la aplicación de esta técnica al análisis de alimentos sólidos, ya que la señal de la lengua voltamétrica depende de la superficie de contacto. Los productos sólidos como la dorada, presentan una superficie heterogénea y, como consecuencia de ello, es difícil obtener un contacto satisfactorio en todas las medidas efectuadas.

3.3. Correlación entre los cambios en los reactivos colorimétricos y los análisis físico-químicos y microbiológicos

A partir de las medidas efectuadas sobre los reactivos colorimétricos, se obtuvieron mapas de diferencia, por la diferencia del rojo, verde y azul (RGB) de cada compuesto a día n y los valores iniciales que se midieron en el día 0. Para facilitar la visualización, la paleta de colores del mapa de diferencia pudo mejorarse ampliando la gama de colores desde 0-100 a 0-255; cualquier cambio de $RGB < 4$ fue tratado como ruido de fondo y se ignoró, mientras que los cambios > 100 se asignaron a 255. El vector de diferencia se puede observar en la Figura 6, como un mapa de los valores absolutos de los cambios de color.

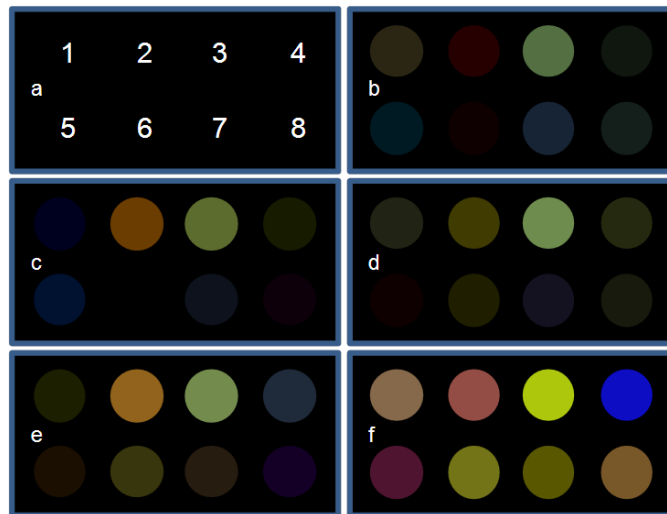


Figura 6. Perfiles de cambio de color después de la exposición a la atmósfera generada en la bandeja durante el almacenamiento de dorada a 4 °C. Los números indican el código de los reactivos (códigos dados en la Tabla 1). Las letras a, b, c, d, e y f, corresponden a los días 0, 2, 4, 7, 9 y 11 de almacenamiento, respectivamente.

En la Figura 6 se muestra que la combinación de colores es característica para cada día de análisis, acentuándose las diferencias de color en los dos últimos días de análisis. Esto pone de manifiesto el potencial de los reactivos

colorimétricos empleados en el seguimiento del proceso de deterioro del pescado.

Por otra parte, los datos obtenidos en las medidas de los reactivos colorimétricos fueron analizados mediante Análisis de Componentes Principales (PCA). Las variables originales, en este caso, fueron las respuestas de los 8 colorantes ensayados (es decir, las coordenadas R, G y B y las coordenadas L*, a* y b*). Los resultados del PCA se muestran en la Figura 7. Los dos primeros PCs explicaron el 58,94% de la variabilidad total. Se pueden observar diferentes grupos; los datos de los días 0 y 2, así como los datos del grupo control (reactivos colorimétricos en bandejas sin muestra) se mezclan en un único grupo, estando los datos del día 4 próximos a este grupo. Las muestras de los otros tres días (7, 9 y 11) están separadas en tres grupos distintos, siendo la distancia mayor a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento.

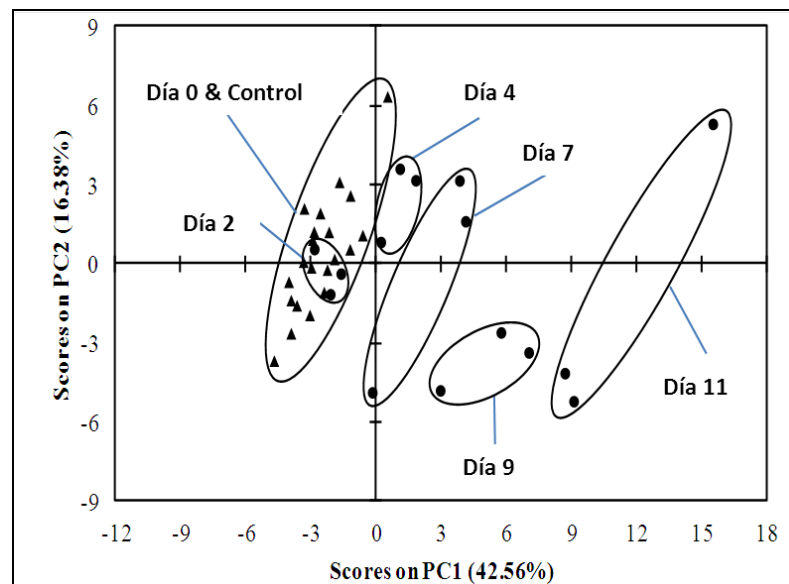


FIGURA 7. Análisis de componentes principales (PCA) de las coordenadas de color obtenidas con los reactivos colorimétricos.

Estos resultados concuerdan con los valores obtenidos en los análisis físico-químicos y microbiológicos, que registraron una pérdida significativa de la frescura del pescado entre los días 4 y 7 de almacenamiento. Para confirmar esta correlación se llevó a cabo un PCA con los datos de los análisis físico-químicos y microbiológicos (Figura 8). Los dos primeros factores explican el 81,21% de la variabilidad total. Se puede apreciar una agrupación de las muestras analizadas a día 0, 2 y 4, mientras que las muestras analizadas a los 7, 9 y 11 días de almacenamiento se ubican en la figura individualmente y separadas del primer grupo. Estos resultados muestran la evolución comentada en el apartado anterior, donde se mostraba una pérdida de calidad importante del día 4 al día 7, considerándose el pescado no apto para su consumo desde el día 7 hasta el

final del almacenamiento. En general, la distribución de las muestras en este análisis fue similar a la obtenida en el PCA con las medidas de color.

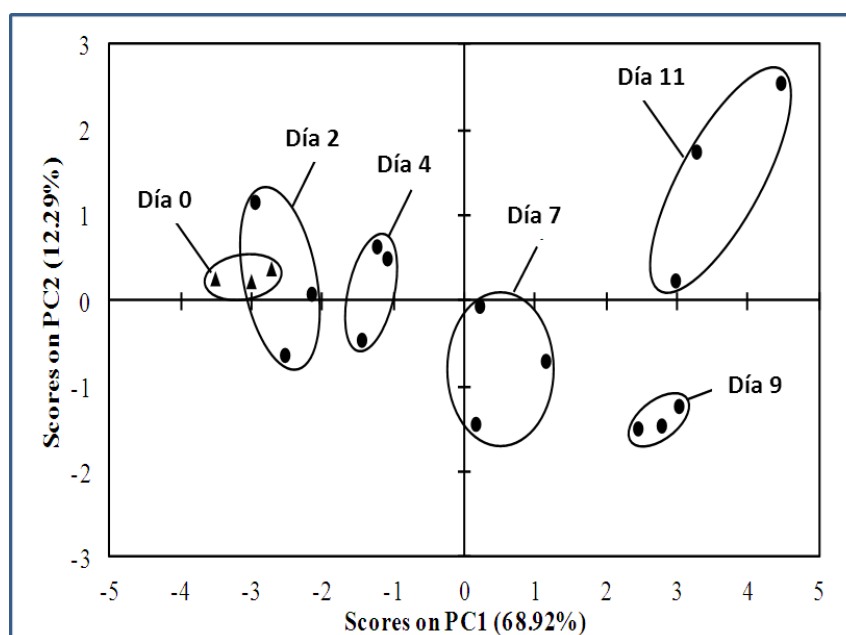
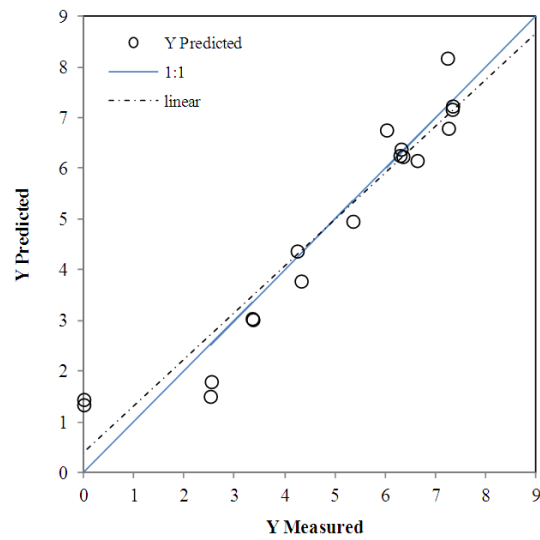
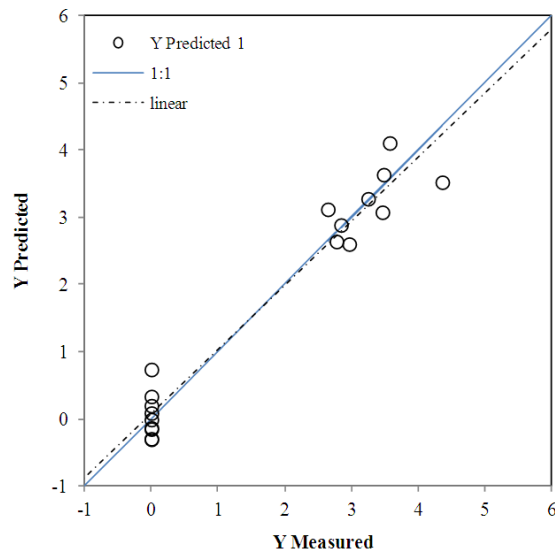


FIGURA 8. Análisis de componentes principales (PCA) de los parámetros físico-químicos y microbiológicos.

Dado que los análisis de PCA para las medidas colorimétricas y para los análisis físico-químicos y microbiológicos clasifican las muestras en grupos similares, se utilizó la herramienta estadística PLS para predecir los valores físico-químicos y microbiológicos a partir de las medidas de color. De esta forma, se establecieron modelos estadísticos para todos los parámetros. Los modelos más robustos se obtuvieron para mesófilos y enterobacterias. En la Figura 9 se muestran los valores experimentales frente los valores predichos por los modelos estadísticos para ambos microorganismos. En ambos casos, los valores predichos se ajustaron con éxito a los valores experimentales (valores RMSEC de 0,6692 para mesófilos y 0,3694 para enterobacterias). Dado que los recuentos microbianos llevados a cabo en este estudio son uno de los índices más importantes para establecer la vida útil del pescado, los resultados obtenidos en el PLS confirman el potencial del sistema de sensores colorimétricos desarrollados en la evaluación de la vida útil de dorada almacenada en refrigeración.



(a)



(b)

Figura 9. Valores experimentales frente a valores predichos por los modelos estadísticos PLS. La línea sólida representa el comportamiento ideal. a) Mesófilos, b) Enterobacterias.

4. CONCLUSIONES

La evolución del pH, la pérdida por goteo, los compuestos relacionados con ATP, el valor K_1 y los recuentos microbianos, mostraron una pérdida de frescura que tuvo lugar principalmente desde el día 7 hasta el final del período de almacenamiento. Todos estos parámetros mostraron valores típicos del pescado fresco desde el día 0 al día 4 de análisis; sin embargo, los niveles de los parámetros físico-químicos y los recuentos de mesófilos y enterobacterias a día 7 de almacenamiento correspondían a pescado

deteriorado. La lengua voltamétrica no fue una herramienta útil en la determinación del grado de frescura de dorada almacenada en refrigeración, ya que no consiguió discriminar entre los distintos tiempos de almacenamiento. El PCA llevado a cabo con los datos obtenidos de las medidas de color clasificó las muestras en distintos grupos; los días 0 y 2 aparecían en un único grupo, estando los datos del día 4 próximos a dicho grupo. Las muestras de los otros tres días (7, 9 y 11) se separaban en tres grupos distintos, siendo la distancia mayor a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento. Por lo tanto, estos resultados coinciden con los obtenidos en los análisis físico-químicos y microbiológicos, que mostraron una clara pérdida de la frescura desde el día 4 al día 7 de almacenamiento. Se obtuvieron modelos de predicción robustos para mesófilos y enterobacterias, lo cual confirma el potencial de la matriz colorimétrica para evaluar el deterioro de dorada. Sería necesario llevar a cabo más estudios para determinar qué compuestos están implicados en los cambios de color de los reactivos. El sistema también debe ser estudiado con diferentes especies de pescados para poder comprobar si esta técnica puede ser usada para la detectar el deterioro en cualquier tipo de pescado.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto PAID-06-09-2940 y del proyecto ref. 2711, ambos financiados por la Universitat Politècnica de València, a la que los autores quieren expresar su agradecimiento.

Quiero dar las gracias a Patricia, Jose Luis, Rafa, Miguel, Arantxa y María, por su ayuda en la realización de este trabajo.

6. REFERENCIAS

- Alasalvar, C.; Taylor, K.D.A.; Öksüz, A.; Garthwaite, T.; Alexis, M.N.; Grigorakis, K. 2001. Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry*, **72**: 33-40.
- Alcañiz, M.; Vivancos, J.L.; Masot, R.; Raga, M.; Soto, J.; Martínez-Mañez, R. 2012. Design of an electronic system and its application to electronic tongues using variable amplitude pulse voltammetry and impedance spectroscopy. *Journal of Food Engineering*.
- Alimelli, A.; Pennazza, G.; Santonico, M.; Paolesse, R.; Filippini, D.; D'Amico, A.; Lundström, I.; Di Natale, C. 2007. Fish Freshness Detection by a Computer Screen Photoassisted Based Gas Sensor Array, *Analytica Chimica Acta*, **582**, 320-328.
- Arashisar, 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.
- A.O.A.C., Association of Official Analytical Chemists 1997. Official Methods of Analysis, 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA.
- 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.
- Belitz, H.D. y Grosch, W. 1997. Química de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España. 667.
- Hira, S., y Uchiyama, H. 1987. Determination of fish freshness using the K-value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness. In D. E. Kramer,

- & J. Liston (Eds.), *Seafood quality determination* (pp. 185-207). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Escuder-Gilabert, L.; Peris, M. 2010. Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis. *Analytica Chimica Acta*, **665**, 15-25.
- Esteban, J.; Ros-Lis, J.V.; Martínez-Máñez, R.; Marcos, M.D.; Moragues, M.; Soto, J.; Sancenón, F. 2010. *Angewandte Chemie International Edition*. 49, 4934
- 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 method. *International Journal of Food Microbiology*, **116(1)**: 67-72.
- Fernández-Segovia, I.; Escriche, I.; Serra, J.A. Evolution of volatile fraction and ATP related compounds during storage of desalted cod (*Gadus morhua*). 2008. *Food Science 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 Technology* **44**:917-923.
- Gil, L.; Barat, J.M.; García-Breijo, E.; Ibañez, J.; Martínez-Manez, R.; Soto, J.; Llobet, E.; Brezmes, J.; Aristoy, M.C.; Toldrá, F. 2008. Fish freshness analysis using metallic potentiometric electrodes. *Sensors and Actuators, B* **131**, 362-370.
- Goulas A.E. y Kontominas M.G. 2007. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*. **100**:287-296.
- Grigorakis, K.; Taylor, K.D.A.; Alexis, M.N. 2003. Seasonal patterns of spoilage of ice-stored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*, **81**: 263-268.
- Grigorakis, K. 2007. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture* **272**:55-75.
- Huang, X.; Xin, J.; Zhao, J. 2011. A Novel Technique for Rapid Evaluation of Fish Freshness using Colorimetric Sensor Array, *Journal of Food Engineering*. **105**, 632-637.
- Huss, H. H. 1988. *Fresh fish: Quality and quality changes*. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
- Huss, H.H. 1995. *Quality and quality changes in fresh fish*, FAO Fisheries Technical Paper 348, Rome, pp 195.
- 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. y Stevenson, R. (Eds.). 1978. *Quantitative analysis in basic liquid chromatography* (pp. 223). Hansen Way, Palo Alto, CA.; Varian Associates.
- Kykkidou, S.; Gitrakou, 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* **115**:169-175.
- Kuswandi, B., Jayus, Restyana, A.; Abdullah, A.; Heng, L.Y.; Ahmad, M. 2012. A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. *Food Control* **25**, 184-189.
- Loughran, M. y Diamond, D. 2000. Monitoring of Volatile Bases in Fish Sample Headspace using an Acidochromic Dye, *Food Chemistry*. **69**, 97-103.
- Lougovois, V.P.; Kyranas, E.R.; Kyranas, V.R. 2003. Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Research International*, **36**:551-560.
- Malle, P. y Tao, S.H. 1987. Rapid Quantitative Determination of Trimethylamine using Steam distillation. *Journal of Food Protection*, **50(9)**, 756-769.
- Méndez, E.L. 2011. *Aplicación de la espectroscopía de impedancia en la evaluación de la calidad de dorada*. Tesis de máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Moragues, M.E.; Esteban, J.; Ros-Lis, J.V.; Martínez-Máñez, R.; Marcos, M.D.; Martínez, M.; Soto, J. and Sancenón, J. 2011. Sensitive and selective chromogenic sensing of carbon monoxide via reversible axial CO coordination in binuclear rhodium complexes. *Journal of the American Chemical Society*, **133(39)**, 15762-72.

- Mørkøre, T.; Rødbotten, M., Vogt, G.; Fjaera, S.O.; Kristiansen, I.O.; Manseth, E. 2010. Relevance of season and nucleotide catabolism on changes in fillet quality during chilled storage of raw Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Chemistry* **119**:1417-1425.
- 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.
- Özogul, F.; Polat, A.; Özogul, Y. 2004. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry* **85**:49-57.
- 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.
- Pacquit, A.; Lau, K.T.; McLaughlin, H.; Frisby, J.; Quilty, B.; Diamond, D. 2006. Development of a Volatile Amine Sensor for the Monitoring of Fish Spoilage, *Talanta* **69**, 515-520.
- Pascual, M.R y Calderón, V. 2000. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos, Madrid, España.
- Pons-Sánchez-Cascado, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Mariné-Font, A.; Veciana-Nogués, M. T.; Vidal-Carou, M. C. 2000. Reliability of Trimethylamine and Total Volatile Basic Nitrogen determinations by Flow Injection-Gas Diffusion Techniques in pelagic fish: *Engraulis encrasicolus*. *Química Analítica*, **19**, 165-170.
- Shahidi, F.; Chong, X.; Dunajski, E. 1994. Freshness quality of harp seal (*Phoca groenlandica*) meat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **42**, 868–872.
- Salinas, Y.; Martínez-Máñez, R.; Marcos, M.D.; Sancenón, F.; Costero, A.M.; Parra, M.; Gil, S. 2012. Optical chemosensors and reagents to detect explosives. *Chemical Society Reviews*, **41**, 1261-1296.
- Shouchun, L.; Wen, F.; Saiyi, Z.; Changwei, M.; Pinglan, L.; Kang, Z.; Zhaouhui, P.; Meijun, Z. 2010. Quality evaluation of tray-packed tilapia fillets stored at 0°C based on sensory, microbiological, biochemical and physical attributes. *Biotechnology* Vol. **9(5)**, 692-701.
- Sikorski, Z. E. 1990. Sea food: Resources, nutritional composition and preservation. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., p.256.