1. Material biológico

En este estudio se emplearon ejemplares de merluza negra en su forma H&G. Esta especie fue capturada en la zona "Atlántico Sudoeste – Zona FAO Nº 41"(SENASA, 2001) y dentro de la denominada zona económica exclusiva de la República Argentina. Esta última zona se muestra en la Figura 2. Para ello se contó con la colaboración de la empresa Ibermar, propietaria del buque pesquero "Verdel", con asiento en el Puerto de Ingeniero White (Bahía Blanca), habiéndose empleando como arte de pesca redes de arrastre de fondo. La captura se realizó durante los meses de Febrero y Marzo, a una profundidad entre 500 y 1500 metros. Todo el procesamiento del pescado fue hecho a bordo.

Para la experiencia se seleccionaron ejemplares juveniles (55-70 cm de largo), los cuales fueron inmediatamente descabezados, eviscerados y lavados con agua de mar, habiendo rendido porciones H&G con un peso entre 800 y 1000 gramos y una longitud entre 30 y 40 cm. Posteriormente las porciones se congelaron a –30°C en túneles simples, luego se glasearon, se envolvieron individualmente con polietileno y se dispusieron en cajas de cartón, las que se colocaron en bodega a una temperatura comprendida entre –22 y –25°C hasta el arribo del barco al Puerto de Ingeniero White - Bahía Blanca. Inmediatamente después de su arribo las muestras fueron trasladadas hasta el Laboratorio de Radioisótopos de la Universidad Nacional del Sur, donde se almacenaron a una temperatura de –18°C, antes y después del tratamiento de irradiación.

2. Proceso de irradiación

2.1. Planta de irradiación

El tratamiento de irradiación se realizó en la Planta de Irradiación Semi-Industrial (PISI) del Centro Atómico de Ezeiza (CAE), perteneciente a la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Dicha planta (Figura 11) consiste en un recinto blindado de paredes de hormigón común y, en algunos sectores, de hormigón pesado (3,5 kg/dm^3) de 1,80 m de espesor. El acceso al recinto se efectúa a través de pasadizos en laberinto con secciones de paso de 4 m^2, lo que permite la introducción de muestras de gran tamaño.

La planta de irradiación contiene una fuente de ^{60}Co, cuyo diseño corresponde al llamado "tipo parrilla" (Figura 12). La instalación está proyectada para contener una actividad de hasta 1.000.000 de Ci de ^{60}Co.

El blindaje biológico de la fuente es agua. La cual está contenida en una pileta de acero inoxidable con estructura de hormigón, excavada en el piso.

El material a irradiar puede introducirse al cuarto de irradiación de dos maneras: en forma manual, estando la fuente bajo agua, o bien por medio de un sistema mecánico de transportadores. La dosis que debe recibir el producto y la velocidad de dosis de la fuente determinan el tiempo de permanencia del material frente a la misma.

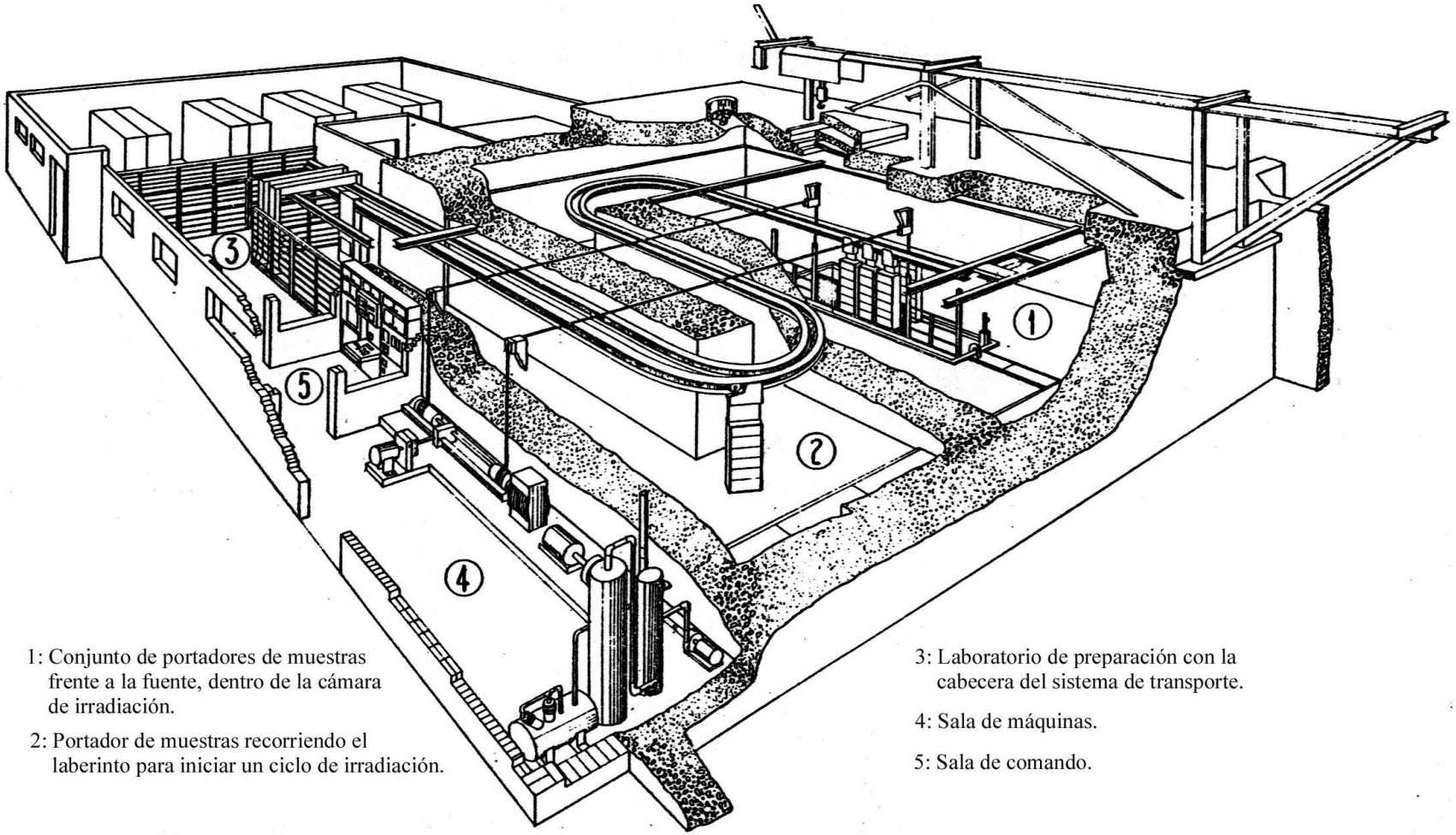

Figura 11. Distribución de los sectores más importantes de la Planta de Irradiación Semi-Industrial del Centro Atómico de Ezeiza.

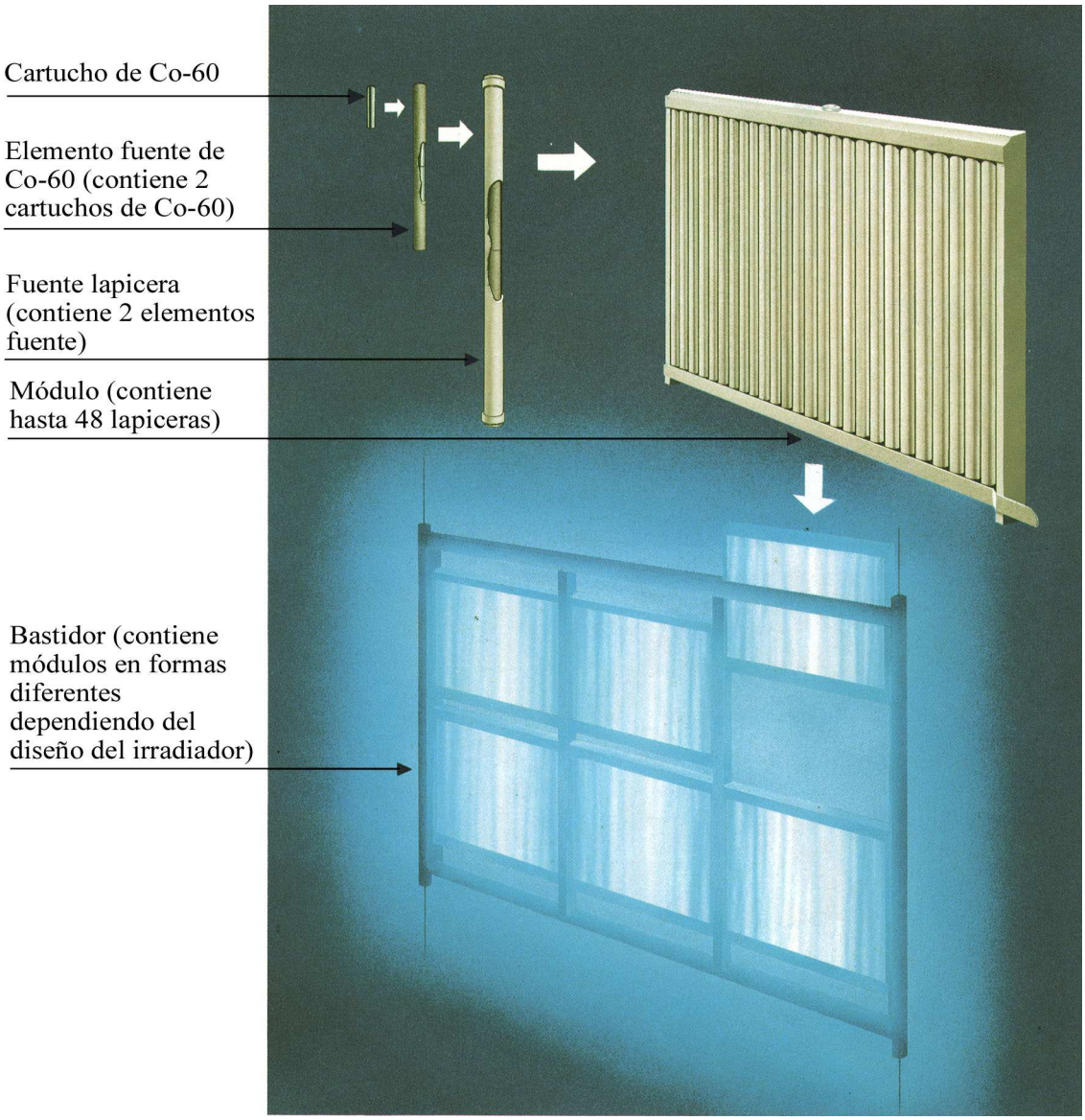

Figura 12. Fuente de ^{60}Co "tipo parrilla".

2.2. Irradiación de la porción H&G

Para el tratamiento de irradiación, realizado a los 30 días post-captura, las muestras se envasaron en polietileno y fueron colocadas en cajas de cartón de 30 x 30 x 20 cm acondicionadas con hielo seco. Luego se transportaron por vía terrestre hasta la Planta de Irradiación Semi-Industrial del Centro Atómico Ezeiza. El proceso de irradiación se llevó cabo en estado congelado y al aire, usando rayos gamma de ^{60}Co. Se aplicaron dosis de 1, 3 y 5 kGy, separándose muestras sin irradiar como control (0 kGy). La velocidad de dosis fue de 0.1534 kGy/minuto, determinada mediante dosimetría Fricke. Inmediatamente des-

pués del tratamiento las muestras se transportaron nuevamente al Laboratorio de Radioisótopos donde se almacenaron a –18ºC hasta el momento de las determinaciones (entre 0 y 293 días post-irradiación).

3. Determinación de rancidez oxidativa mediante los productos secundarios de oxidación lipídica (Indice de TBA)

La determinación de productos secundarios de oxidación lipídica se llevó a cabo por el método de destilación descripto por Ke y colaboradores (1984). Mediante esta técnica se determinan sustancias que reaccionan con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) formando un complejo de color rojo.

Para la técnica se utilizaron muestras de 10 g del músculo congelado las que se homogeneizaron, en un triturador IKA-Ultra Turrax T-25, en 35 mL de agua destilada por dos minutos. Luego, se adicionaron como antioxidantes 100 mg de propil galato (Sigma) y 100 mg de EDTA (Sigma), llegando a un peso total de 105 gramos. A esta mezcla se le agregaron 95 mL de HCL 4 M (Cicarelli). Posteriormente, la mezcla se sometió a destilación, haciendo uso de un equipo como se observa en la Figura 13. El equipo fue ajustado de manera tal que a los 35 minutos se recolectaron 50 mL de destilado.

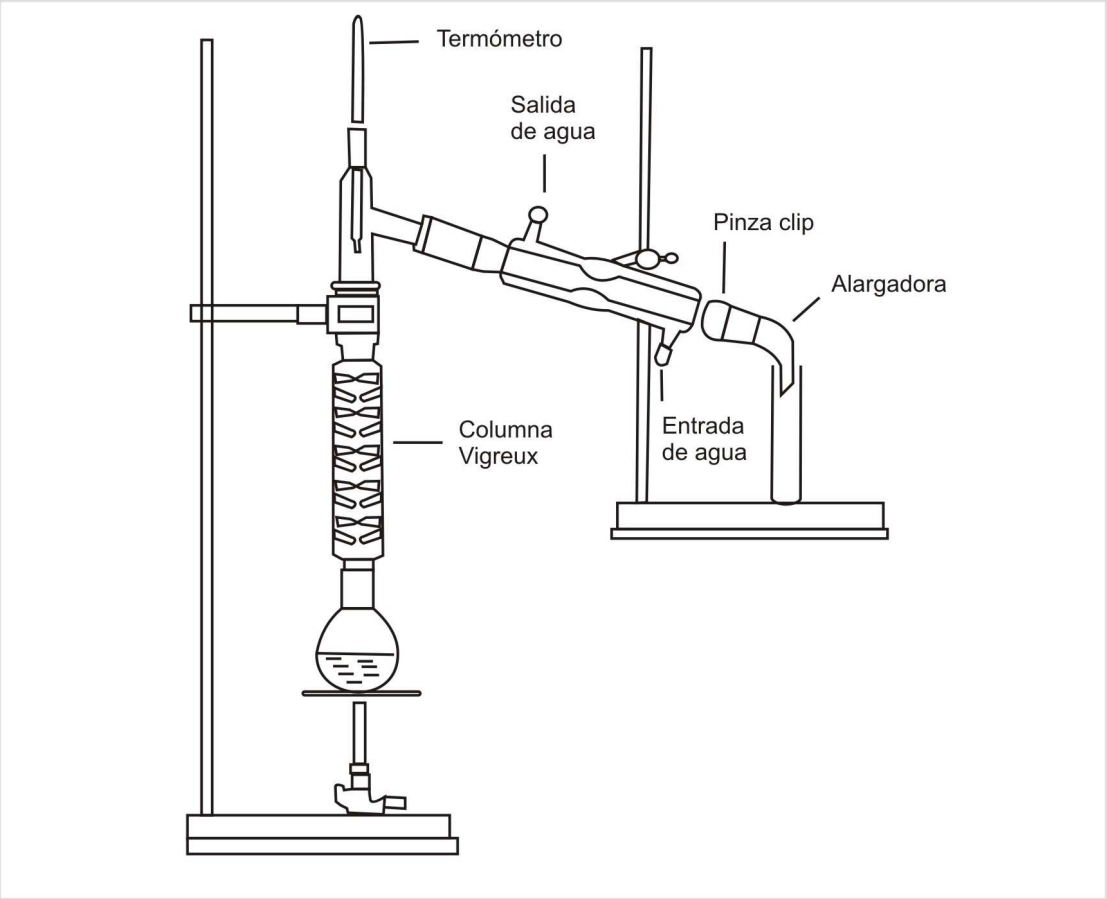

Figura 13: Equipo de destilación para determinación de productos secundarios de oxidación lipídica.

Para la preparación del reactivo de TBA se pesaron 1,44 g del ácido 2- tiobarbitúrico (Sigma) y se transfirieron a un balón de 500 mL. Se agregaron 50 mL de agua destilada y dos terceras partes del volumen de ácido acético glacial (Cicarelli). Luego se mantuvo bajo agitación magnética constante hasta completa disolución.

A 5 mL del destilado obtenido se agregaron 5 mL del reactivo de TBA y se los incubó en baño de agua por 60 minutos a 95ºC. Luego dicha mezcla se enfrió en baño de agua, y su absorbancia se midió en un espectrofotómetro Metrolab RC- 825 a una longitud de onda de 532 nm. Como estandard se utilizó una solución acuosa 1 x 10^{-5} M de 1.1.3.3 tetraetoxipropano (Sigma). El índice de TBA se expresó en µmoles de malondialdehído/kg de tejido (Ke y col., 1984).

4. Determinación de Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT)

Para la determinación de NBVT se empleó el procedimiento citado en el Reglamento Nº 2074/2005 (UE). El mismo se aplica a concentraciones de NBVT comprendidas entre 5mg/100g y 100mg/100g. .

Las bases nitrogenadas se extraen de la muestra mediante una solución de ácido perclórico a 0,6 M. Una vez alcalinizado, el extracto se somete a destilación al vapor y los componentes básicos volátiles se absorben mediante un receptor ácido. La concentración de NBVT se determina mediante titulación de las bases absorbidas.

Se trituraron cuidadosamente 10 g del músculo en un recipiente adecuado y se mezclaron con 90,0 mL de solución de ácido perclórico 0,6 M (Cicarelli). La mezla se homogeneizó durante dos minutos y posteriormente se filtró.

Cincuenta mililitros del filtrado se sometieron a destilación por arrastre de vapor de agua (Figura 14). Previamente se añadieron algunas gotas de fenolftaleína (1g/100ml de etanol 95%.), para comprobar que el extracto esté suficientemente alcalinizado. También se agregaron dos gotas del agente antiespumante de silicona y 6,5 ml de solución de hidróxido de sodio (20g/100ml) (Anedra).

La destilación se reguló de modo que se produjeron 100 mL de destilado en diez minutos. El destilado se recogió en 100 mL de solución de ácido bórico (3g/100ml) (Anedra). La valoración se realizó con una solución patrón de ácido clorhídrico 0,05 N (Cicarelli). El pH del punto final deberá ser 5,0 + 0,1.

Los resultados se expresaron en mg de N por 100 g de muestra.

Cálculo del NBVT

$$\text{NBVT: } \frac{(V_1 - V_0) \times 0{,}14 \times 2 \times 100}{M}$$

M: peso de la muestra en gramos.

V_1: volumen en mL de ácido clorhídrico 0,01 mol por muestra

V_0: volumen en mL de ácido clorhídrico 0,01 mol por muestra en blanco.

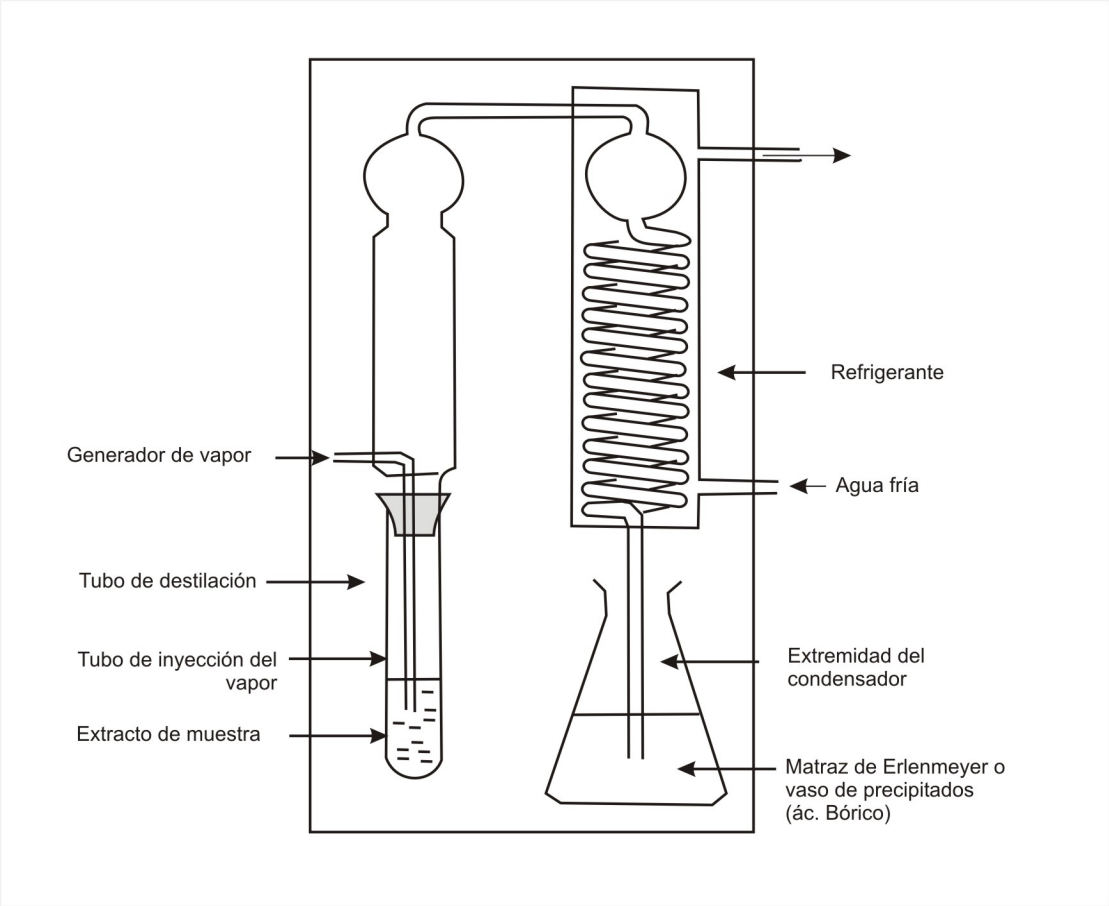

Figura 14: Equipo de destilación para determinación de NBVT.

5. Determinación de pH

Para la determinación de pH se utilizó la técnica recomendada por el SENASA siguiendo la Norma IRAM Nº 15.060 (1969). Para cada determinación se emplearon 10 gramos del músculo, el cual fue homogeneizado en 100 mL de agua destilada. Posteriormente, la mezcla permaneció durante una hora a temperatura ambiente, se filtró y se procedió a la medición del pH con un equipo digital Marca HANNA modelo 1131.

Antes de proceder a cada medición, se procedió a la calibración del equipo con soluciones buffer de pH 4,0 y 7,0 (Merck)

6. Análisis de compuestos lipídicos

6.1 Extracción de lípidos:

Los lípidos totales de la porción H&G de merluza negra fueron extraídos siguiendo el procedimiento descripto por Bligh y Dyer (1959). Para tal fin, 2 gramos de músculo, previamente descongelado, fueron homogeneizados con 9 mL de una mezcla de metanol:cloroformo (2:1, v/v) durante 2 min a 9500 rpm, haciendo uso de un homogeneizador IKA-Ultra Turrax T 25. Luego se agregaron 3 mL de cloroformo y 4 mL de agua -considerando que el tejido tiene um 70% de agua- para obtener finalmente una relación cloroformo:metanol:agua equivalente a 2:2:1.8. La mezcla fue homogeneizada una vez más y luego centrifugada durante 10 min a 2100 rpm. La fase inferior orgánica fue transferida con una pipeta a tubos de 30 mL y el residuo fue lavado dos veces con 3 mL de cloroformo. El solvente de la fase orgánica fue evaporado bajo nitrógeno, y el extracto lipídico así obtenido se colocó en viales y se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

6.2 Análisis de ácidos grasos:

Los ácidos grasos de lípidos totales fueron derivatizados a sus correspondientes metil-ésteres usando KOH al 10% en metanol.

La identificación y cuantificación de los mismos fue realizada por duplicado, usando un cromatógrafo gaseoso HP 4890 equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar SP-2560 (100 m x 0.25 mm x 0.2 µm). La temperatura de la columna fue programada a 140ºC durante 5 min y luego de 140ºC a 240ºC a 4ºC/min. La temperatura del inyector y del detector fue mantenida a 175ºC y 260ºC, respectivamente. El gas portador fue hidrógeno (18 cm/s) y la relación split usada fue 1:100. Los ácidos grasos fueron identificados comparando sus tiempos de retención con estándares y sus contenidos fueron calculados sobre la base de % en peso.

6.3 Cuantificación de triglicéridos:

El contenido de TG fue determinado a través de mediciones espectrofotométricas. Para su dosaje se tomaron alícuotas del extracto lipídico total, las que fueron secadas bajo corriente de nitrógeno y resuspendidas en isopropanol. Luego se agregó una lipasa fungal específica (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina) y se calentó la mezcla a 37ºC durante 5 minutos. Se produjo así la hidrólisis enzimática de los TG, liberándose glicerol. El color

rosado de la quinonimina fue medido a 505 nm con un espectrofotómetro Metrolab RC 325. El contenido de triglicéridos fue determinado mediante una curva estándar de glicerol.

6.4 Cuantificación de fosfolípidos:

Los FL totales fueron cuantificados a través de determinaciones colorimétricas de su contenido de fósforo de acuerdo con el método descripto por Rouser y col. (1970). Alícuotas del extracto lipídico total fueron incubadas en un bloque de aluminio a 180ºC, durante 2 horas, en presencia de ácido perclórico (70%, v/v). Mediante esta digestión, los FL fueron oxidados, liberándose fósforo inorgánico en forma de ortofosfato. Posteriormente se agregó molibdato de amonio (1.25%, p/v) y ácido ascórbico (5%, p/v) y la mezcla se incubó en agua hirviendo durante 5 minutos. Se forma así un complejo de color azul intenso cuya absorbancia fue medida a 800 nm con un espectrofotómetro Metrolab RC 325. El contenido de fósforo fue calculado mediante una curva estándar de KH_2PO_4.

7. Análisis estadístico

7.1 Rancidez oxidativa en las partes de la porción H&G congelada durante el almacenaje.

Para el estudio de la rancidez oxidativa de la porción H&G –unidad- en una primera experiencia (Figura 15), y en relación con las partes anterior, media y posterior (Figura 16) a lo largo del almacenaje congelado, se empleó un diseño de parcelas divididas (split-plot) con factor principal completamente aleatorizado (Zar, 1999). Dicho factor principal fue los días de almacenaje (6 fechas de muestreo) y el factor secundario, las tres subunidades mencionadas (tercio anterior, tercio medio y tercio posterior de cada unidad). En cada fecha de muestreo se contó con tres unidades experimentales (tres porciones H&G). Además una muestra adicional que mostraba un incorrecto proceso de eviscerado, se procesó a los 100 días de almacenaje en congelación.

El test de TBA se realizó sobre una muestra aleatoria de 10 gramos de tejido de cada subunidad, de manera que por cada fecha de muestreo se tomaron tres pescados con sus distintas partes, realizándose un total de nueve mediciones.

Los datos se analizaron por ANOVA doble, y las diferencias entre las medias fueron analizadas por el test de Fisher (α= 0,05).

Figura 15: Ejemplar H&G de merluza negra

Figura 16: Tercio anterior, medio y posterior de merluza negra.

7.2 Efecto de la radiación gamma sobre la rancidez oxidativa, las bases nitrogenadas totales y el pH, de la porción H&G congelada.

En una segunda experiencia, se seleccionaron la parte anterior y media de la porción H&G (Figura 17), las que fueron divididas en dos cada una. De esta manera por cada unidad (un pescado) se obtuvieron cuatro subunidades (Figura 18). El diseño de ensayo utilizado fue el de parcelas divididas (split-plot). El factor principal fueron los días de almacenaje en frío (total de 6 fechas), y el factor secundario fueron las dosis de irradiación utilizadas (0,1,3 y 5 kGy). En cada fecha de muestreo se contó con tres unidades experimentales (tres pescados).

Las determinaciones se realizaron sobre 10 gramos de tejido por cada subunidad, de manera que por cada fecha de muestreo se tomaron tres pescados con sus distintas partes, realizándose un total de doce determinaciones.

Los datos se analizaron por ANOVA doble, y las diferencias entre las medias fueron analizadas por el test de Fisher ($\alpha = 0,05$).

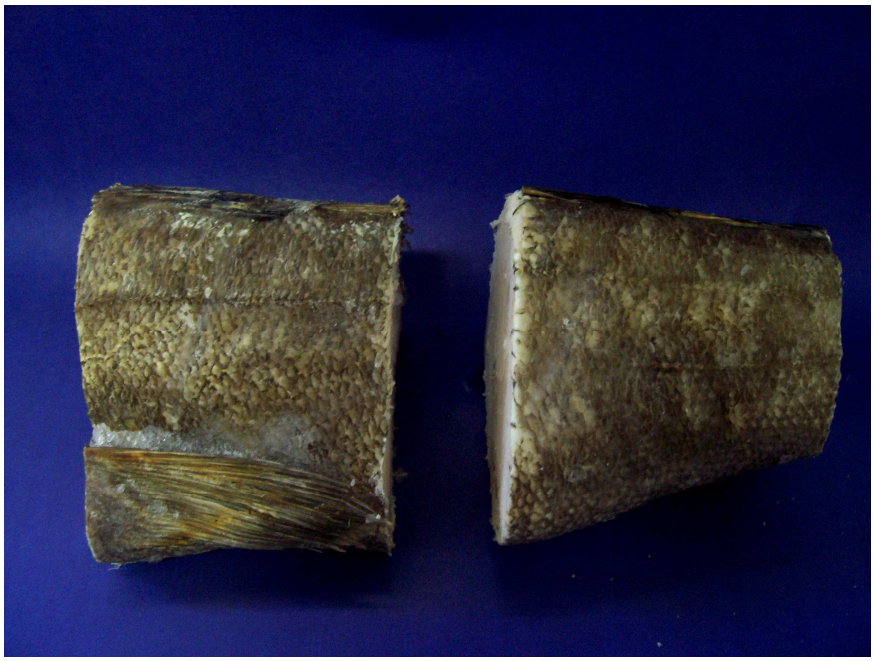

Figura 17: Partes anterior y media de merluza negra.

Figura 18: Subunidades de merluza negra.

7.3 Rancidez oxidativa de la porción H&G congelada e irradiada, durante el almacenaje en refrigeración.

Para el estudio se empleó un diseño de parcelas divididas con factor principal en bloques. Como factor principal se utilizó las dosis de irradiación (0, 1, 3 y 5 kGy) y como factor secundario las horas de almacenaje (cinco niveles) bajo refrigeración a 5ºC. La experiencia se realizó a los 20 días post-irradiación.

Para las unidades de diseño se tomaron ejemplares de merluza negra seleccionados al azar (tres pescados que actúan como bloques) y las unidades experimentales fueron las zonas de cada pescado asignadas al azar a cada dosis de irradiación. Las subunidades experimentales fueron las submuestras de cada zona del pescado asignadas al azar para cada muestreo.

Los datos se analizaron por ANOVA doble y se utilizó la prueba de Dunnett para comparar los tratamientos con su control. Tomando como control el muestreo realizado a las 24 horas bajo refrigeración.

7.4 Componentes lipídicos: efecto de la radiación gamma sobre ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos de la porción H&G congelada.

Para el estudio se trabajó con las partes anterior y media de la porción H&G (Figura 17). De esta manera por cada unidad se obtuvieron cuatro subunidades. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Para evaluar el efecto de las dosis de irradiación de 1 y 5 kGy tanto al inicio como al final de la experiencia (0 y 293 días), los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA doble). Las diferencias entre medias fueron analizadas por el test de Fisher ($\alpha = 0.05$).

8. Análisis Sensorial

Las características organolépticas se evaluaron mediante un panel constituído por siete miembros (docentes de la Universidad Nacional del Sur) cuyas edades oscilaron entre 30 y 50 años. En una primera etapa el entrenamiento de los panelistas fue necesario dado que la totalidad de los mismos no tenían conocimiento previo de la especie. Se trabajó con las muestras remanentes provenientes de la experiencia relatada en la sección 7.1, a diferentes tiempos durante el almacenaje prolongado, sobre muestras crudas y cocidas. Este análisis se acompañó con discusiones sobre las propiedades a ser evaluadas y sobre los grados y puntuaciones específicas.

Previo al análisis sensorial las muestras congeladas fueron descongeladas, dejándolas por 18 horas a temperatura de refrigeración (5ºC). Las muestras cocidas se obtuvieron colocándolas en recipientes plásticos tapados, sometiéndolas al tratamiento en un horno de microondas tipo familiar marca SMC, a potencia siete durante treinta segundos, alcanzando una temperatura interna superior a los 65ºC.

En las muestras crudas se evaluó el olor, mientras que en las cocidas se evaluaron olor y sabor.

Para este estudio sensorial se empleó una prueba descriptiva siguiendo el método de escala estructurada recomendada por la FAO (Huss, 1998). La misma proporciona al panelista una escala con diferentes grados de intensidad (Cuadro 1).

Grado				Puntuación
Aceptable	Ausencia de olo- res/sabores Objetables	**I**	Olor/sabor característico de la especie Muy fresco, algas marinas Pérdida de olor/sabor Neutral	10 9 8 7 6
	Ligeros olores y sabores objetables	**II**	Ligeros olores y sabores objeta- bles como a humedad/moho, ajo, pan/levadura, ácido, frutal, rancio	5 4
Límite de aceptación				
Rechazo	Severos olores y sabores objetables	**III**	Fuertes olores y sabores objeta- bles a col vieja, NH_3, H_2S o sulfuros	3 2 1

Cuadro 1: Método de escala estructurada (Huss, 1998).

El Grado I corresponde a la ausencia de olores y sabores objetables; el Grado II corresponde a la presencia de ligeros olores y sabores objetables y el Grado III a la aparición de severos olores y sabores objetables. Se considera que el producto es aceptable hasta el Grado II.

En una segunda etapa se trabajó sobre las muestras remanentes de la experiencia 7.2, tanto crudas como cocidas. La evaluación sensorial se realizó en muestras controles e irradiadas con 1, 3 y 5 kGy.