2. Cambios post mortem en el pescado

Cuando el pez muere, se generan diversos cambios físicos y químicos en su cuerpo que conducen hacia una alteración final del mismo. Estos procesos incluyen la producción de mucus en la superficie del cuerpo, desarrollo del rigor mortis, cambios autolíticos, cambios organolépticos y la descomposición bacteriana (Sikorski, 1994). Estos cambios no son consecutivos, su principio, duración y final pueden variar dependiendo de muchos factores tales como la especie, sistema de captura, temperatura de almacenaje y otros.

2.1. Producción de mucus

El mucus es generado por las glándulas mucosas de la piel como una reacción del organismo moribundo frente a las condiciones desfavorables que lo rodean. Este mucus, constituído principalmente por una glicoproteína llamada mucina, proporciona un medio propicio para el desarrollo microbiano. Esta producción de mucus no significa que el pescado se encuentre en malas condiciones para el consumo, pero al permitir el crecimiento de bacterias, puede transformarse en el vehículo de entrada de agentes del deterioro a otras partes del pescado (Ordoñez 1998).

2.2. Rigor mortis

El cambio más dramático es el inicio del rigor mortis. Inmediatamente después de la muerte del pescado, el músculo está totalmente relajado, la textura flexible y elástica. Este estado de relajación generalmente persiste durante algunas horas, posteriormente el músculo se contrae. Cuando se torna duro y rígido, todo el cuerpo se vuelve inflexible y se dice que el pescado está en rigor mortis (Huss, 1998). Esta condición se mantiene durante uno o más días y luego se resuelve el rigor. La resolución del rigor mortis hace que el músculo se relaje nuevamente y recupere la flexibilidad, pero no la elasticidad que tenía previa al rigor. La duración entre el comienzo y la resolución del rigor varía según la especie y es afectada por la temperatura, la manipulación, el tamaño y las condiciones físicas del pescado.

El efecto de la temperatura sobre el rigor no es uniforme. En el caso del bacalao, las altas temperaturas ocasionan un rápido comienzo del rigor y un rigor mortis bastante intenso. Esto debe ser evitado, dado que las fuertes tensiones producidas por el rigor pueden causar debilitamiento del tejido conectivo y posterior ruptura del filet.

Generalmente se acepta que el comienzo y la duración del rigor mortis resulta más rápido a mayor temperatura, pero en ciertas especies tropicales se ha observado el efecto opuesto de la misma. Resulta evidente que en estas especies el inicio del rigor se acelera a la temperatura de 0ºC en comparación con 10ºC, lo cual muestra buena correlación con la estimulación de los cambios bioquímicos a 0ºC (Poulter y col., 1982; Iwamoto y col., 1987). Abe y Okuma (1991) han demostrado que el comienzo del rigor mortis también depende de la diferencia entre la temperatura del mar y la temperatura de almacenaje. Cuando esta diferencia es grande, el rigor se inicia a menor tiempo y viceversa.

En el caso de peces hambrientos, cuyas reservas de glucógeno están agotadas, el rigor mortis se inicia inmediatamente o poco después de la muerte.

El método empleado para aturdir y sacrificar al pez también influye en el inicio del rigor. El aturdimiento y sacrificio por hipotermia (el pez es muerto en agua con hielo) permite obtener el más rápido inicio del rigor, mientras que un golpe en la cabeza proporciona una demora de hasta 18 horas (Azam y col., 1990; Proctor y col., 1982).

El significado tecnológico del rigor mortis es de mayor importancia cuando el pescado es fileteado antes o durante el rigor. Durante el rigor el cuerpo del pescado está completamente rígido; el rendimiento del fileteado resulta muy bajo y una manipulación brusca puede causar el desgarramiento de los filetes. Si los filetes son removidos del hueso antes del rigor, el músculo puede contraerse libremente y se encogerá al comenzar el rigor. El músculo oscuro puede encogerse hasta un 52 por ciento y el músculo blanco hasta un 15 por ciento de su longitud original. Si el pescado es cocido antes del rigor, la textura será muy suave y pastosa. Por el contrario, la textura es dura pero no seca cuando el pescado es cocido durante el rigor. Posterior al rigor la carne se torna firme, suculenta y elástica.

De los pescados enteros, los H&G y los filetes congelados en pre-rigor, pueden obtenerse buenos productos si se descongelan cuidadosamente a baja temperatura. De esta forma, se da tiempo para que pase el rigor mortis mientras el músculo continúa congelado.

2.3. Cambios Organolépticos

Los cambios sensoriales son los que percibimos a través de los sentidos, por ejemplo, la apariencia, el olor, la textura y el sabor.

Los primeros cambios sensoriales que tienen lugar en el pescado durante el almacenamiento están relacionados con la apariencia y la textura. El sabor característico de

las especies normalmente se desarrolla durante los dos primeros días de almacenaje en hielo.

La evaluación sensorial del pescado crudo en mercados y sitios de desembarque se efectúa mediante la valoración de la apariencia, textura y olor. La mayoría de los sistemas de puntuación están basados en los cambios que se producen durante el almacenaje con hielo. La apariencia del pescado almacenado sin hielo no cambia tanto en relación con el pescado en hielo, pero su deterioro es más rápido y se hace necesario efectuar una evaluación sensorial del pescado cocido (Mercosur, 1994). Por consiguiente, es esencial conocer la historia, tiempo y temperatura del pescado al momento del desembarco.

Además del método de almacenaje, los cambios sensoriales característicos en el pescado post-mortem varían considerablemente dependiendo de la especie. Una descripción general ha sido proporcionada por la Unión Europea en la guía para evaluación de la calidad del pescado (Howgate y col., 1992). La escala sugerida está numerada de 0 a 3, donde 3 es la de mejor calidad.

La Asociación de Tecnólogos Pesqueros de Europa Occidental ha recopilado un glosario políglota de olores y sabores, que puede ser de mucha utilidad cuando se buscan términos para describir la frescura del pescado en una evaluación sensorial.

2.3.1. Cambios en la calidad comestible

Cuando se requiere un criterio de calidad durante el almacenaje del pescado refrigerado, se puede llevar a cabo una evaluación sensorial del pescado cocido. Se puede detectar un patrón característico del deterioro del pescado almacenado en hielo, el cual puede ser dividido en las cuatro fases siguientes (Huss, 1998):

Fase 1

El pescado es muy fresco y tiene un sabor a algas marinas, dulce y delicado. El sabor puede ser ligeramente metálico. En el bacalao, el eglefino, la merluza, el merlán y el lenguado, el sabor dulce se hace más pronunciado a los 2-3 días de la captura.

Fase 2

Hay una pérdida del olor y del gusto característico. La carne es neutral pero no tiene olores extraños. La textura se mantiene agradable.

Fase 3

Aparecen signos de deterioro, y dependiendo de la especie y tipo de deterioro (aeróbico o anaeróbico), se producen una serie de compuestos volátiles de olor

desagradable. Uno de estos compuestos volátiles es la TMA derivada de la reducción bacteriana del OTMA. La TMA aporta el olor a "pescado" muy característico. Al inicio de esta fase pueden aparecer olores y sabores ligeramente ácidos, afrutados y ligeramente amargos, especialmente en peces grasos. En los últimos estadíos de esta fase se desarrollan olores nauseabundos, dulces como a col, amoniacales, sulfurosos y rancios. La textura se torna suave y aguada, o dura y seca.

Fase 4

El pescado puede caracterizarse como deteriorado y pútrido.

Una escala numerada puede ser usada para la evaluación sensorial del pescado cocido. Dicha escala está numerada del 0 al 10, donde 10 indica absoluta frescura, 8 buena calidad y 6 un pescado con sabor neutro (insípido). El nivel de rechazo es 4 (Huss, 1998).

2.3.2. Vida útil

La vida útil del pescado puede ser considerada como el intervalo de tiempo que comprende desde la captura hasta el tiempo máximo en el cual el producto conserva su calidad para el consumo bajo una determinada condición de almacenaje (NZFA, 2005). También suele denominarse período de aptitud, período comercial, o vida de anaquel y ocasionalmente vida media. Corresponde indicar la fecha límite en el rotulado.

2.4. Cambios autolíticos

Autólisis significa "auto-digestión". Se sabe desde hace muchos años que existen por lo menos dos tipos de deterioro en el pescado: bacteriano y enzimático. Uchiyama y Ehira (1974), demostraron que en bacalao y en atún aleta amarilla, los cambios enzimáticos relativos a la frescura del pescado precedían y no guardaban relación con los cambios en la calidad microbiológica. En algunas especies (calamar, arenque) los cambios enzimáticos preceden a los microbianos y por lo tanto predominan en el deterioro del pescado refrigerado. En otros la autólisis, sumada al proceso microbiano, contribuye en diferentes grados a la pérdida general de la calidad.

Cuando un organismo muere deja de funcionar el sistema normal de regulación, se detiene el suministro de oxígeno y la producción de energía. Comienza así un proceso caracterizado por la descomposición del glucógeno por vía anaerobia y la degradación de los compuestos ricos en energía (Boeri y col., 1993).

Los primeros procesos autolíticos en el tejido muscular del pescado involucran a los hidratos de carbono y los nucleótidos.

En general el músculo contiene cantidades relativamente bajas de glucógeno comparado con el músculo de mamíferos, y el pH post-mortem es más alcalino, predisponiendo a la carne de pescado a ser más susceptible al ataque por parte de las bacterias (Huss, 1998).

2.4.1. Producción de energía en el músculo post-mortem

Al momento de la muerte, el suministro de oxígeno al tejido muscular se interrumpe porque la sangre deja de ser bombeada por el corazón y no circula a través de las branquias donde, en los peces vivos, es enriquecida con oxígeno. Dado que el oxígeno no está disponible para la respiración normal, se restringe la producción de energía a partir de los nutrientes ingeridos. El glucógeno sufre una serie de reacciones las cuales finalmente producen CO_2, agua y ATP, un compuesto orgánico rico en energía. Este tipo de respiración se efectúa en dos etapas: una anaeróbica y otra aeróbica. La última depende de la continua presencia de oxígeno, sólo disponible en el sistema circulatorio (Huss, 1998).

Para la mayoría de los peces teleósteos, la glucólisis es la única ruta posible para la producción de energía en cuanto el corazón deja de latir. Este proceso, más ineficiente, genera principalmente ácido láctico y ácido pirúvico como productos finales. Además, mediante glucólisis se producen dos moles de ATP por cada mol de glucosa, en comparación con cada mol de glucosa si los productos glucolíticos finales son oxidados aeróbicamente en la mitocondria del animal vivo. Así, después de la muerte, el músculo anaeróbico no puede mantener su nivel normal de ATP, y cuando el nivel intracelular declina de 7-10 μmoles/g a $\leq$ 1 μmoles/g de tejido, el músculo entra en rigor mortis. La glucólisis post-mortem resulta en la acumulación de ácido láctico, con la concomitante disminución del pH en el músculo. En el bacalao, el pH disminuye desde 6,8 hasta un pH extremo de 6,1-6,5. En algunas especies de pescado el pH final puede ser menor, en caballa grande el pH extremo en el rigor puede llegar a ser tan bajo como 5,8-6,0, y en atún e hipogloso se han encontrado valores tan bajos como 5,4-5,6. Sin embargo, estos niveles tan bajos de pH no son frecuentes en teleósteos marinos. Estos valores de pH rara vez son tan bajos como los observados en el músculo post mortem de mamíferos. Por ejemplo, el pH del músculo de vacuno generalmente disminuye a niveles de 5,1 durante el

rigor mortis. La cantidad de ácido láctico producido está relacionada con la cantidad de glucógeno en el tejido vivo. En general, el músculo de pescado contiene un nivel relativamente bajo de glucógeno, comparado con los mamíferos y por esta razón se genera mucho menos ácido láctico después de la muerte. También el estado nutricional del pez, la cantidad y el grado de agotamiento al momento de la muerte, tienen un efecto importante en los niveles de glucógeno almacenado y consecuentemente en el pH post-mortem final. Como regla, el pescado bien descansado y bien alimentado contiene más glucógeno que el pescado exhausto y hambriento. En un estudio reciente de la locha japonesa (Chiba y col., 1991), se demostró que sólo minutos de agotamiento antes de la captura, ocasionaban una disminución de 0,50 unidades de pH en 3 horas, en comparación con peces no sometidos a agotamiento, en los cuales el pH disminuye significativamente.

La disminución post-mortem del pH del músculo de pescado tiene un efecto en las propiedades físicas del músculo. A medida que el pH disminuye, se reduce la carga neta en la superficie de las proteínas musculares, causando su desnaturalización parcial y disminuyendo su capacidad de retener agua. El músculo en estado de rigor mortis pierde su humedad cuando es cocido y resulta particularmente inadecuado para un procesamiento posterior que involucre calentamiento, puesto que la desnaturalización por calor incrementa la pérdida de agua. Esta pérdida de agua tiene un efecto perjudicial en la textura del músculo. Ha sido demostrado por Love (1975) que existe una relación inversamente proporcional entre la dureza del músculo y el pH.

2.4.2. Autólisis y catabolismo de nucleótidos

Como se mencionó anteriormente, el rigor mortis se establece cuando el nivel de ATP en el músculo es $\leq$ 1,0 μmoles/g. El ATP no es sólo una fuente de alta energía necesaria para la contracción muscular de los animales vivos, sino que también proporciona plasticidad al músculo. La contracción muscular está controlada por el calcio y la enzima ATP-asa que se encuentra en la célula muscular. Cuando los niveles de Ca^{+2} intracelular son >1 μmol, la ATP-asa activada por Ca^{+2} reduce los niveles ATP libre en el músculo, ocasionando la interacción entre la actina y la miosina, las principales proteínas contráctiles. Esta interacción trae como resultado la reducción del músculo, ocasionando su endurecimiento y pérdida de la flexibilidad. Durante el rigor mortis, el pescado no puede ser fileteado o procesado normalmente, porque el cuerpo está demasiado rígido, impidiendo su manipulación.

La resolución del rigor es un proceso no del todo comprendido, pero siempre ocasiona el reblandecimiento posterior del tejido muscular y se cree que está relacionado con la activación de una o más enzimas musculares presentes en el pescado. El reblandecimiento del músculo durante la resolución del rigor (inicio del proceso de deterioro) coincide con los cambios autolíticos. De estos cambios, el primero en ser reconocido de forma más o menos predecible después de la muerte es la degradación de los compuestos relacionados con el ATP. La Figura 5 ilustra la degradación del ATP para formar ADP, AMP, IMP, Ino e Hx. La degradación de los catabolitos del ATP procede de la misma forma en la mayoría de los pescados, pero la velocidad de cada reacción (de un catabolito a otro), varía enormemente entre una especie y otra, progresando generalmente con el nivel percibido de deterioro según determinaciones efectuadas mediante un panel de analistas entrenados.

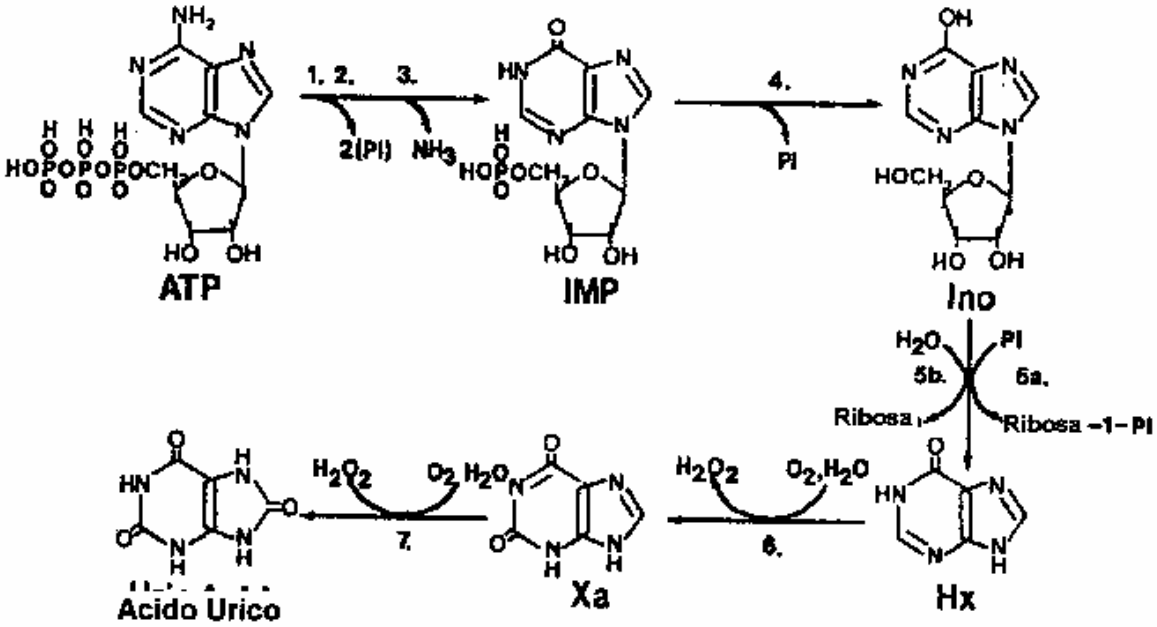

Figura 5: Degradación del ATP.

El índice de frescura K (Figura 6) proporciona una puntuación de frescura relativa, basada principalmente en los cambios autolíticos que tienen lugar durante el almacenamiento post mortem del músculo (Olafsdottir y col., 1997). De este modo, cuanto más alto es el valor K, menor es el nivel de frescura. Cabe destacar que algunas especies de

pescado, como el bacalao del Atlántico, alcanzan un valor K máximo mucho antes que la vida en anaquel, según lo determinado por jueces entrenados. Por lo tanto, el valor K no puede ser considerado como un índice confiable de frescura para todos los peces marinos con aletas. Asimismo, la degradación de nucleótidos coincide con los cambios percibidos en la frescura y no está necesariamente relacionada con su deterioro, considerándose que sólo la Hx tiene un efecto directo en el sabor amargo percibido en el pescado deteriorado (Hughes y Jones, 1966). Actualmente, es ampliamente aceptado que la IMP es responsable del sabor deseable a pescado fresco, sólo presente en los productos pesqueros de alta calidad. Ninguno de los nucleótidos se considera relacionado con los cambios percibidos en la textura durante el proceso autolítico, a excepción del ATP, por supuesto, cuya disminución está asociada con el rigor mortis.

$$K(\%) = \frac{[Ino] + [Hx]}{[ATP] + [ADP] + [AMP] + [IMP] + [Ino] + [Hx]} \times 100$$

Figura 6: Valor K.

En las muestras no estériles de bacalao refrigerado, laa conversión de Ino a Hx se aceleró en 2 días. Esto sugiere que la nucleosida fosforilasa bacteriana (enzima 5ª en la Figura 5) desempeña un papel principal en la producción post mortem de Hx (Huss, 1998). Es interesante notar que Surette y col. (1988) no lograron recuperar nucleosida fosforilasa a partir del bacalao recién muerto, pero posteriormente lograron aislar y purificar esta enzima a partir de la bacteria Proteus, recuperada en filetes de bacalao deteriorado (Surette y col.,1990). Como se mencionó anteriormente, es de esperar grandes variaciones en los patrones de la degradación de nucleótidos entre una especie y otra.

Existe certeza en cuanto a que la manipulación física acelera los cambios autolíticos en pescado refrigerado. Surette y col. (1988) determinaron que la tasa de descomposición de los nucleótidos era mayor en filetes estériles que en bacalao entero eviscerado no estéril. Esto tal vez no sea sorprendente, ya que se ha demostrado que muchas de las enzimas autolíticas se encuentran limitadas por membranas, las cuales se rompen cuando están sujetos a abuso físico, originando las mezclas entre enzimas y sustratos. Aplastar el pescado contra el hielo o contra otros pescados puede afectar seriamente la comestibilidad y el rendimiento en el fileteado, incluso para pescados con cargas bacterianas relativamente bajas, lo cual demuestra la importancia de los procesos

autolíticos. A fin de minimizar la autólisis, el pescado en hielo nunca debe ser almacenado en cajas cuya profundidad exceda los 30 cm y de igual forma es importante asegurar que las cajas no vayan apretadas unas encima de las otras. Deben ser diseñados sistemas para transportar y descargar el pescado de los barcos, que permitan evitar daño físico en los delicados tejidos.

Se han desarrollado algunos métodos rápidos para la determinación de nucleótidos. Al respecto, pueden ser consultados los trabajos de revisión de Gil (1990, 1992).

2.5. Cambios en los compuestos nitrogenados

Los compuestos nitrogenados del pescado, en los que se incluyen las proteínas y otros componentes tales como ácidos nucleicos, nucleótidos, TMA y su óxido OTMA, aminoácidos, urea, etc., se pueden clasificar en dos grupos: nitrógeno proteico (NP) y nitrógeno no proteico (NNP).

2.5.1. Nitrógeno proteico

Constituído por tres grupos: proteínas estructurales, proteínas sarcoplasmáticas y proteínas del tejido conectivo.

La cantidad obtenida de cada una de estas fracciones se ve afectada por las condiciones de extracción, valor de pH, concentración salina, así como por el grado de desnaturalización y pérdida de la solubilidad de las proteínas causada por el procesado y posterior almacenaje del pescado (Huss, 1998).

2.5.2. Nitrógeno no proteico

Son varios los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que experimentan transformaciones post-mortem y son responsables de los cambios organolépticos en el pescado. Estos compuestos pueden definirse como compuestos de naturaleza no proteica, solubles en agua, de bajo peso molecular y que contienen nitrógeno. El nitrógeno no proteico constituye en los teleósteos entre un 9-18% del nitrógeno total.

Un 95 % o más del nitrógeno no proteico está formado por aminoácidos libres, dipéptidos, compuestos de guanidina, OTMA y sus derivados, nucleótidos, compuestos afines y en el caso de pescados cartilaginosos, urea. En general, los aminoácidos libres se encuentran en pequeñas cantidades en el músculo de los peces marinos. Los dipéptidos principales son la carnosina y la anserina, y su presencia depende de la especie de pescado.

Los compuestos de guanidina constituyen un grupo importante de compuestos nitrogenados no proteicos, cuyo principal componente es la creatina la cual normalmente se presenta en forma fosforilada como creatina fosfato. El OTMA y sus derivados forman uno de los compuestos nitrogenados más importantes en la carne del pescado de origen marino. Stroem y col. (1979) han demostrado que el OTMA se forma por biosíntesis en ciertas especies del zooplancton. La TMA presente en plantas marinas es transformada en OTMA por el zooplanton que posee la enzima TMA monooxigenasa.

El contenido de urea en los peces es muy variable, siendo ricos en este compuesto, los elasmobranquios. En el músculo del pescado los nucleótidos de adenina representan más del 90% del total de estos compuestos y el principal es el ATP.

El NBVT del músculo de pescado está formado principalmente por: NH_3, DMA y TMA (Ciarlo y col. 1987). Las proporciones en las cuales estas bases están presentes dependen de la especie, del grado y el tipo de deterioro sufrido.

Dentro de los cambios irreversibles post-mortem relacionados con la producción de NBVT Ciarlo y col. (1987) citan a los siguientes:

- Crecimiento de microorganismos capaces de producir enzimas que desaminan los aminoácidos dando NH_3 como producto de la reacción.
- Crecimiento de microorganismos que producen enzimas involucradas en la reducción del OTMA dando TMA como producto de reacción.
- La descomposición autolítica del OTMA en DMA y FA.
- La degradación autolítica del ATP que conduce a la producción de NH_3.

2.5.3. Reducción del óxido de trimetilamina

El crecimiento de bacterias consumidoras de oxígeno ocasiona la formación de nichos anaeróbicos o microaerófilos en el pescado. Esto sin embargo no necesariamente favorece el crecimiento de bacterias anaeróbicas. Algunas de las bacterias presentes en el pescado son capaces de llevar a cabo respiración empleando otras moléculas como receptor final del electrón. Es típico de muchas bacterias específicas del deterioro de pescado, emplear el OTMA como aceptor terminal de electrones durante la respiración anaeróbica. El componente reducido, la TMA, es uno de los compuestos dominantes del pescado deteriorado. El nivel de TMA encontrado en pescado fresco rechazado por un panel sensorial varía dependiendo de la especie, pero generalmente se encuentra alrededor de los

10-15 mg TMA-N/100g en pescado almacenado aeróbicamente y en un nivel de 30 mg TMA-N/100 g en bacalao empacado (Dalgaard y col., 1993).

La reducción del OTMA está generalmente asociada con géneros de bacterias típicos del ambiente marino (Alteromonas, Photobacterium, Vibrio y S. putrefaciens).

El OTMA es un compuesto típico de los peces marinos y recientemente ha sido reportado que también algunos peces de agua dulce contienen altas cantidades de OTMA (Anthoni y col., 1990). Sin embargo, la TMA no es necesariamente un compuesto característico durante el deterioro de este tipo de pescado porque el deterioro es debido a Pseudomonas spp. (Gram y col., 1990).

En especies marinas la velocidad de aumento de TMA varía de especie a especie, siendo posible entonces no detectarla por no formarse suficiente cantidad durante el deterioro. Deben además sumarse los problemas provenientes del distinto valor inicial de OTMA entre las distintas especies, la variación apreciable entre individuos de una misma especie y variaciones asociadas con la estación del año y zona de pesca; además el contenido de OTMA varía con el tamaño del pescado y presenta distintas distribuciones en la musculatura.

En muchas especies de pescado el desarrollo de la TMA es paralelo a la producción de hipoxantina.

Por acción de enzimas tisulares el ATP es tranformado a Hx y Ribosa-fosfato. En este proceso ocurren dos cosas importantes; la primera es la degradación irreversible de ATP a Ino y luego a Hx, y la segunda es la formación de NH_3 que marca el inicio de producción de bases volátiles por vía puramente enzimática (Huss, 1998).

La Hx puede ser formada por la descomposición autolítica de nucleótidos, pero también puede ser formada por bacterias. Dalgaard y col. (1993) demostraron una correlación lineal entre el contenido de TMA e Hx durante el almacenamiento en hielo de bacalao envasado. Algunas de las bacterias producen Hx a partir de Ino o Ino monofosfato, incluyendo Pseudomonas spp, S. Putrefaciens y P. Phosphoreum (Huss, 1998).

En el bacalao y otros gádidos, mientras ocurre el deterioro, la TMA constituye la mayor parte de las denominadas bases volátiles totales.

Sin embargo, en el pescado deteriorado el suministro de OTMA decae, la TMA alcanza su máximo nivel y los niveles de nitrógeno volátil total continúan incrementándose debido a la formación de NH_3, y otras aminas volátiles. En las primeras semanas del almacenaje en hielo también se forma amoníaco debido a la autólisis. En algunos pescados que no contienen OTMA, o en los cuales el deterioro es debido a una flora no reductora de

OTMA, se observa un leve incremento en el NBVT durante el almacenaje, probablemente como resultado de la desaminación de aminoácidos (Sikorski, 1994).

El almacenamiento anaeróbico del pescado ocasiona un incremento en la formación de NH_3, debido a la degradación posterior de aminoácidos y a la acumulación de ácidos como los ácidos acético, butírico y propiónico (Huss, 1998).

2.5.4. Medida de nitrógeno básico volátil total

La determinación de NBVT es de fundamental importancia en el control de calidad del pescado. Esta determinación ha tomado la suficiente trascendencia y aceptación para ser el índice químico normalmente solicitado en el comercio internacional de pescado fresco y congelado (Olafsdottir y col., 1997; Giannini, 1986) El NBVT incluye la medición de TMA (producida por el deterioro bacteriano), DMA (producida por enzimas autolíticas durante el almacenaje en congelación), NH_3 (producido por desaminación de aminácidos y catabolitos de nucleótidos) y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles asociados con el deterioro de los productos pesqueros. Su determinación es de interés para dictaminar la calidad de un pescado adicionando además exámenes organolépticos y microbiológicos.

Según las reglamentaciones vigentes, el límite de aceptación es de 30 mg NBVT/100 g de muestra; lo que es coincidente con la existencia de alteraciones organolépticas. Este parámetro no es adecuado para elasmobranquios y moluscos vivalvos (Código Alimentario Argentino, 1997; Mercosur, 1994; U.E., 2005)

Si bien este valor establecido para NBVT corresponde a un estadío final en el almacenaje del pescado, es escasa la información sobre dicho parámetro al comienzo del almacenaje, es decir al comienzo del período de deterioro. Durante los primeros días posteriores a la captura el valor de NBVT permanece constante (Huss, 1998).

Ha sido informado que para merluza negra (*Dissostichus eleginoides*) el valor de NBVT al momento de captura es de 14,30 mg NBVT/100 g (Trucco y col., 1978).

En la práctica comercial se acepta usualmente que un pescado de buena calidad no puede estar asociado a un valor mayor que 25 mg NBVT/100 g de muestra (Ordoñez, 1998).

2.6. Cambios en los lípidos

El término lípidos engloba un grupo de sustancias que pueden dividirse desde el punto de vista funcional en lípidos de reserva y lípidos estructurales.

La grasa del pescado se diferencia de las grasas vegetales y la de otros animales en tres aspectos fundamentales (Ordoñez, 1998):

- ✓ En el pescado existe una mayor variedad de ácidos grasos.
- ✓ La proporción de ácidos grasos de cadena larga es mayor.
- ✓ Las grasas del pescado son más ricas en PUFA.

Durante los cambios post-mortem, en los lípidos del pescado ocurren dos reacciones diferentes de importancia en el deterioro de la calidad: la oxidación y la hidrólisis. Estas reacciones dan como resultado la producción de una serie de sustancias, las cuales algunas tienen olores y sabores desagradables. Algunas pueden también contribuir a los cambios de textura mediante uniones covalentes con las proteínas musculares. Las reacciones pueden ser no enzimáticas o catalizadas por enzimas, las que pueden ser microbianas, intracelulares o digestivas del mismo pescado. Por lo tanto, el significado relativo de estas reacciones depende principalmente de la especie de pescado y de la temperatura de almacenaje.

Los pescados grasos son particularmente susceptibles a la degradación lipídica, la cual puede ocasionar severos problemas en la calidad, incluso durante el almacenaje a temperaturas bajo cero (Huss, 1998).

2.6.1. Lipólisis – hidrólisis

La degradación que experimentan los lípidos es resultado principalmente de la hidrólisis enzimática. En condiciones de depósito refrigerado, la oxidación de los lípidos es de menor importancia. Alrededor del 20% de los lípidos son hidrolizados durante la vida comercial del pescado refrigerado. Durante este período se duplica la cantidad de AGL. Los fosfolípidos son hidrolizados con máxima facilidad, seguidos por los triacilgliceroles, ésteres de colesterol y ésteres cereos. La fosfatidilcolina se degrada con máxima rapidez. Los cambios hidrolíticos que afectan a los lípidos del pescado refrigerado se aceleran al cabo de unos días. Durante las últimas etapas de depósito debe esperarse una significativa actividad de las lipasas bacterianas, así como de enzimas digestivas (Sikorski, 1994).

Durante el almacenaje, aparece una cantidad considerable de AGL. El fenómeno es más profundo en el pescado no eviscerado que en el eviscerado, probablemente por la presencia de enzimas digestivas.

Los TG presentes en los depósitos de grasa son escindidos por la trigliceril lipasa originada en el tracto digestivo o excretada por ciertos microorganismos. Las lipasas celulares pueden también desempeñar un papel menor.

En el pescado magro, la producción de AGL ocurre incluso a bajas temperaturas. Se cree que las enzimas responsables son fosfolipasas celulares (particularmente la fosfolipasa A_2). Sin embargo aún no ha sido establecida plenamente una correlación entre la actividad de estas enzimas y la tasa de aparición de los AGL. Los ácidos grasos que están unidos a fosfolípidos en el átomo carbono 2 del glicerol, son particularmente del tipo poliinsaturados; en tal sentido, la hidrólisis generalmente también conduce a incrementar la oxidación (Huss, 1998). Además, los ácidos grasos por si mismos pueden causar un sabor jabonoso.

2.6.2. Oxidación de los lípidos

La oxidación de los lípidos adquiere especial importancia en las especies grasas. Estos peces contienen más lípidos libres y mayor cantidad de músculo oscuro, sitio donde la oxidación ocurre con velocidad varias veces mayor que en el músculo blanco. Los lípidos del tejido subcutáneo y de la piel son más sensibles a la oxidación, debido a su contacto íntimo con la lipoxigenasa, presente en la piel y con el aire atmosférico.

Se estima que la oxidación lipídica no se produce si tiene lugar la descomposición bacteriana. La autoxidación puede verse retardada por los productos de la hidrólisis fosfolipídica y por cierto número de compuestos nitrogenados no proteicos. Existiendo descomposición bacteriana, el enranciamiento es imperceptible al análisis sensorial.

La gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados presente en los lípidos del pescado, los hace altamente susceptibles a la oxidación mediante un mecanismo autolítico (Aubourg, 1999).

El proceso es iniciado cuando unas pocas moléculas de ácidos grasos que resultan suficientemente actividadas por el oxígeno, el calor, la luz, o un catalizador metálico, para descomponerse en los radicales libres inestables $R^{\bullet}$ y $H^{\bullet}$ (Figura 7). Normalmente, los radicales libres desaparecerían rápidamente al recombinarse, para dar RH, RR, H_2 , H_2O, etc., pero en presencia de oxígeno molecular las posibilidades incluyen una reacción entre

el radical libre $R^{\bullet}$ y el O_2, resultando el radical peróxido $ROO^{\bullet}$. Este radical reacciona entonces con una molécula de lípidos sin activar, RH, generándose el hidroperóxido ROOH y el radical libre $R^{\bullet}$, a través del cual se propaga la reacción en cadena. A esta altura se siguen formando los radicales libres sin la ayuda del activador inicial. La reacción continúa y se generan más hidroperóxidos.

Los hidroperóxidos son llamados productos primarios de la autooxidación de lípidos. Son producidos en cantidades relativamente grandes durante la propagación, siendo además no volátiles, inodoros e insípidos. Su formación y acumulación medidos como VP, indican el progreso de la autooxidación (Cheftel y Cheftel, 1976).

La reacción termina cuando los radicales libres se combinan entre sí, para dar compuestos estables que se acumulan en el sistema. Los hidroperóxidos entran en una serie de reacciones que conducen a más radicales libres y productos finales estables. Estos productos finales incluyen compuestos carbonílicos de cadena corta, responsables del sabor rancio y de reacciones laterales que conducen a un deterioro generalizado. Se los conoce como productos secundarios de la autooxidación (Huss, 1998).

Algunos de los aldehídos pueden ser determinados como “sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico” (Indice de TBA) (Giannini, 1986).

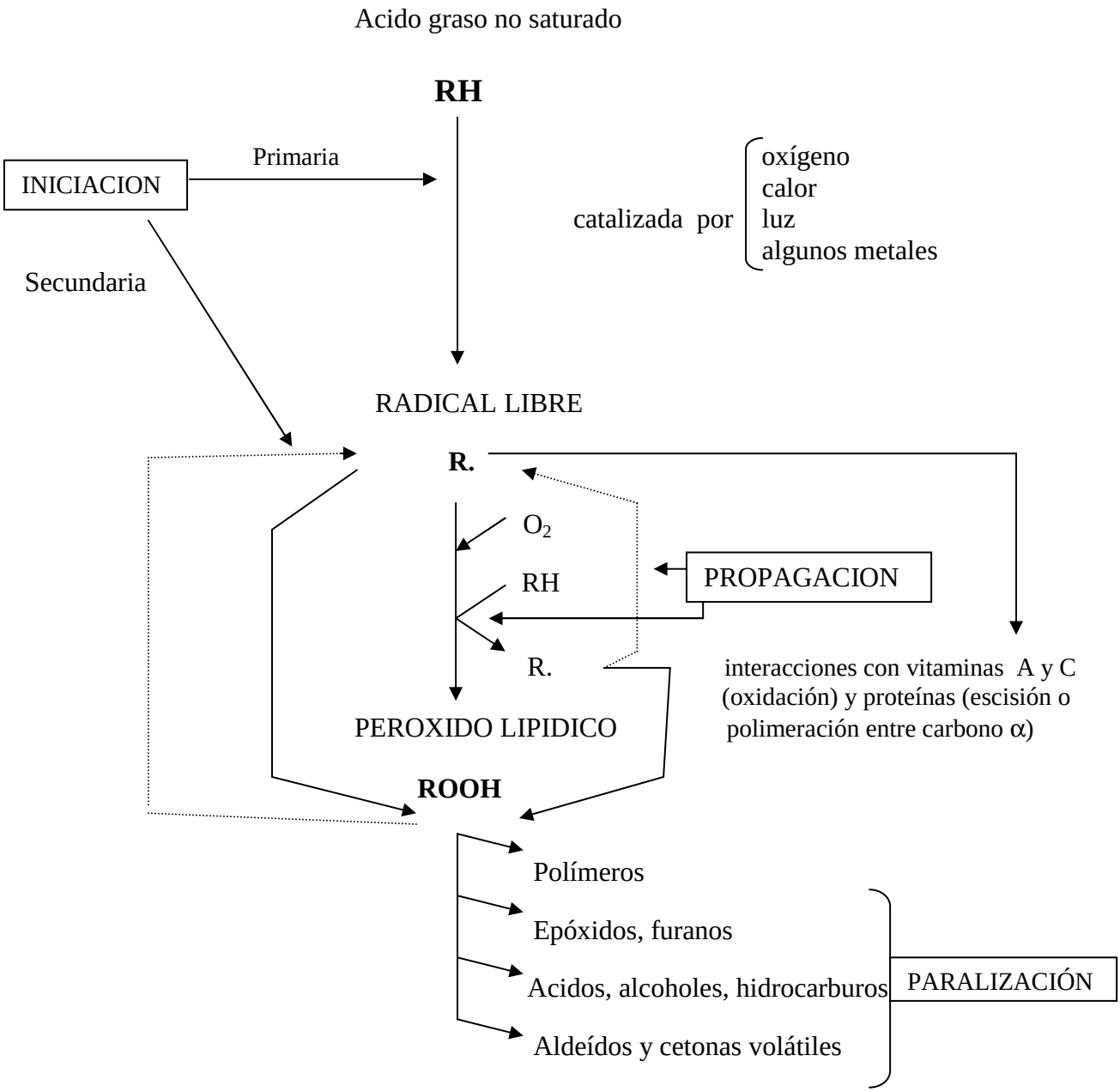

Figura 7. Esquema general de las reacciones de oxidación de lípidos. (Cheftel y Cheftel, 1976).

Los AGL son más susceptibles a la oxidación que los correspondientes ácidos grasos no libres, debido a que la cantidad de hierro en la fase acuosa es probablemente mayor que la cantidad enlazada a la superficie de las membranas celulares y a las gotas de lípidos.

Los hidroperóxidos de los ácidos grasos pueden también ser formados enzimáticamente, catalizados por la enzima lipoxigenasa, la cual está presente en los diferentes tejidos del pescado en cantidades variables. La enzima es inestable y probablemente tiene importancia en la oxidación de los lípidos sólo en el pescado fresco. La cocción o las operaciones de congelado/descongelado destruyen efectivamente la actividad de la enzima (Huss, 1998).

La célula viva posee algunos mecanismos de protección dirigidos contra los productos de la oxidación lipídica. Existe una enzima, la glutación peroxidasa, que reduce los hidroperóxidos en las membranas celulares al correspondiente compuesto hidroxílico. Esta reacción requiere un suministro de glutación reducido y por lo tanto cesa cuando el pez muere y la sustancia se agota en la célula. Las membranas también contienen un compuesto fenólico, α-tocoferol (vitamina E), el cual es considerado como el más importante antioxidante natural. Otros compuestos, por ejemplo los carotenoides, pueden también funcionar como antioxidantes. El humo de la madera contiene fenoles los cuales penetran en el pescado durante el ahumado y proporcionan de esta forma cierta protección contra la oxidación lipídica (Melton, 1983).

2.6.3. Medida de la rancidez oxidativa

Los *compuestos primarios de oxidación* pueden ser detectados por métodos químicos, generalmente haciendo uso de su potencial de oxidación para oxidar yoduro a yodo o para oxidar Hierro II a Hierro III. Así, la concentración de hidroperóxidos puede ser determinada mediante titulación con yodo o mediante espectrofotometría (Lea, 1952; Stine y col., 1954) obteniéndose el VP como miliequivalentes (mEq) de peróxido por kg de grasa extraída del pescado.

Por ejemplo, el método espectrofotométrico puede arrojar valores 1,5-2 veces mayores que el método de titulación con yodo (Barthel y Grosch, 1974).

Debido a algunas razones, la interpretación del VP como un índice de la calidad no proporciona un resultado directo. Primero: los hidroperóxidos carecen de olor y sabor, de esta forma el VP no está relacionado con la calidad sensorial del producto analizado. Sin

embargo, el valor de peróxido puede indicar una formación posterior de compuestos sensorialmente objetables (Melton, 1983). Segundo: los hidroperóxidos se descomponen con el tiempo. Un VP bajo puede indicar tanto una fase temprana de autoxidación como una fase tardía, o también un producto severamente oxidado donde la mayoría de los hidroperóxidos han sido degradados, por ejemplo en pescado seco salado (Smith y col., 1990).

Asumiendo que el VP no ha disminuído debido a un extenso almacenaje o exposición a altas temperaturas, su valor (por titulación iodométrica) no debiera ser superior a 10-20 mEq/kg de grasa de pescado (Connell, 1975).

Durante los estados posteriores de la oxidación generalmente están presentes los *productos secundarios de la oxidación* y, por lo tanto, indican una historia de oxidación (Huss, 1998). Estos productos comprenden aldehídos, cetonas, ácidos grasos de cadena corta y otros; muchos de los cuales tienen olores y sabores desagradables, que combinados producen el carácter "a pescado rancio" asociado con los lípidos oxidados del pescado. Algunos de los productos secundarios de la oxidación entre los cuales se pueden citar al malonaldehído y otros compuestos como los *alcanales y alcadienales*, reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, formando un complejo de coloración rojiza que puede ser determinado mediante espectrofotometría a 532 nm. A pesar de que este complejo es el producto de condensación del ácido tiobarbitúrico con una sustancia específica, el dialdehído malónico, este ensayo se correlaciona bien con el grado de rancidez, y al utilizar este principio, pueden considerarse como las *sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico.* El análisis de estas sustancias se lleva a cabo mediante el test del Indice de TBA (Olafsdottir y col., 1997). Este test es el más ampliamente utilizado para medir el deterioro oxidativo de los lípidos en alimentos musculares (Gray, 1978; Rhee, 1978).

Existen tres formas por las cuales se puede desarrollar el Indice de TBA. La primera es directamente sobre el producto alimenticio (Sinnhuber y Yu, 1958). Una segunda en la cual se trabaja sobre el extracto del alimento, proceso que incluye filtración (Vyncke, 1975). La tercera consiste en una destilación del producto (Ke y Woyewoda 1979).

Los resultados son expresados en función del patrón dialdehído empleado (malonaldehído) y reportados como µmol de malonaldehído presente en relación a la cantidad de tejido analizado.

Para una evaluación de calidad, valores del índice de TBA menores de 8 μmol por kg de pescado indican ausencia de rancidez. Valores entre 9 y 20 μmol por kg de pescado, son indicadores de rancidez pero el producto es aceptable. Mientras que valores superiores a 21 μmol por kg de pescado, son considerados como rancios e inaceptables (Ke y col., 1984).

Algunos autores han demostrado que el valor del índice de TBA se correlaciona con la calidad sensorial (Hoyland y Taylor, 1991; Raharjo y col., 1993). Sin embargo otros investigadores no encontraron dicha correlación (Boyd y col., 1993). De este modo, es necesaria cierta precaución en la interpretación de los valores del índice de TBA.

Otro método para el seguimiento del deterioro oxidativo de los alimentos, es la determinación colorimétrica del total de compuestos carbonilos, total de compuestos monocarbonilos o clases de compuestos monocarbonilos (Melton, 1983).

La medición de productos fluorescentes ha sido utilizada satisfactoriamente como un método análitico para la cuantificación de productos de oxidación en tejidos biológicos. Es posible utilizar la determinación de compuestos fluorescentes para analizar la oxidación lipídica en alimentos, particularmente durante el almacenaje.

Los métodos instrumentales modernos permiten una mayor definición en el análisis de todos los productos de oxidación. Pero para las estimaciones de la calidad general, se prefieren métodos que permitan determinar un amplio rango de productos de oxidación (como el VP y el Indice de TBA), a pesar de que estos métodos tienen limitaciones según lo discutido anteriormente.

El análisis de los compuestos volátiles, productos de la oxidación que se encuentran en interfase sobre la superficie del producto, proporcionan resultados que se correlacionan muy bien con la evaluación sensorial. Mediante el uso de cromatografía gaseosa, se ha podido identificar y medir tres compuestos volátiles de los alimentos, que fueron: pentanal, hexanal y el 2,4 decadienal (Melton, 1983).