

22
2g



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LOS PARAMETROS DE CALIDAD
EN MOJARRA Y CAZON, DURANTE EL DETERIORO
EN ALMACENAMIENTO

T E S I S
M A N C O M U N A D A
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A N
GLADYS MA. PATIÑO HEREDIA
REBECA RODRIGUEZ MORENO



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Con especial cariño:

Con especial cariño:

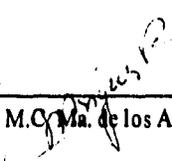
JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Federico Galdeano Bienzobas
Vocal: Prof. Josefina Viades Trejo
Secretario: Prof. Ma de los Angeles Valdivia
Primer suplente: Prof. Hilda Elizabeth Calderón V.
Segundo suplente: Prof. Ruth Villaseñor Gutiérrez

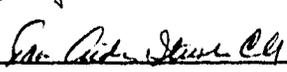
Sitio donde se desarrolló el tema:

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, Conjunto E.
Departamento de Alimentos y Biotecnología. Laboratorio 323.

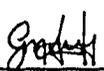
Asesor:


M.C. Ma. de los Angeles Valdivia López

Supervisor Técnico:


M.C. Fca. Aida Iturbe Chiñas

Sustentantes:


Gladys Ma. Patiño Heredia


Rebeca Rodríguez Moreno

AGRADECIMIENTOS

Con respeto y cariño a la *Universidad Nacional Autónoma de México* y en especial a la Facultad de Química por las experiencias y conocimientos adquiridos en nuestra formación académica. Orgullosas de pertenecer a ella.

A las M.C. Ma. de los Angeles Valdivia L. y M.C. Fca. Aída Iturbide Cifuentes por sus asesorías y estímulos en todas sus pláticas, para la culminación del presente trabajo.

Al QFB. Agustín Rey por su amistad, apoyo y enseñanzas brindadas durante nuestra estancia en el Laboratorio 323 del Edificio E, Facultad de Química.

A la M.B. Rebeca Ramírez por su gran ayuda brindada para la realización del presente trabajo.

En Memoria a Gerardo Flores quien tuvo una participación muy importante en la realización de este trabajo. Gracias por su tiempo y amistad.

A Sergio Camacho por su amistad y colaboración.

A mis Maestros por sus enseñanzas.

A mis amigos y compañeros por compartir experiencias nuevas.

Al jurado asignado por su tiempo y dedicación en la realización del presente trabajo.

Gladya y Rebeca

DEDICATORIAS

Con inmenso amor a mi Madre a quien
admiro por su gran fuerza e inspiración
en la vida.

Con inmenso amor a mi Padre, por su
gran ejemplo de lucha, esfuerzo y
paciencia.

A Sara, mi hermana y más que eso mi
amiga y confidente incondicional.
Te adoro.

A mis abuelos, en especial a mi abuelo
Pedro a quien agradezco por su apoyo.

A todos aquellos que de forma directa
o indirecta, contribuyeron en la realiza-
ción de este trabajo.

A mis familiares y amigos por su gran
ayuda.

Gladys

DEDICATORIAS

A mis PADRES por su cariño, consejos y apoyo, además del amor y comprensión que me han brindado en cada momento de mi vida.

A mis hermanas Jacqueline, Rosario y Susy por compartir mis alegrías y contar siempre con su apoyo incondicional.

A Fabián por su apoyo, cariño y amor que me brindó en todo momento, además de las experiencias buenas que compartimos juntos, gracias por estar siempre conmigo.

Al C.P. Antonio Rodríguez L. por su ayuda en cada etapa de mi vida.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS	3
HIPOTESIS.....	3
I. ANTECEDENTES.....	4
1.1 CARACTERÍSTICAS DEL CAZÓN Y LA MOJARRA	4
1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MÚSCULO DEL PESCADO	7
1.3 ESTRUCTURA MUSCULAR	12
1.4 FISIOLÓGIA DE LA CONTRACCIÓN	15
1.5 EFECTO DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS Y CAMBIOS POST-MORTEM	15
1.6 FENÓMENOS DE DESCOMPOSICIÓN	18
1.7 REFRIGERACIÓN	29
1.8 CONGELACIÓN	31
1.9 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL TIPO Y VELOCIDAD DE ALTERACIÓN	36
II. MATERIALES Y METODOS	40
* OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL PESCADO	40
2. MÉTODOS PARA DETERMINAR EL GRADO DE FRESCURA	41
2.1 ANÁLISIS FÍSICOS	41
2.1.1 DETERMINACIÓN DE PH.....	41
2.2 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS	41
2.2.1 DETERMINACIÓN DE VOLUMEN DE LIBERACIÓN DE EXTRACTO (VLE)	41
2.2.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE (PS)	42
2.2.3 DETERMINACIÓN DE HIPOXANTINA (HX)	43
2.2.4 DETERMINACIÓN DE BASES VOLÁTILES TOTALES (BVT).....	45
2.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.....	46
2.3.1 DETERMINACIÓN INDIRECTA DE CARGA MICROBIANA (TTZ).....	46
2.3.2 DETERMINACIÓN DIRECTA DE CARGA MICROBIANA: CUENTA ESTÁNDAR (CE).....	47
2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
2.5 ESTUDIO CINÉTICO.....	48
2.6 MÉTODO GENERAL.....	51
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.1 PH	52
3.2 BASES VOLÁTILES TOTALES (BVT).....	55
3.3 HIPOXANTINA (HX)	60
3.4 CRECIMIENTO MICROBIANO.....	65
Prueba de Trifenilteirazolio (TTZ) y Cuenta Estándar (CE).....	65
3.5 VOLUMEN DE LIBERACIÓN DE EXTRACTO (VLE) Y PROTEÍNA SOLUBLE (PS)	70
3.6 RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
3.7 ANÁLISIS Y RESULTADOS DEL GRADO DE DETERIORO	77
CAZÓN	77
MOJARRA	79
IV. CONCLUSIONES.....	82
V. BIBLIOGRAFIA.....	84
ANEXO I.....	88

INTRODUCCION

Una de las fuentes de alimentación fundamentales para la humanidad, es sin duda alguna la procedente del mar, así el pescado está considerado como una excelente fuente de proteínas, no solo por su abundancia en la carne sino por su alta calidad, la cual está determinada por un adecuado balance de aminoácidos y por una elevada digestibilidad. El alto valor nutritivo de las proteínas del pescado, no es la única razón que atrae al tecnólogo de alimentos, sino también sus propiedades funcionales durante la transformación del pescado. Los factores que pueden repercutir en la calidad son: métodos, equipos y condiciones de captura, manejo en barco, equipos de refrigeración y congelación, etc.

Desde el momento de la captura hasta que llega al consumidor, el producto pasa por una serie de etapas que determinan su calidad, es decir, el manejo durante éstas establecerá la intensidad con que se presentarán las alteraciones, ya sean microbiológicas, bioquímicas y/o químicas, dando como resultado final un producto de mala o buena calidad.

La pérdida de frescura del pescado, tiene lugar de forma más o menos inmediata tras la muerte del pez. Se produce a través de una serie de reacciones post-mortem que siguen una secuencia parecida en todas las especies. Las principales reacciones son las clasificadas como autolíticas debido a la acción de las enzimas propias del músculo y las provocadas por la actividad microbiológica y éstas se presentan en función de las condiciones que prevalezcan durante el almacenamiento. Todo esto se traduce en modificaciones sensoriales, así como en la acumulación de compuestos en el músculo de pescado que son susceptibles de ser detectados mediante técnicas de laboratorio.

Para evaluar el estado de deterioro que ha tenido lugar, se han desarrollado y puesto a punto técnicas analíticas basadas en la determinación cualitativa y/o cuantitativa de algunos compuestos finales de degradación. De este modo, en pocas horas se puede tener una idea aproximada del estado de frescura o de deterioro del pescado. En este sentido, es práctica corriente determinar los niveles de trimetilamina (TMA) del músculo, tanto en pescado fresco

como refrigerado y congelado: esta metodología ofrece una idea bastante aproximada del estado de frescura previo a la congelación. De manera similar las evaluaciones de pH, bases volátiles totales (BVT) e hipoxantina (Hx) ofrecen la posibilidad de conocer el estatus de calidad en los productos pesqueros. Sin embargo, se ha acumulado evidencia que indica que la concentración de estos compuestos varía significativamente en función de varios elementos, que van desde la especie de pescado, condiciones de manejo (temperatura, limpieza, etc.) hasta métodos de captura.

En el marco de estos antecedentes, en este trabajo se propone conocer la evolución del deterioro durante el almacenamiento en dos diferentes variedades biológicas de pescado de alto consumo en el país; Cazón (Elasmobranquio) y Mojarra (Teleosteo) en estado fresco, refrigerado a 5°C y congelado a -16°C. Esto con la finalidad de establecer parámetros rápidos de calidad que permitan evaluar de una manera rápida y precisa el estado actual del producto, de acuerdo a la especie.

OBJETIVOS

- * Conocer la evolución y establecer la cinética del deterioro bioquímico, químico y microbiológico en dos especies de pescado, Elasmobranquio y Teleosteo.
- * Definir parámetros rápidos de calidad durante el almacenamiento en refrigeración y congelación, para cada una de las especies bajo estudio.

HIPOTESIS

Debe existir una relación entre los diferentes parámetros químicos, bioquímicos y microbiológicos, para estimar la calidad bioquímica del pescado en función de la variedad biológica en diferentes condiciones de almacenamiento.

I. ANTECEDENTES

1.1 Características del Cazón y la Mojarra

Elasmobranquios

Cazón

El cazón pertenece a: (figura 1.1.1)

- | | |
|----------------------------|---|
| 1) Clase: elasmobranquio | 4) Género: carcharhinus |
| 2) Orden: squaliformes | 5) Especie: <i>galeorhinus galeus</i> . |
| 3) Familia: carcharhinidea | |

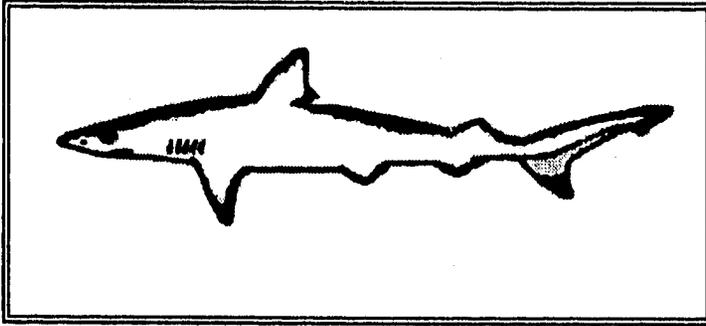


Fig. 1.1.1 Cazón

Estos peces constituyen un grupo muy numeroso de especies. Dos de sus principales características son: boca en posición ventral y articulación hioestilica en la mandíbula. El cuerpo está totalmente recubierto por denticulos dérmicos. Los dientes forman líneas de esbozos germinales que darán origen a nuevos dientes, por lo que se dice que los dientes de los elasmobranquios forman familias de reemplazo que aseguran la persistencia de una dentición funcional de por vida (Alvarado y Aguilar, 1983).

El esqueleto está constituido exclusivamente por cartilago. Las aletas pectorales se anclan sobre una cintura pectoral cartilaginosa, lo que produce un eje de sustentación rígido muy deseable con un batido rápido de la cola.

Los peces cartilaginosos carecen de vejiga natatoria y de opérculo, por lo que para respirar y modificar su nivel en el agua, requieren de estar en continuo desplazamiento; su flotabilidad está garantizada por la posesión de un hígado desmesuradamente grande y muy rico en aceite. (Minelli, 1983)

Los peces elasmobranquios como los tiburones y las rayas, son todos marinos casi sin excepción, por lo que mantienen concentraciones salinas en sus fluidos corporales de aproximadamente $1/3$ del agua del mar pero mantienen todavía equilibrio osmótico. Esto se consigue añadiendo a los líquidos corporales grandes cantidades de compuestos orgánicos, principalmente urea, la cual es un componente normal de todos los líquidos corporales y los tejidos, los cuales no pueden funcionar normalmente en ausencia de una concentración elevada de urea, ya que deben mantener una concentración tal que la presión osmótica total de su cuerpo sea igual o ligeramente superior a la del agua de mar. Además de la urea en la sangre de los elasmobranquios se encuentra el óxido de trimetilamina, que es un compuesto orgánico osmóticamente importante.

Aunque los elasmobranquios han resuelto el problema osmótico de la vida en el mar siendo isosmóticos, tienen todavía una amplia regulación iónica por lo que no necesitan beber, evitando de este modo la elevada captación de sodio asociada con la bebida de agua de mar. Por lo que la sangre de los elasmobranquios es ligeramente más concentrada que el agua de mar. Esto provoca una ligera entrada osmótica de agua a través de las branquias, debido a la mayor concentración presente en el interior del animal. De este modo, los elasmobranquios obtienen agua osmóticamente con lentitud y esta agua se utiliza para la formación de orina y para la secreción a partir de la glándula rectal (Nicol, 1970).

Teleosteos

Mojarra tilapia

La *mojarra tilapia* pertenece a: (figura 1.1.2)

1) Clase: teleosteo

2) Orden: perciforme

3) Familia: cichlidae

4) Género: sarotherodom

5) Especie: aureus

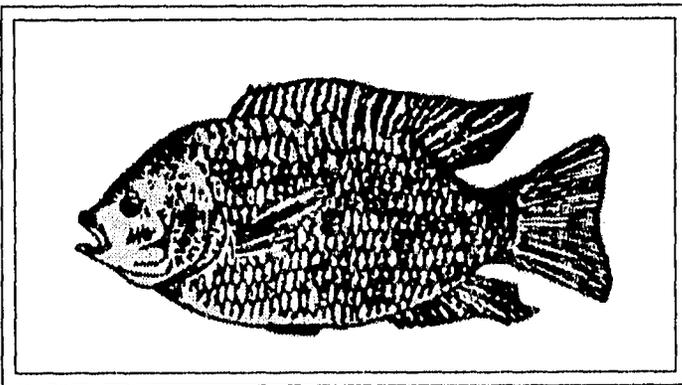


Fig. 1.1.2 Mojarra tilapia

Son el grupo de peces dominantes, que incluye la mayoría de las especies que el humano consume. Se caracterizan por presentar todo el esqueleto interno regularmente osificado, lo que se acompaña de un afinamiento máximo de las escamas dérmicas, que quedan reducidas exclusivamente a la capa interna de hueso laminar o isopedina.

Estas escamas presentan anillos o bandas periódicas de crecimiento que corresponden con las épocas de actividad e inactividad del pez. Para su respiración disponen de los opérculos (Alvarado y Aguilar, 1983).

Los peces teleósteos marinos son hiposmóticos y están en constante peligro de perder el agua del cuerpo frente al agua de mar más concentrada. Esto lo compensan a través de las branquias que tienen una doble función: la participación en la regulación osmótica y el intercambio de gases. La secreción de sales a través del epitelio de las branquias debe producirse mediante un transporte activo, ya que tiene lugar desde una concentración más baja en la sangre hasta una concentración más alta en el medio que los rodea.

Los peces teleósteos de agua dulce tienen concentraciones osmóticas mayores que las que se encuentran en el agua dulce que los rodea. El problema principal es la entrada osmótica de agua a través de las branquias, que son importantes por lo que respecta a esta entrada debido a su gran superficie y relativamente elevada permeabilidad. Las branquias son también ligeramente permeables a los iones, y ésta pérdida debe ser cubierta también por la captación de iones. Algunos solutos son captados con el alimento, pero la principal ingestión es mediante el transporte activo en las branquias. (Nicol, 1970)

1.2 Composición química del músculo del pescado

El agua es el componente más abundante del músculo (60-85%). En pescados grasos su contenido está en relación inversa con el de los lípidos, así mientras la proporción de agua en pescados magros es del 79%, en pescados grasos se sitúa en torno al 70%. Al ser el constituyente más abundante, contribuye en gran manera a las cualidades propias y deseables del pescado, es causa de su naturaleza perecedera, gobierna las velocidades de muchas reacciones químicas y es el origen de los efectos secundarios en algunos procesos de conservación como es la congelación (Borderías et al, 1987).

El pescado está considerado como una excelente fuente de proteínas, no solo por la abundancia de éstas en la carne, sino también por su alta calidad, la cual está determinada por un adecuado balance de aminoácidos y por una elevada digestibilidad, especialmente rica en algunos aminoácidos indispensables como la metionina y la lisina.

La cantidad de proteína en la carne varía de acuerdo a los hábitos alimenticios del pez, la edad, el sexo y la disponibilidad de alimentos.

Los niveles de proteínas en el músculo del pescado se sitúan entre el 15-20%, clasificándose en función de su solubilidad, en soluciones salinas de distintas fuerzas iónicas en tres grandes grupos:

Proteínas sarcoplasmáticas

Su interés reside en que gobiernan la bioquímica post-mortem contribuyendo en cierto modo al sabor, olor, procesos autolíticos, desarrollo microbiano, etc.

Su importancia respecto a la calidad del pescado es mayor durante la refrigeración, ya que son muy estables en congelación.

A este grupo pertenecen: albúminas, mioalbúminas, mioglobulina X, mioproteínas y miostroninas, que son solubles en soluciones de fuerza iónica menor de 0.3μ , suponen del 20-25% de las proteínas del músculo y comprenden a la mayoría de las enzimas.

Proteínas estructurales

La gran importancia que tienen estas proteínas sobre la calidad del pescado se pone de manifiesto teniendo en cuenta que a través de sus propiedades funcionales gobiernan en mayor o menor medida factores tan importantes como textura, viscosidad, propiedades emulsificantes y capacidad de retención de agua. De hecho los cambios de textura que aparecen en el pescado congelado están íntimamente relacionados con las alteraciones de las proteínas estructurales.

Las más importantes son: miosina, actina y en menor proporción la tropomiosina, troponina y miofibrilina, solubles en soluciones de fuerza iónica mayor o igual a 0.3μ , representan entre el 65 y 75% de la proteína muscular. De ellas la miosina es la que sufre mayores alteraciones durante la conservación al estado congelado (Borderías *et al.*, 1987).

La miosina forma los filamentos gruesos en los sarcómeros, posee la actividad de la ATPasa en la estructura de meromiosina pesada, la cual transfiere la energía química del ATP durante las contracciones del músculo. La molécula de la miosina es larga, compuesta de dos cadenas pesadas de polipéptidos en una conformación helicoidal, cada cadena incluye la meromiosina ligera y la meromiosina pesada. Se cree que las características y propiedades de la miosina, están fuertemente relacionadas a los grupos -SH que posee. Sus propiedades como extractabilidad, sensibilidad a la digestión proteolítica y la actividad de la ATPasa varía de acuerdo a su fuente.

La actina es la proteína más abundante en las unidades contráctiles. Forma los filamentos delgados de actina F, donde la actina globular (G-actina) está ordenada en un doble-hélice interaccionando con las proteínas de regulación: la tropomiosina y la troponina. La actina es relativamente estable durante el almacenamiento en congelación comparada con la miosina (Soliman y Shenouda, 1980).

Proteínas insolubles o del estroma

Influyen en la calidad del pescado, ya que intervienen de manera fundamental en el fenómeno del resquebrajamiento.

Son insolubles en soluciones salinas, suponen del 1 al 3% de las proteínas del músculo y están presentes sobre todo en el tejido conectivo, constituido principalmente por el colágeno y la elastina.

De acuerdo al contenido de lípidos, los pescados se agrupan en:

- Magros (hasta el 3%)
- Semigrasos (del 2 al 6%)
- Grasos (del 6 al 25%)

Las variaciones de éstos son tanto cuantitativas como cualitativas, dependiendo de factores tales como: especie, edad, sexo, estado fisiológico del pez, factores climatológicos, etc.

Los lípidos del pescado se componen de fosfolípidos y triglicéridos, que influyen en la calidad del pescado. Es importante señalar que los ácidos grasos poliinsaturados, predominan en la composición de los triglicéridos. Lo que los hace susceptibles a su autooxidación originando olores y sabores desagradables (rancidez), cuyo grado y velocidad están determinados por la presencia de ciertos catalizadores, de la actividad de agua, del proceso tecnológico aplicado, entre otros. El deterioro de los lípidos supone una pérdida de calidad en el pescado, además de que algunos productos al interaccionar con las proteínas ocasionan cambios indeseables en las propiedades funcionales y nutricionales debido a las reacciones de entrecruzamiento con proteínas mediadas por radicales libres. Esto provoca una reducción de la solubilidad y la digestibilidad, con la consiguiente disminución de la vida útil y valor comercial.

Los compuestos nitrogenados no proteicos (CNNP) son los responsables del sabor característico de la especie, el nitrógeno no proteico del músculo está constituido por compuestos tales como: aminoácidos, dipéptidos, derivados de la guanidina, bases nitrogenadas, urea, nucleótidos, etc.

Los CNNP son causa de muchas de las propiedades de la carne de pescado, su importancia radica básicamente en las siguientes consideraciones:

a) Proporcionan olores y sabores característicos:

Algunos CNNP son además volátiles, lo que los convierte en responsables de ciertos sabores y olores típicos del pescado.

b) Facilitan la descomposición del pescado:

Al ser compuestos pequeños, solubles en agua, los CNNP se convierten en un sustrato muy adecuado para que se inicien los ataques bacterianos y las reacciones deteriorantes del pescado.

c) Sirven como índice de frescura de la carne:

Muchas de las reacciones deteriorantes de la carne se inician a partir de estas sustancias, la determinación química de algunos CNNP han permitido realizar mediciones objetivas del grado de frescura del pescado.

Un compuesto interesante, desde el punto de vista de la calidad, es el óxido de trimetilamina (OTMA), que existe en la mayoría de los pescados de agua de mar (40%) y en menor medida o está ausente en los de agua dulce en relación al nitrógeno total. Dentro de los marinos, su presencia es más acusada en los elasmobranchios que en los teleosteos (15%).

Los carbohidratos están presentes en el pescado en pequeñas cantidades, siendo el más importante el glucógeno. Su nivel depende de las características propias del pez y de las condiciones de captura, ya que la lucha agota las reservas de glucógeno. Su gran influencia en la calidad, radica en que al transformarse en ácido láctico, condiciona la instauración y extensión del rigor mortis, así como el pH final del músculo con lo que ello supone para el desarrollo de los microorganismos y la textura.

Por otro lado se tiene carbohidratos asociados a los ácidos nucleicos especialmente la ribosa, que adquieren importancia durante el proceso de cocción en el desarrollo de sabores y olores característicos debido esencialmente a reacciones de Maillard.

Entre los microcomponentes, las vitaminas juegan un papel importante en las pesquerías. Las vitaminas liposolubles más importantes del pescado están: A, D, E, K y entre las hidrosolubles B₁, B₂, B₆, B₁₂ y vitamina C.

La mayor importancia de las vitaminas reside en que algunas de ellas tienen una marcada actividad antioxidante, como es el caso de las vitaminas E y C que se traduce en un efecto protector sobre los lípidos retardando la autooxidación. Esto es de particular importancia en los periodos prolongados de almacenamiento en congelación, considerando que en los lípidos de pesquerías predominan los ácidos grasos poliinsaturados.

Los elementos minerales como el sodio, potasio, calcio y fósforo juegan un papel importante en la fisiología celular, varían de acuerdo al estado fisiológico del pez. Su interés desde el punto de vista de la calidad, reside en el papel catalítico que tienen algunos iones metálicos (Fe, Co, Zn, etc.), los cuales pueden actuar acelerando los procesos autooxidativos de los lípidos al reducir el periodo de inducción y aumentar la velocidad de oxidación (Borderías *et al.*, 1987).

1.3 Estructura Muscular

El músculo representa el material comestible mayoritario en el pescado, y de su estructura dependen muchas de las propiedades del producto, especialmente las relacionadas con la textura de la carne.

Aunque no se suele llamar "carne" al músculo del pescado y se deja este término para denominar al músculo esquelético de otros animales comestibles, no existe ninguna razón de carácter físico o bioquímico que justifique esta diferenciación. El hecho de que el músculo del pescado no se considere "carne" obedece en primer lugar, a costumbres populares, y en segundo, a razones legales, pues el Codex Alimentarius solo reconoce como carne al producto obtenido de ciertos mamíferos domésticos, para los que existen métodos de crianza y sacrificio bien establecidos (FAO/OMS, 1976), (Macouzet y Rodríguez, 1993).

La parte comestible del pescado, que se sitúa entre 35-65% del peso total, según la edad, sexo, especie, etc., está constituida fundamentalmente por dos tipos de músculos:

- El músculo blanco que se extiende simétricamente de una parte a otra de la columna vertebral y forma la gran masa del cuerpo.
- El músculo rojo, situado en general a lo largo de la línea lateral bajo la piel y que en pescado grasos adquiere proporciones importantes (10%).

Estos músculos presentan distinta composición, así el músculo rojo tiene mayor contenido en hemoglobina, lípidos, óxido de trimetilamina y de algunas vitaminas, mientras que el blanco presenta mayor contenido en proteínas, agua, etc. Estas diferencias en la composición, se traducen en la susceptibilidad del pescado a experimentar determinadas alteraciones (rancidez, formación de trimetilamina, dimetilamina, entre otros), que se reflejan en la calidad del producto final (Borderías *et al.*, 1987).

El músculo de los peces tiene también fibras conocidas como *fásicas* (blancas) y fibras *tónicas* (rojas). La natación basal o de crucero es ejecutada enteramente por el músculo rojo, mientras que la gran masa de músculo blanco (tipo fásico) constituye una reserva de potencia para cortos despliegues de actividad a alta velocidad.

Los músculos natatorios de los tiburones están también divididos en tipos similares, con menos del 20% de la masa muscular constituida de fibras tónicas, las cuales son para la natación de crucero y las fibras fásicas se utilizan durante la natación intensa, como la utilizada en la persecución de las presas (Nicol, 1970).

La figura 1.3 ilustra la organización del músculo esquelético del pescado, mostrando que todos están formados de numerosas fibras, que a su vez cada una está formada por subunidades más pequeñas. El músculo [A] se encuentra formado por una serie de bandas musculares [B] las cuales son un conjunto de fibrillas denominadas fibras musculares [C]. Cada fibra muscular contiene varios centenares o millares de miofibrillas [D]. Cada miofibrilla tiene varios sarcómeros formados por miofilamentos [E], que a su vez contiene unos 1,500 filamentos de actina F [K], que son moléculas de proteína polimerizadas a las cuales corresponde la contracción muscular. La estructura molecular de los miofilamentos muestran dos fibras una de actina [F] y la otra de miosina [L], éstas a su vez poseen estructuras más pequeñas como la molécula de G actina [J] y la molécula de miosina [M], que puede separarse en meromiosina ligera y meromiosina pesada [N]. Las letras [F, G, H, I] son los cortes transversales de los niveles indicados (Guyton, 1989).

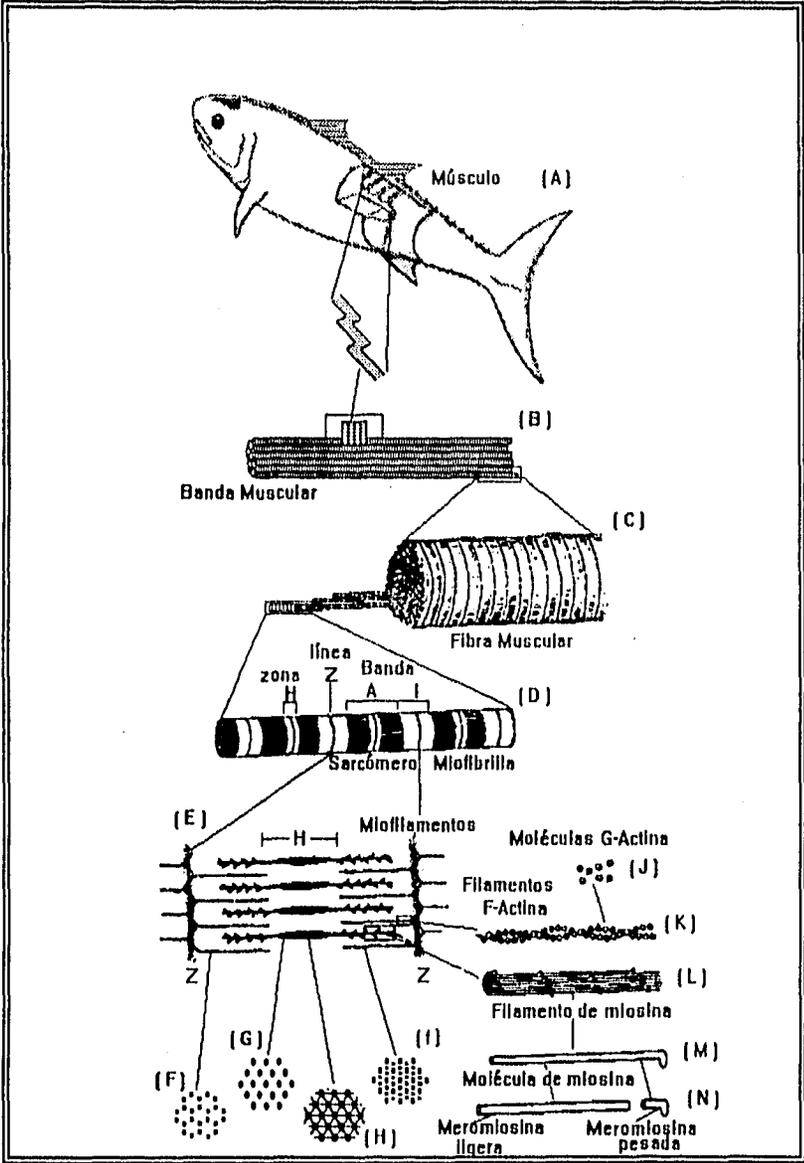


Fig. 1.3 Organización del músculo esquelético, desde el nivel macroscópico molecular.

1.4 Fisiología de la contracción

Se denomina contracción muscular al fenómeno que se origina de una serie de eventos eléctricos, químicos y mecánicos que se generan en la fibra muscular y que producen un acortamiento del músculo, debido al deslizamiento de proteínas miofibrilares (las moléculas de miosina entre las de actina), con la liberación de iones Ca^{2+} almacenados en unas cisternas en el retículo sarcoplásmico. Este fenómeno culmina con la relajación muscular, cuando vuelven las proteínas miofibrilares a su posición original, los iones Ca^{2+} son capturados y regresados a sus cisternas mediante un transporte activo.

1.5 Efecto de las reacciones enzimáticas y cambios post-mortem

Se distinguen tres etapas post-mortem:

- * **Pre-rigor:** La textura de la carne permanece suave y elástica. La escasez de oxígeno que se había generado durante la agonía del pescado, se vuelve permanente después de su muerte, al dejar de funcionar el sistema circulatorio. Sin embargo, aquellas reacciones metabólicas que no dependen directamente de la captación de oxígeno se siguen llevando a cabo. La alternativa es la conversión de glucógeno a piruvato a través de la glucólisis (vía Emden-Meyerhoff), con el fin de producir ATP. La glucólisis anaerobia conlleva a una oxidación incompleta de los sustratos y a la acumulación de lactato. La declinación del pH se debe a la acumulación de lactato, su producción es directamente proporcional a la síntesis de ATP, que es dependiente principalmente de la reserva de glucógeno y por lo tanto, de la hidrólisis del mismo.

- * **Rigor-mortis:** La carne se torna totalmente rígida. En cuanto se reduce la concentración de ATP cesan las funciones de la membrana, con una consecuente permeabilidad a los iones y la despolarización de la misma. Al despolarizarse, se liberan los iones calcio que se encontraban retenidos en las cisternas del retículo sarcoplásmico, se distribuyen en el citoplasma y al asociarse con el filamento de actina inducen un cambio conformacional

que atrae a las cabezas de miosina. El contacto de estas dos proteínas activa la ATP-asa y se genera la contracción muscular. En este momento el pescado se torna totalmente rígido, por lo que se dice que se encuentra en etapa de rigor mortis o de rigidez cadavérica.

Después de la muerte del pescado, todas las estructuras y todos los componentes de los cuales están compuestos los tejidos, están sujetos a degradación fisiológica y química dependiendo de su estabilidad. Sin embargo, otro evento importante ocurre durante el almacenamiento post-mortem cuya velocidad depende fuertemente de las condiciones de temperatura. Se presenta una contracción del músculo la cual corresponde a un enlace fuerte entre la miosina y la actina F, debido a la liberación de calcio y ATP en el espacio intracelular, este proceso llamado "rigor mortis" tiene varias consecuencias:

- * La contracción de la actomiosina del músculo es dependiente de ATP, involucra degradación de compuestos fosforilados tal como creatina-P, glucosa 6-P y fructosa-1,6-di-P, las dos últimas son principalmente producidas por degradación del glucógeno. La creatina-P y el glucógeno son agotados consecutivamente (Misima *et al.*, 1990; Hwang *et al.*, 1991). El consumo de nucleótidos implica acumulación de hipoxantina (Hx), producto de su catabolismo, el cual se utiliza como uno de los índices de frescura del pescado. Es importante hacer notar que disminuye la concentración de glucógeno y la de ATP cuando la concentración de oxígeno es baja.
- * El producto final de la glucólisis es el lactato, que se acumula en el músculo y además induce a la disminución del pH. Esta caída del pH es sin embargo menos importante en pescados que en mamíferos, el pH final raramente es más bajo que 6.
- * El rompimiento de la membrana celular y del retículo sarcoplásmico también ocurre, facilitando la liberación de calcio y la degradación enzimática.
- * Una de las causas que impide la relajación muscular es la presencia de iones Ca^{2+} en el citoplasma celular (figura 1.5), esta misma dispersión de iones Ca^{2+} es la que induce la

culminación del rigor mortis, mediante la activación de una proteasa neutra, la actividad de esta enzima es directamente sobre la línea "Z" de las miofibrillas.

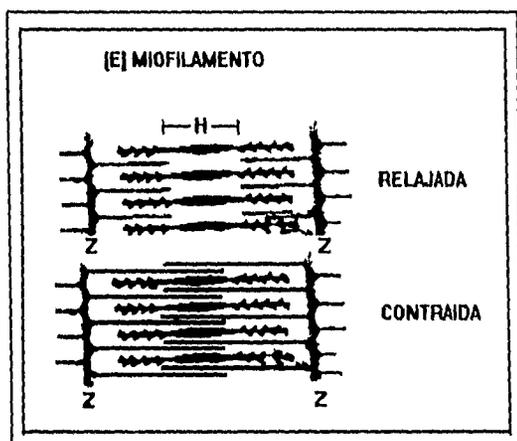


Fig. 1.5 Estados relajado y contraído de un miofilamento
[E], Banda [H] y líneas Z (Guyton, 1989).

- * El proceso degradativo está basado principalmente en diferentes proteasas clasificadas como: ácidas (catepsinas), neutras (dependientes de calcio, factor activador de calcio y calcio no dependiente) y básicas. Las actividades de estas proteasas parecen cambiar durante el almacenamiento post-mortem (Manikodan *et al.*, 1979, 1984, 1985; Tsuchiya y Seki, 1991); al mismo tiempo las proteínas tienden a ser más solubles y menos estables.
- * Otros cambios resultan en procesos degradativos físicos y químicos (oxidación, catabolismo). El color de la carne palidece, tiende a ablandarse y la capacidad de retención de agua de la carne se incrementa, sin embargo, algunas características de textura tales como: el rompimiento de la firmeza podrían ser relacionados al tiempo de almacenamiento post-mortem de la carne (Fauconneau *et al.*, 1995).

* **Post-rigor:** La dispersión de los iones calcio induce la culminación del rigor mortis, mediante la activación de una proteasa neutra activada por calcio que actúa directamente sobre la línea "Z" de las miofibrillas, que son sitios de anclaje de los miofilamentos y delimitan las unidades sarcoméricas, son separadas de otra unidad contráctil debido a la desintegración de la línea "Z". Además de la acción del Ca^{2+} como cofactor de la proteasa neutra, se ha demostrado que por sí mismo tiene una acción debilitadora de la banda "Z". Adicionalmente a lo anterior, se ha observado que de alguna manera induce una reducción en la afinidad entre la actina y la miosina, por lo tanto un debilitamiento de su interacción (Hattori y Takahashi, 1982). Como consecuencia del agotamiento de ATP en la célula, las membranas lisosomales se ven debilitadas y se fracturan fácilmente liberando a las proteasas (catepsinas) que contienen. Las catepsinas liberadas actúan entonces sobre las proteínas miofibrilares causando su hidrólisis (Macouzet y Rodríguez, 1993).

1.6 Fenómenos de descomposición

En el pescado, el paso del estado fresco al de alteración y su subsiguiente inutilización para el consumo es un cambio gradual, por lo que es difícil decidir cuando aparece el primer síntoma de deterioro. En búsqueda de un sistema práctico para determinar la calidad del pescado; muchos investigadores son partidarios de utilizar un método basado en la producción de trimetilamina en los pescados procedentes del mar. Otros se declaran partidarios de la utilización de otras pruebas químicas, tales como la determinación de ácidos o bases volátiles, determinación del pH, del contenido en ácido sulfhídrico, amoníaco, etc., ya que las pruebas bacteriológicas son demasiado lentas para poder tomar decisiones rápidas.

Reay y Shewan (1949), describen la serie de modificaciones fácilmente identificables que el pescado va sufriendo a medida que se altera, hasta convertirse finalmente en un producto pútrido. Su característico aspecto brillante palidece y adquiere color pardo, amarillo o aspecto sucio. La capa viscosa de la superficie aumenta, especialmente en las aletas y agallas. Los ojos van hundiéndose y arrugándose de un modo gradual, la pupila se enturbia y la córnea se hace

opaca. Las agallas adquieren primero color rosa pálido y finalmente amarillo grisáceo, los músculos se ablandan, exudan jugo al oprimirlos y se hunden fácilmente con los dedos; la espina dorsal puede separarse del músculo con facilidad y en sus proximidades, sobre todo cerca de la cola, se desarrolla una coloración pardo-rojiza como consecuencia de la oxidación de la hemoglobina.

Posteriormente suceden los siguientes olores: al principio, un olor fresco como a algas, que es el normal; a continuación, un olor dulzón, seguido de olor a pescado pasado, que se debe a trimetilamina; luego amoniacal y finalmente pútrido, debido al sulfhídrico, indol y otras sustancias con olores desagradables.

Clasificación del deterioro:

Deterioro microbiano: Las bacterias que con mayor frecuencia participan en la alteración del pescado son las que forman parte de la flora que se encuentra en la capa mucosa que recubre la superficie externa del mismo y las de su contenido intestinal. Los géneros predominantes varían con la temperatura a que se haya conservado el producto; a las temperaturas de refrigeración habitualmente empleadas predominan especies de *Pseudomonas*, a las que siguen en importancia algunos miembros de los géneros *Achromobacter* y *Flavobacterium*, menos frecuentemente, y cuando las temperaturas de conservación son más elevadas, se encuentran bacterias pertenecientes a los géneros *Micrococcus* y *Bacillus*. Se han citado casos en los que intervienen otros géneros, tales como *Escherichia*, *Proteus*, *Sarcina*, *Serratia* y *Clostridium* (Fraizer, 1976, Maruin, 1976). La mayor parte de éstos crecen solo a las temperaturas ordinarias de la atmósfera y probablemente apenas se desarrollarán a las temperaturas de refrigeración.

La parte del pescado más sensible a la alteración es la región de las agallas, que incluye las branquias, es posible advertir los primeros signos de alteración organoléptica examinando las agallas con el fin de detectar la existencia de olores anómalos. Si el producto no se eviscera inmediatamente, las bacterias intestinales atraviesan las paredes intestinales y pasan al tejido

muscular de la cavidad abdominal. Este tránsito es favorecido por la actividad de enzimas proteolíticas, procedentes del intestino que pueden ser enzimas naturales propios de este órgano o enzimas de origen bacteriano procedentes del interior del tubo intestinal ó bien es posible que sean enzimas de ambas procedencias (Jay, 1994).

En los pescados refrigerados, el deterioro se realiza principalmente por la proliferación de bacilos psicrotróficos gram (-); asociación bacteriana cuyo número y composición varía a lo largo del tiempo de conservación (Mossel, 1982; Moreno, 1989).

La congelación destruye parte, pero no todos los microorganismos presentes por lo que después de la descongelación puede tener lugar el crecimiento. El pescado posee bacterias psicrótrofas, la mayoría de las cuales sobreviven a la congelación (Fraizer, 1976).

Para determinar el grado de frescura del pescado se recurre a un método de análisis microbiológico: Cuenta total en placa (CTP) ó Cuenta en placa estandar (CTE), proporcionan una medida del grado medio de contaminación microbiana.

Los resultados del análisis microbiológico dependen estrechamente del método utilizado. Por ello deben ser uniformes los siguientes factores: toma de muestra, homogenización y dilución de la misma, colocación en la placa, composición del medio de cultivo y tiempo de incubación (Connell, 1978).

La desventaja de estos métodos es que requieren de mucho tiempo y espacio. Sin embargo, en muchas investigaciones ha resultado ser indicador de la frescura del pescado y se han llegado a establecer los siguientes estándares respecto al número de microorganismos: (Es importante señalar la diferencia entre los valores de límite de consumo entre estos dos autores, que resulta ser de un orden de magnitud).

*CTP	(No. de colonias/g de músculo)
Pescado fresco:	$1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ UFC/g
Límite de consumo:	8×10^5 UFC/g
Nivel crítico:	1×10^6 UFC/g
Deteriorado:	más de 1×10^6 UFC/g

(Kietzman, 1974)

*CTP	(No. de colonias/g de músculo)
Pescado fresco:	$1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ UFC/g
Límite de consumo:	$1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ UFC/g
Deteriorado:	más de 1×10^6 UFC/g

(Connell, 1978)

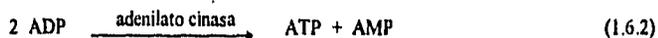
Deterioro Bioquímico: Una vez que se ha alcanzado la etapa de post-rigor, es cuando se empiezan a acelerar las reacciones bioquímicas responsables de los malos olores y sabores del pescado en proceso de descomposición. Las modificaciones bioquímicas y las causadas por microorganismos no pueden separarse, ya que son interdependientes, así que para que se inicie el crecimiento de los microorganismos en el músculo es necesario que previamente se hayan producido algunos cambios bioquímicos debidos a los propias enzimas musculares con liberación de péptidos y aminoácidos que quedan disponibles para sostener el crecimiento bacteriano. Esto no significa que los microorganismos causantes del deterioro ataquen a estos productos sino que se necesita que existan para que los microorganismos puedan formar sus propias enzimas capaces de atacar a las proteínas o a los lípidos (Borderías *et al.*, 1987).

Entre las principales alteraciones bioquímicas relacionadas con el olor y sabor se encuentran las siguientes:

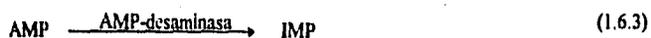
- **Degradación de nucleótidos:** En la degradación de los nucleótidos intervienen reacciones puramente enzimáticas que se inician desde el momento de la muerte con la utilización del ATP.



Cuando se inicia la escasez de ATP es necesario resintetizarlo a partir de ADP, o el ADP sufre desfosforilación a AMP.



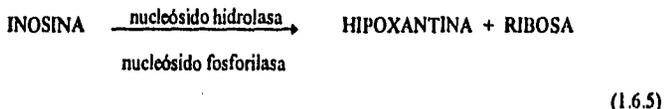
Con esta reacción se genera AMP, el cual sufre una desaminación para transformarse en IMP.



El inosina - 5'-monofosfato (IMP) tiene un efecto potenciador de sabor en la carne del pescado, por lo tanto su presencia es deseable. Sin embargo, puede ser degradado a inosina.



La producción IMP es generalmente rápida, y su degradación a inosina es un poco más lenta. La inosina es también degradada, aunque de manera aún más lenta, a hipoxantina y ribosa.



Contrariamente al IMP, la presencia de hipoxantina es indeseable, ya que produce sabores amargos. Su determinación química suele ser utilizada como índice de frescura del pescado (Saito *et al.*, 1959).

El catabolismo de ATP en el músculo del pescado ha sido documentado ampliamente, así como derivados de ATP que han sido usados para monitorear frescura en diferentes variedades de pescado, (figura 1.6). En 1959 Saito y col. en Japón, propusieron una técnica basada en la determinación cuantitativa de nucleótidos derivados del ATP, que permite detectar cambios tempranos en la frescura del pescado (Gómez *et al.*, 1990).

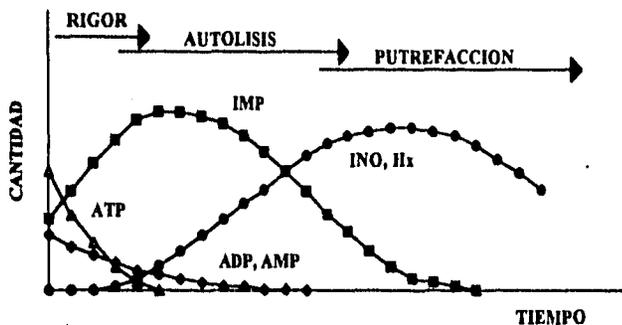


Fig. 1.6 Cambios de los derivados de ATP del músculo [Gómez, *et al.* 1990].

Jones y Murray en 1964; utilizaron el contenido de Inosina e Hipoxantina como indicadores de frescura en el músculo de pescado, detectados mediante el uso de cromatografía y la inmovilización de enzimas (Luong *et al.*, 1992).

Por otro lado Fraizer (1965) y Spinelli *et al.*, (1969) relacionaron la desaparición del IMP con la pérdida de frescura y de sabor en algunas especies de pescado. Mientras que Soudan (1965), estudió como causa principal la autólisis, en la que incluye el rigor, las acciones enzimáticas y el deterioro por microorganismos.

Se han usado otros métodos para la determinación cuantitativa de los catabolitos de ATP (Martín *et al.*, 1978). Sin embargo en las últimas décadas la cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC) (Ryder, 1985) ha reemplazado a la cromatografía de intercambio iónico (tiempo-consumo), donde se reportan sistemas de separación con analizador automático de muestras y un detector de absorbancia a 254 nm (Tapani *et al.*, 1992).

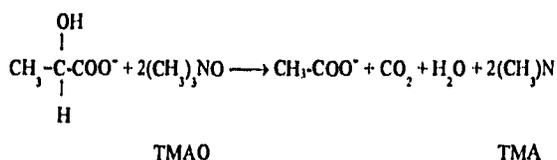
También se han presentado métodos muy rápidos para la determinación del valor K definido como la proporción de inosina e hipoxantina dentro del conjunto del ATP y todos sus compuestos derivados. Karube y otros (1984), Nomoton y Ohno (1987), usaron un biosensor

con el cual el valor K pudo determinarse en pocos minutos. Negishi y Karube (1989), desarrollaron un método de prueba con papel para este propósito.

El valor K se podría aplicar como indicador de la frescura de diversos peces de agua dulce (Tapani *et al.*, 1990). Loung *et al.*, 1992 valoró mediante electrólisis capilar y la inmovilización de enzimas la degradación de la inosina -5'-monofosfato (IMP), inosina (INO) e hipoxantina (Hx) la frescura del pescado.

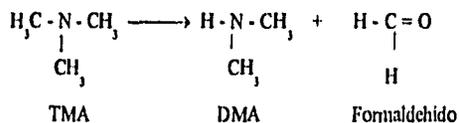
- **Reducción del óxido de trimetilamina (TMAO):** Compuesto que existe en la mayoría de los pescados de agua de mar y en menor medida o está ausente de los de agua dulce. Dentro de los de agua de mar, su presencia es más acusada en los elasmobranquios que en los teleosteos (Borderías, *et al.*, 1987), ya que el TMAO actúa como osmorregulador.

La reacción de reducción del TMAO puede ser consecuencia del ataque microbiano o catalizada por enzimas propias del músculo.



(1.6.6)

La Trimetilamina (TMA) es un compuesto volátil de olor penetrante, responsable en gran parte del típico olor a pescado pasado, puede ser descompuesta en dimetilamina (DMA) y formaldehído.



(1.6.7)

El formaldehído producido afecta la textura del pescado, especialmente en productos procesados, como los congelados, ya que desnaturaliza a las proteínas y causa

entrecruzamientos de las mismas, acelerando la agregación con lo que aumenta rápidamente la fibrosidad (estropajosidad).

Las etapas subsecuentes de degradación generan metilamina (MMA) y finalmente, ésta es transformada a amoníaco.



(1.6.8)

La máxima formación de DMA y formaldehído es entre -5° y -10°C aproximadamente, pero aparece a temperaturas incluso de -40°C .

La determinación química de la TMA es un método muy utilizado para estimar el grado de frescura de pescados marinos (Macouzet y Rodríguez, 1993).

Clarck y Amly (1917-1920), fueron los primeros en reportar que el contenido de bases volátiles nitrogenadas se incrementan durante el almacenamiento en la carne blanca del pescado.

Paladino y Witfogel (1943-1958), reportaron que la determinación de las bases volátiles totales (BVT), eran de utilidad en las etapas tempranas del deterioro y que esta prueba sustituyó a las cuentas bacterianas, titulación con formol y pH, ya que no resultaron satisfactorias.

En 1965 Farber hizo una revisión completa de artículos mostrando resultados acerca del uso de la determinación de bases volátiles totales, como medidor de frescura en pescado.

Algunas ocasiones se ha considerado una prueba tan efectiva como la determinación de Hx; pero (Van Spreekens, 1969), encuentra que las BVT llegan a ser detectables demasiado tarde y que son consistentes en el pescado fresco, pero no en el pescado congelado. En

contraste con Paladino, estos autores determinan que las BVT no es un indicador confiable de calidad en las primeras etapas del deterioro (Gould and Peters, 1971).

La determinación de BVT se puede llevar a cabo de diversas formas, basadas en tratar con álcali y agua un extracto de pescado molido, que por reacción química da lugar a la formación y desprendimiento de amoníaco y aminas.

Los métodos más empleados para esta determinación son: el método de Luke y Geidel de destilación, mezclando el pescado con álcali en el matraz de destilación, las aminas desprendidas se conducen por vacío al matraz receptor el cual contiene el ácido valorado. La cantidad de aminas producidas se determina midiendo el excedente de ácido que no se neutralizó. Otro método para la determinación de BVT es el de microdifusión de Conway de Beatty y Gibbons, en el cual puede determinarse simultáneamente trimetilamina (TMA).

- * Producción de amoníaco a partir de urea: La urea es un producto de excreción de los peces que normalmente se elimina mediante el mucus a través de la piel. El olor a amoníaco es fácilmente detectable en las bodegas de almacenamiento de pescado fresco, y es especialmente intenso cuando se trata de elasmobranquios (tiburones y rayas).
- * Elevación del pH: El pH del músculo, que es neutro en el pez vivo y ligeramente ácido al momento de la muerte del pescado, se va elevando poco a poco debido a la continua producción de bases nitrogenadas derivadas de los procesos de descomposición. Por otra parte, la actividad enzimática y bacteriana producen un desplazamiento en el equilibrio de óxido-reducción, y en consecuencia un cambio en la concentración de iones hidrógenos libres.

Al momento de alcanzar el pH neutro, la elevación se acelera y se empiezan a hacer más evidentes las bases volátiles en cuanto a las características sensoriales del pescado.

El pH no puede ser usado como medida del grado de frescura, pero los límites de pH pueden marcar la diferencia entre un pescado fresco y un pescado en descomposición.

Cutting (1953), reporta que el pH no se correlaciona significativamente con el análisis sensorial.

El pH del pescado varía en general de 6.1 a 6.4; valores de 6.5 exigen consumo inmediato y valores por arriba de este hacen sospechar una putrefacción del pescado, un incremento en el pH de un alimento proteínico es indicativo de una degradación de proteínas en contraste con una disminución del pH en el almacenamiento, lo cual indica generalmente una fermentación de los carbohidratos presentes (Valdivia e Iturbe, 1993).

- * Degradación de proteínas: Las proteínas son degradadas a proteosomas, peptonas, polipéptidos, dipéptidos para dar como producto final a los aminoácidos, las enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de proteínas son llamadas proteasas.

Los aminoácidos liberados pueden sufrir reacciones degradativas de vital importancia en el deterioro del alimento. Los productos que son formados dependen de:

1. El tipo de microorganismo
2. El tipo de aminoácido
3. Temperatura
4. La cantidad de oxígeno disponible
5. El tipo de inhibidores que pueden estar presentes

Las principales reacciones de los microorganismos sobre los aminoácidos son la descarboxilación y la desaminación. Estas reacciones incluyen:

- a) Desaminación Oxidativa
- b) Desaminación Reductiva
- c) Desaminación Hidrolítica
- d) Desaminación Hidrolítica y Descarboxilación
- e) Desaminación y Desaturación
- f) Descarboxilación

- g) Oxidación-Reducción de aminoácidos alifáticos (alanina)
- h) Degradación Anaerobia. Liberación de Hidrógeno a partir de ácido glutámico
- i) Transaminación se obtienen otros aminoácidos que pueden ser degradados
- j) Reacciones conjuntas de Oxido-Reducción

Algunos aminoácidos (alanina, leucina, fenilalanina y valina) pueden servir como donadores de hidrógeno y son oxidados, mientras que otros (arginina, glicina, hidroxiprolina, ornitina y prolina), pueden servir como aceptores y por lo tanto sufren reducción. Esta reacción ocurre con bacterias anaerobias y se le conoce comúnmente como reacción de Stickland.

Cuando están presentes aminoácidos azufrados como la cisteína o la metionina sufren degradación para generar ácido sulfhídrico.

La descarboxilación de los aminoácidos, lisina y ornitina, produce cadaverina y putrecina, mientras que la arginina es degradada a ornitina para dar como producto final a la putrecina.

Por reacciones de desaminación de aminoácidos, diversos productos son formados tales como dióxido de carbono, hidrógeno, amoníaco, ácidos orgánicos, alcoholes, aminas, diaminas, mercaptanos y disulfuros orgánicos.

Alteración química: El principal deterioro químico es debido a los lípidos insaturados presentes en los pescados, éstos influyen en la calidad del pescado sobre todo porque debido a su autooxidación se originan olores y sabores desagradables (rancidez), cuyo grado y velocidad están determinados por la presencia de ciertos catalizadores, actividad de agua, por el proceso tecnológico aplicado, etc. Mientras otras reacciones deteriorantes pueden ser controladas en gran medida disminuyendo la temperatura, esto es particularmente inútil para prevenir la oxidación, dado el bajo nivel de energía que se requiere para que ésta se lleve a cabo.

El deterioro oxidativo de los lípidos, comienza con reacciones de autooxidación, las cuales son acompañadas de varias reacciones secundarias con carácter oxidativo y no oxidativo. Los hidroperóxidos (ROOR) son el producto principal de las reacciones de ácidos grasos con

oxígeno, las reacciones de peroxidación de lípidos tienen importancia biológica, dado que se producen compuestos tóxicos en los alimentos (Karel *et al.*, 1975). Entre los efectos de la peroxidación de los lípidos sobre las proteínas, están la pérdida de actividad enzimática, pérdida de solubilización y pérdida de aminoácidos específicos de los cuales, los más susceptibles son: cisteína, lisina, histidina y metionina, causando cambios indeseables en las propiedades funcionales y nutricionales de las mismas (Tappel, 1973; Soliman y Shenouda, 1980).

1.7 Refrigeración

Se denomina refrigeración del pescado, a la técnica que supone el descenso de la temperatura hasta su buena conservación, de forma que todos sus puntos se encuentren a una temperatura superior al punto de congelación.

En opinión del IIF (1967), para la refrigeración de los pescados enteros, los mejores métodos serían el hielo y el agua de mar refrigerada. La elección, más conveniente es en función de la clase de pescado, tipo y cantidad de captura, tiempo que permanecerá el pescado en el medio refrigerante, necesidad de mano de obra requerida y porte del barco.

Los cambios que van a tener los pescados, durante su período de conservación son debidos a su propia bioquímica (procesos de insaturación del rigor mortis y autolíticos) y al crecimiento de microorganismos, ya que son interdependientes y para que se inicie el crecimiento de los microorganismos en el músculo es necesario que previamente se hayan producido algunos cambios bioquímicos debidos a las propias enzimas musculares con liberación de péptidos y aminoácidos que puedan ser asequibles a la utilización por los microorganismos.

En general, las mayores alteraciones se producen por el crecimiento de microorganismos y son debidas a:

a) Utilización de componentes del músculo por la flora microbiana, produciendo reacciones no deseables (rancidez, olor, etc.) por liberación de H₂

b) Vertido al medio de metabolitos propios de su metabolismo con la aparición de productos no deseables y a veces incluso tóxicos

c) Liberación al medio de enzimas intra o extracelulares que aceleran la degradación de los componentes del músculo

Esto se manifiesta en el pescado como alteraciones en la textura, aroma, gusto, color, flaca superficial en exceso, etc.

La flora microbiana se encuentra en la piel, agallas y apéndices digestivos y es la del ambiente la que diferencia a los pescados de los mariscos de origen terrestre. La contaminación del pescado se efectúa a partir de estas zonas y se relaciona con la manipulación, conservación, etc. tanto cualitativamente.

Dentro de los microorganismos, los pescados son muy sensibles a los siguientes:

1) Microorganismos que causan enfermedades de carácter:

Esta flora es metafita principalmente, a más que, produce el desarrollo de bacterias y virus. El mayor de ellas, *Vibrio parahaemolyticus* es el más común en los pescados, especialmente en los mariscos. Este organismo es muy resistente a las condiciones ambientales y puede sobrevivir en el agua durante un tiempo considerable. Los síntomas de esta enfermedad se caracterizan por la aparición de lesiones en la piel y en las agallas, que se manifiestan como una eritema y a veces como una necrosis. Los síntomas de esta enfermedad se caracterizan por la aparición de lesiones en la piel y en las agallas, que se manifiestan como una eritema y a veces como una necrosis.

2) Bacterias que causan enfermedades de carácter:

Las bacterias que causan enfermedades de carácter en los pescados son de origen ambiental y se caracterizan por la aparición de lesiones en la piel y en las agallas, que se manifiestan como una eritema y a veces como una necrosis.

- a) Utilización de componentes del músculo para su propio metabolismo, produciendo reacciones no deseadas (putrefacciones, olores y gusto a pescado pasado, etc.)
- b) Vertido al medio de metabolitos propios de su metabolismo, con la aparición de productos no deseables y a veces incluso tóxicos.
- c) Liberación al medio de enzimas intra o extracelulares que aceleran la degradación de los componentes del músculo.

Esto se manifiesta en el pescado como alteraciones en la textura, aroma, gusto, color, limo superficial en exceso, etc.

La flora microbiana se encuentra en la piel, agallas y aparato digestivo y es la del entorno, lo que diferencia a los pescados de los animales de sangre caliente. La contaminación del músculo se efectúa a partir de estas zonas y se incrementa con la manipulación tanto cuantitativa como cualitativamente.

Dentro de los microorganismos del pescado hay que distinguir tres tipos:

- a) Microorganismos que causan toxiinfecciones alimentarias.

Esta flora es mesófila principalmente, a este grupo pertenece el *Clostridium botulinum* Tipo E, a pesar de haber contaminación inicial no suelen darse problemas tóxicos debido a que su crecimiento es mucho más lento que la flora banal, por lo que cuando existe en cantidades suficientes para producir la toxina el pescado ya está deteriorado. Hay que tener en cuenta que las condiciones de anaerobiosis pueden alcanzarse en el interior del músculo, incluso aunque no esté el pescado en un medio anaerobio. Solamente hay peligro de intoxicación cuando se utilizan otros tratamientos coadyuvantes (ahumado y radiaciones).

- b) Flora banal, que produce el deterioro del pescado.

La que causa las alteraciones más importantes que lo hacen finalmente no apto para consumo humano. En pescados marinos capturados en aguas templadas o frías son halotolerantes y psicrófilas.

c) Microorganismos que indican contaminación.

La presencia de estos microorganismos indica contaminación fecal y por consiguiente, un riesgo de que existan gérmenes patógenos.

A temperaturas de refrigeración la instauración del rigor transcurre con un acortamiento del sarcómero, originando un producto de dureza óptima, con buena capacidad de retención de agua. La dureza del rigor tiene gran importancia en la capacidad de conservación del pescado, ya que en su curso debido a que la rigidez bloquea la permeabilidad de las membranas celulares, se interrumpen los fenómenos enzimáticos y bacterianos responsables de la descomposición del pescado. Así mismo, se presenta el efecto protector del bajo pH debido a la formación del ácido láctico.

Por tanto, los tratamientos encaminados a prolongar el estado de pre-rigor y de rigor retardan la pérdida de calidad e incrementan la vida potencial de conservación, tanto al estado refrigerado como congelado (Borderías, *et al.*, 1987).

1.8 Congelación

El fundamento de la congelación es inactivar en forma de hielo, el agua disponible del músculo para evitar en lo posible reacciones enzimáticas y el crecimiento de los microorganismos.

Los sistemas más aconsejables son los que proporcionen una congelación rápida y un consumo menor de energía (Moral *et al.*, 1989).

Las modificaciones que van a tener los pescados durante el periodo de conservación son debidas principalmente a reacciones químicas y enzimáticas, así como la aplicación de la propia técnica de congelación.

Las tres fases del proceso de congelación son:

- a) Disminución de la temperatura y formación de cristales de hielo

- b) Conservación en el estado congelado
- c) Proceso de descongelación

El período de almacenamiento en congelación es el que tiene más importancia en la calidad del producto, ya que es la fase más larga siempre y cuando las técnicas de congelación y descongelación aplicadas sean las adecuadas. La temperatura de conservación de un producto congelado se debe elegir en función del producto y del tiempo de conservación previsto para que se conserve en condiciones óptimas para el consumo directo o para el proceso al que se destine, generalmente para períodos largos de conservación los pescados grasos se mantienen a -30°C y los magros a -20°C , de lo contrario existen factores que intervienen en la desnaturalización de las proteínas durante este período de almacenamiento, las cuales se pueden clasificar en:

- A.- Factores relacionados a cambios en la humedad del pescado.**
- B.- Factores relacionados a cambios en los lípidos.**
- C.- Factores relacionados a la actividad de una enzima específica (trimetilamino oxidasa).**

A.- Factores relacionados a cambios en la humedad del pescado

Los efectos de esos cambios pueden ser clasificados en:

- Daños debidos a la formación y crecimiento de cristales de hielo.
- Daños debidos a la deshidratación.
- Daños debidos a un incremento en la concentración de sales.

La congelación lenta, causa la formación de hielo inter e intracelular, el cual puede causar rompimiento en las células, ruptura de membranas y desórdenes ultraestructurales de células y tejidos (Love, 1968), esto sumado a otros factores como el estado fisiológico del pescado, el grado de congelación, el tiempo de almacenamiento y variaciones de temperatura, pueden provocar cambios severos en el músculo.

En el estado de pre-rigor, el líquido celular está ligado a las proteínas intracelulares, las cuales limitan su difusibilidad del interior al exterior de la célula, causando una apariencia seca en los tejidos de los pescados sin congelar. Cuando este tipo de tejido (pre-rigor) es congelado, se forman cristales de hielo principalmente intracelularmente, independientemente de la velocidad de congelación. En contraste; en el rigor-mortis, debido a la contracción muscular, algunos fluidos celulares son puestos libres para difundirse dentro del espacio extracelular, dando una apariencia húmeda o acuosa a los tejidos sin congelar. Por lo tanto, cuando este tipo de tejido es congelado, se forman cristales de hielo inter y extracelularmente, dependiendo en este caso de la velocidad de congelación.

En una congelación lenta, el exterior de la célula se enfría más rápidamente que las partes interiores y con la continua declinación de la temperatura, el fluido extracelular superenfriado llega a una temperatura crítica, en ese punto el agua se separa del soluto, formando cristales de hielo afuera de las células. Al mismo tiempo se induce a una concentración alta de sales en el fluido extracelular, por lo que la humedad emigra desde el interior de la célula por ósmosis.

Una congelación rápida, presumiblemente, no sigue la migración de agua dentro del espacio extracelular, y consecuentemente se forman cristales de hielo más pequeños.

Las fluctuaciones de la temperatura aceleran el crecimiento en el tamaño de los cristales de hielo formados, con un ligero ascenso de la temperatura de almacenamiento, todavía abajo de la congelación, los cristales de hielo pequeños se funden más rápido que los largos y cuando la temperatura cae, los cristales de hielo fundidos se recongelan alrededor de los cristales de hielo largos (núcleos), formando cristales de mayor tamaño.

Los cambios que ocurren en las proteínas del pescado durante el almacenamiento en congelación, están relacionados a pérdida de solubilidad y de extracción de las proteínas totales del pescado o de las fracciones particulares.

Al comparar las proteínas miofibrilares, con las sarcoplásmicas, parecen ser más estables y la solubilidad permanece sin cambio, excepto después de un largo período de almacenamiento.

Dentro del grupo miofibrilar, la miosina es más sensible a la desnaturalización, mientras que la actina muestra cambios muy pequeños. La tropomiosina es considerada la proteína miofibrilar más estable durante el almacenamiento en congelación.

La deshidratación de las proteínas por efecto de la congelación, es causada por la migración de moléculas de agua para formar cristales que resulta en un rompimiento del sistema de puentes de hidrógeno, así como la exposición de regiones superficiales (hidrofóbicas o hidrofílicas) de moléculas proteicas, dejando estas regiones expuestas y vulnerables para reaccionar.

A temperaturas comunes de congelación (-10°C a -20°C) más del 90% de la humedad se congelará, produciendo un aspecto áspero y un incremento en la concentración de solutos solubles.

Así mismo, se sabe que un incremento en la concentración de sales afecta la permeabilidad celular y las propiedades de las proteínas, además causará rompimiento de enlaces electrostáticos, por lo que habrá una mezcla de cambios agregacionales y conformacionales de los cuerpos proteínicos (Deng, 1977). Un efecto paralelo se puede deber al incremento en la concentración de ciertos cationes, tales como el calcio y el magnesio, dicho incremento causa la contracción del músculo actomiosina asociado con ATP.

B.- Factores relacionados a cambios en los lípidos

- Efecto protector de los Lípidos Intactos.

La presencia de niveles moderados de lípidos puede proteger las proteínas del pescado o aumentar su resistencia a la desnaturalización, durante el almacenamiento en congelación. Este efecto de protección fue acreditado a la fracción de los lípidos neutros tales como, los triglicéridos, se presume que su presencia disminuye el efecto perjudicial de los ácidos grasos libres (AGL). Se asumió que los lípidos neutros disolvían los AGL y neutralizan su efecto hidrofóbico en las proteínas, esto es posible, ya que los lípidos neutros compiten con los AGL por los sitios de unión entre las proteínas.

- Efecto Perjudicial de los Lípidos.

Durante el almacenamiento en congelación de los tejidos enteros o picados del pescado; la presión ejercida por los cristales de hielo que se han formado en la estructura celular y el rompimiento en membranas o deformación en otros microorganismos puede conducir a la desorientación o liberación de componentes de lípidos y proteínas de sus compartimientos naturales y abren el camino a nuevas formas de contacto entre lípidos y proteínas, su interacción forma complejos lípido-proteína, usualmente ausentes en la naturaleza, los cuales afectan la calidad en la textura del tejido muscular.

El efecto de los AGL sobre las proteínas acarrea la formación de más regiones hidrofóbicas enmascarando grupos polares o cargados alrededor de la superficie de la proteína. El resultado final es una disminución de la solubilidad de las proteínas en buffers acuosos.

La oxidación de lípidos en pescado congelado acorta grandemente la vida-media de muchas especies, especialmente los pescados grasos. En adición al problema de la rancidez, los lípidos oxidados interactúan con las proteínas causando cambios indeseables en las propiedades nutricionales y funcionales de las proteínas.

**C.- Factores relacionados a la actividad de una enzima específica
(trimetilamino oxidasa)**

Como se mencionó anteriormente, el óxido de trimetilamina (TMAO) es un componente exclusivo de peces marinos y mariscos, ha sido cuidadosamente estudiado, así como su degradación en músculos de pescado a DMA (amina secundaria) y formaldehído (FrHO) en una proporción 1:1 molar (reacción 1.6.7).

La actividad de la enzima trimetilamino oxidasa (TMAOasa) varía ampliamente entre especies, tipos de tejido y temperaturas de almacenamiento (Hiltz *et al.*, 1976). La influencia de la temperatura en la actividad de las TMAOasas durante el almacenamiento fué estudiada por

Tokunaga (1974), quien encontró que el deterioro en la calidad y textura del pescado almacenado en congelación, debido al rompimiento enzimático del óxido de trimetilamina es básicamente atribuido a la formación de formaldehído más que de dimetilamina. Evaluaciones sensoriales mostraron que los tejidos que contiene formaldehído, se vuelven más correosos y su capacidad de retención de agua disminuye, carecen de jugosidad y de sabor de boca deseado, y en etapas avanzadas, su textura se vuelve gomosa. La presencia de FrHO , también causó una notable disminución en la extracción total de proteínas, particularmente del grupo miofibrilar, la tropomiosina y la miosina, eran las más afectadas y los componentes de actina y tropomiosina los menos afectados (Soliman y Shenouda, 1980).

1.9 Factores que influyen en el tipo y velocidad de alteración

1. Factores dependientes del lugar de pesca y de los métodos de captura que inciden en la calidad.

Los pescados deben ser sometidos a un tratamiento de conservación generalmente frigorífico, inmediatamente después de su captura para mantener la calidad inicial de los mismos.

Se sabe que los pescados procedentes de aguas frías tienen, en general mejor textura y sabor, pero presentan mayor susceptibilidad al deterioro que los obtenidos en aguas cálidas. Los pescados procedentes de aguas cálidas, ante un mismo tratamiento frigorífico, se conservan mejor debido a que estos peces son animales poiquilotermos, y las reacciones bioquímicas se inhiben de manera importante al descender la temperatura.

Los fondos arenosos producen pescados de mejor sabor que los fondos con mucha materia orgánica y cenagosos; en estos lugares, los pescados pueden presentar ciertos sabores anormales debido al hábitat en que se encuentran (Moral, 1989a).

Varona (1982), describe que los fondos marinos con piedras o corales hacen que la red y su contenido sufran tensiones que afectan al pescado, no sólo por daños físicos a su piel, sino también por los esfuerzos que el pescado hace por escapar: en estos pescados se produce un rigor muy acentuado y por lo tanto carnes fatigadas.

También influye la red (con nudos o sin ellos) y sobre todo el tiempo de arrastre, durante este periodo el pescado está sometido dentro de la red, a una presión continua de agua que entra por la abertura de la misma, hecho que si es muy prolongado, facilita un posterior deterioro más rápido.

En ocasiones se hacen tiempos de arrastres de 10 a 12 horas, con lo que se obtienen pescados de escasa conservabilidad, aunque se sometan a una manipulación adecuada, las acciones enzimáticas y microbianas se acentúan y junto con el escaso o nulo rigor que se instaura acortan bastante el tiempo de conservación. Se estima que los tiempos de captura de 3 a 5 horas son los más aconsejables (Moral *et al.*, 1989).

2. Factores intrínsecos del pescado

La especie, edad, tamaño y época de captura relacionada con el estado fisiológico o de engrasamiento, condicionan sobre todo el grado de conservación, textura y sabor.

En cuanto a la especie, se podrá citar la presencia del músculo rojo y blanco y de tejido conjuntivo. El músculo rojo está constituido por miofibrillas más cortas, es rico en mioglobina, proteínas sarcoplásmicas y tiene una alta actividad enzimática, debido a su metabolismo aerobio, este músculo se altera más fácilmente que el blanco.

El tejido conjuntivo está presente en mayor cantidad en cefalópodos y elasmobranquios, que condicionan inicialmente su textura (Moral, 1985a).

La época de captura proporcionará pescados con un estado mayor o menor de engrasamiento, según estén en desove o post-desove. Esto regula las fluctuaciones de composición química,

muy acusados sobre todo en especies pelágicas. Los pescados bien nutridos tienen un rigor más prolongado, por el contrario, un alto contenido de agua como sucede en los pescados capturados inmediatamente después del desove facilita un deterioro más rápido, la carne es flácida y la piel se separa fácilmente. El conjunto de estos factores proporcionará un pescado con atributos específicos que desde el punto de vista práctico se traduce en una *palatabilidad* o sabor característicos para cada especie.

Este sabor de los pescados se aprecia durante la masticación y es debido principalmente a los constituyentes que se solubilizan en la saliva. Las proteínas, lípidos, polisacáridos, pigmentos y vitaminas intervienen raramente en el sabor, los responsables de éste serían los compuestos solubles en agua.

Entre estos compuestos solubles están los nitrogenados, aminoácidos libres, péptidos de bajo peso molecular, nucleótidos y derivados, bases orgánicas y no nitrogenadas (ácidos orgánicos, azúcares y los minerales).

En cuanto a los ácidos orgánicos detectados en pescados y que contribuyen a la palatabilidad, se podrían citar los ácidos: láctico, propiónico, acético, pirúvico, succínico, oxálico, etc., (Osada y Okada, 1964; Hayashi *et al.*, 1979; Konosu *et al.*, 1967). Los azúcares debido a su bajo contenido no parecen intervenir en el sabor (Soliman y Shenouda, 1980).

El contenido de todos estos componentes solubles varía de una especie a otra, y dentro de la misma especie con la edad, la época del año y asociada con el estado fisiológico (Moral, 1989).

3. Factores que inciden en la calidad relacionados con los tratamientos que han sufrido los pescados

De los tratamientos de manipulación, conviene destacar que el descabezado, eviscerado, despelejado, lavado y a veces el picado, realizados correctamente, permiten alargar la vida comercial de los pescados refrigerados y especialmente de los congelados. Igual efecto

tendrían determinados tratamientos coadyuvantes, como el envasado, las atmósferas modificadas, baños de polifosfatos, antioxidantes, etc., (Moral, 1985b, 1987a).

Si se quiere mantener la calidad inicial de los pescados durante el mayor tiempo posible, es necesario enfriarlos (refrigeración ó congelación) lo antes posible después de la captura.

La refrigeración por los métodos habituales (hielo de agua dulce, de agua de mar, agua de mar enfriada (CSW), agua de mar refrigerada (RSW), etc.), debe ser aplicada en función del uso que posteriormente ha de hacerse a los pescados.

Para la elaboración de productos (filetes, rodajas) destinados al consumo en fresco, es preferible utilizar el hielo de agua dulce, aunque el hielo de agua de mar y los métodos de CSW y RSW adecuadamente utilizados, también pueden emplearse.

Uno de los problemas que tiene el enfriamiento de pescados en agua de mar es la penetración de cloruro de sodio (NaCl). Wekell *et al.*, 1983 utiliza un 5% de polifosfato potásico en el RSW o CSW para disminuir la absorción de cloruro de sodio por los pescados, los refrigerados destinados a la congelación deben permanecer a temperaturas de 0°C el menor tiempo posible después de la captura.

Los métodos de CSW y RSW no son aconsejables para los pescados destinados a la congelación pero sí para otros procesos industriales (Moral, 1989b). Tampoco son aconsejables en pescados destinados a dietas con escaso contenido de sal.

En cuanto a los pescados que se congelan, deberán ser sometidos a las operaciones de evisceración, descabezado, fileteado, lavado, etc., ya que ello contribuye a mantener la calidad de los mismos durante su almacenamiento en estado congelado. La congelación rápida en túnel de aire o en armario de placas, proporciona productos de buena calidad para una elaboración posterior. No así los métodos de congelación en salmuera de cloruro de sodio (NaCl) que produce un enranciamiento precoz debido a la acción prooxidante del sodio.

II. MATERIALES Y METODOS

* Obtención y Preparación del Pescado

Con el propósito de establecer metodologías y evaluar la calidad química, bioquímica y microbiológica, se trabajó con dos especies de pescado (cazón procedente de Veracruz y la mojarra procedente de Tampico), las cuales fueron adquiridas en los establecimientos de la central de abasto "La Nueva Viga".

Estos fueron obtenidos en forma de filete, sin embargo se desconoce el tiempo real de captura, cómo fue transportado, las condiciones higiénicas y de manipulación. La información que se proporcionó por el vendedor en relación al tiempo de captura, transporte y almacenamiento fue de 2 días para todas estas operaciones, así como las condiciones higiénicas y de manipulación.

Una vez obtenidas las muestras (pescados) se procedió a transportarlas a 0°C, almacenadas en un hielera con refrigerante (hielo) hasta el lugar de trabajo, en donde se cortaron en pequeños trozos para ser homogeneizadas, pesadas y distribuidas para cada una de las diferentes determinaciones en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, teniendo un control a temperatura ambiente durante 24 hrs. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Se trabajaron cinco lotes con el fin de disminuir la magnitud del error por persona, en cuanto al empleo de la técnica:

- Lote 1. 13 de diciembre 1993 a 19 de enero 1994
- Lote 2. 28 de febrero 1994 a 4 abril 1994
- Lote 3. 24 de marzo 1994 a 30 abril 1994
- Lote 4. 28 de abril 1994 a 2 junio 1994
- Lote 5. 23 de agosto 1994 a 27 septiembre 1994

2. Métodos para determinar el grado de Frescura

2.1 Análisis Físicos

2.1.1 Determinación de pH

Por reacciones de degradación de aminoácidos, debido al metabolismo microbiano principalmente se producen diversos compuestos, tales como: dióxido de carbono, hidrógeno, amoníaco, ácido sulfhídrico, ácidos orgánicos, alcoholes, aminas, diaminas, mercaptanos y disulfuros orgánicos.

Es importante indicar que el balance es positivo hacia la producción de amoníaco y aminas lo que tiende a causar un incremento en el pH. Por lo que un incremento de pH en un alimento proteínico es indicativo de una degradación de proteínas, en contraste con una disminución que indica generalmente una fermentación de los carbohidratos presentes (AOAC, 1990).

Técnica:

Se tomaron 5 g de muestra y se les agregaron 10 ml de agua destilada, a fin de obtener una pasta uniforme y se determinó el pH con un potenciómetro Sargent-Weich, con electrodos de plata/cloruro de plata. El equipo fue calibrado con soluciones amortiguadoras de pH 4 y 7.

La determinación se realizó a temperatura ambiente (18-21°C).

2.2 Análisis Bioquímicos

2.2.1 Determinación de Volumen de Liberación de Extracto (VLE)

La Capacidad de Retención de Agua (CRA) de la carne fresca es elevada, pero disminuye marcadamente en unas horas, y aumenta paulatinamente durante el almacenamiento. La tendencia inversa se presenta con el volumen del filtrado que se obtiene de un macerado, que

se conoce como volumen de liberación de extracto (VLE), este volumen da información acerca del deterioro bioquímico de las proteínas fibrilares (Egan *et al.*, 1987 *Análisis Químico de Alimentos* de Pearson, 1987).

Técnica:

Se colocó en un vaso homogenizador (Waring Commercial Laboratory Blender), 15 g de muestra molida, se le adicionó 60 ml del reactivo de extracción, se licuó durante 2 min y el homogenizado obtenido se filtró para finalmente medir el volumen que se recoge en 15 min (Egan *et al.*, 1987).

- El reactivo de extracción utilizado fue: (50 ml de KH_2PO_4 a 0.2M y 3.72 ml de NaOH a 0.2 M con un pH de 5.8).

2.2.2 Determinación de Proteína Soluble (PS)

Los cambios que ocurren en las proteínas del pescado durante el almacenamiento, son relacionados a pérdida de solubilidad y de extracción de las proteínas totales del pescado o de un grupo particular de proteínas (miofibrilares, sarcoplásmicas o del grupo de la actomiosina) o aún a especies particulares de proteínas como la miosina, tropomiosina o actina. Debido a la gran cantidad de reacciones coloridas que presentan las proteínas y los aminoácidos, pueden utilizarse métodos para determinar la presencia de enlaces peptídicos o de aminoácidos específicos.

Método de Biuret

Este método se basa en la cuantificación de enlaces peptídicos, y su interacción con la cúprica formando complejos coloridos específicos de acuerdo a la sustancia, por ejemplo: para proteína se obtiene un color violeta; proteosas y peptonas nos dan un color rosa; los péptidos dan un color debilmente rosa y la gelatina un tono ligeramente azul (AOAC, 1990).

La importancia de la proteína soluble reside en que gobierna la bioquímica post-mortem contribuyendo en cierto modo al sabor, olor, textura, viscosidad, procesos autolíticos, propiedades emulsificantes y capacidad de retención de agua, si ésta última disminuye es atribuida a la desnaturalización proteica superficial y a daño físico en las células o membranas.

Las preparaciones de proteínas puras son raramente usadas en pruebas de solubilidad por la complejidad en las etapas de extracción. Sin embargo datos obtenidos de pruebas de extracción se usan en análisis comparativo, con el propósito de contribución en los cambios de las proteínas que toman lugar durante el almacenamiento (Soliman *et al.*, 1980).

Técnica:

Del filtrado obtenido de la prueba del VLE, se utilizó 1 ml y se adicionó a 4 ml del reactivo de Biuret, todo esto se realiza por duplicado para cada muestra, dejando reposar 30 min y leer a 545 nm en un Spectro-photometer, Lambda 3B Perkin-Elmer UV/Vis.

- Se realizó una curva patrón de albúmina con concentraciones de 2-16 mg/ml.

- Se reporta en mg/g de alimento de proteína soluble.

2.2.3 Determinación de Hipoxantina (Hx)

La degradación de nucleótidos en el músculo se inicia en cuanto muere el animal o en la etapa inicial del periodo post-mortem y continúa durante el almacenamiento.

Durante el proceso, el ATP es transformado a hipoxantina, como producto de descomposición, de tal forma que la cuantificación de la acumulación de éste ha sido considerado como un índice de frescura, especialmente en productos marinos.

La cuantificación de hipoxantina y otros productos de la degradación post-mortem de nucleótidos como índices de descomposición de productos cárnicos y pescados, resulta importante debido a la relativa estabilidad de estos compuestos durante el almacenamiento. Sin

embargo estos productos llegan a un máximo en concentración y posteriormente son degradados a otros compuestos como xantina y ribosa. (ecuación 1.10.1)



Técnica:

Se tomaron 25 g de muestra, se homogenizaron a 0°C en licuadora con 50 ml de una solución de ácido perclórico 0.6 M durante 30 seg se filtró rápidamente a 0°C, posteriormente se tomó 2 ml del extracto con 7 ml de agua. Con agitación constante se adicionó 0.2 ml de una solución de AgNO₃ 1M a 0°C, el precipitado se separó por centrifugación a 3,200 rpm durante 15 min, se procedió a lavar el precipitado con 5 ml de solución de ácido perclórico 0.1N contenido 0.02 M de AgNO₃ en agitación constante, se centrifugó nuevamente y se descartó el líquido obtenido, el precipitado se solubilizó con 15 ml de ácido clorhídrico 1N agitando vigorosamente, se centrifugó la solución y se eliminó el cloruro de plata. La absorbancia fué determinada a 248 nm en un Spectro-photometer Lambda 3B (Perkin Elmer UV/Vis) usando como blanco HCl (By *et al.*, J. Sci. Food Agric., 1964).

- Se realizó un curva patrón de Hipoxantina (reactivo) con una concentración de 0.02-0.1 µmol/ml
- La concentración de hipoxantina en la solución de ácido clorhídrico se determina por interpolación en una curva patrón en un rango de [0.02 - 0.2 µmoles/ml]
- La cantidad final de hipoxantina se reporta en µmol/g de muestra.
- Concentraciones superiores a 1 µmol de hipoxantina/g de muestra son considerados como indicadores de pérdida de frescura en pescados.

2.2.4 Determinación de Bases Volátiles Totales (BVT)

Es un parámetro que puede ser indicativo del deterioro, porque durante la degradación de proteínas mediada por el crecimiento microbiano, se producen una serie de compuestos volátiles, que presentan olores desagradables, tal es el caso de los compuestos diaminados como: putresina, cadaverina y escatol.

De la misma manera se produce amoníaco, que también es un producto de degradación de los nucleótidos. Durante el deterioro, el óxido de trimetilamina, que se encuentra naturalmente en la mayoría de los productos marinos, es reducido a trimetilamina el cual es volátil y de carácter fuertemente básico (AOAC, 1990).

Técnica:

En un matraz erlenmeyer se colocaron 50 ml de solución de ácido bórico al 2% y unas gotas de indicador de rojo metilo, a 10 g de muestra molida se le agregó 2 g de óxido de magnesio con 300 ml de agua y perlas de ebullición contenidos en un matraz macrokjeldhal.

Se montó un aparato de destilación macrokjeldhal, se recuperaron aproximadamente 100 ml., y se procedió a titular la solución destilada utilizando HCl 0.1N, al mismo tiempo se corrió un blanco de reactivos bajo las mismas condiciones.

- La cantidad de bases volátiles totales (BVT) se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{mg BVT/100 g} = (V - V') \times N (\text{HCl}) \times 14 / m \times (100)$$

En donde: V = Volumen de HCl utilizado para la muestra.

V' = Volumen de HCl utilizado para el blanco ml

N = Normalidad del HCl utilizado

m = Peso de la muestra en gramos

- Valores de BVT superiores a 20 mg /100 g son indicativos de descomposición.

2.3 Análisis Microbiológicos

2.3.1 Determinación indirecta de Carga Microbiana (TTZ)

Debido a los procesos enzimáticos que tienen lugar durante el metabolismo acelerado, las sales de tetrazolio pueden ser reducidas por bacterias, levaduras y semillas en germinación, las sales de cloro o bromo del 2,3,5-trifeniltetrazolio han sido ampliamente utilizadas como reactivos para pruebas de viabilidad y como colorantes vitales en microbiología. Es por esta razón que usando los mismos principios, la reducción de estas sales para producir trifenilformazán puede ser utilizada como un indicativo de la presencia de microorganismos en productos alimenticios.

La reducción de las sales de tetrazolio es el hecho de que en forma oxidada los compuestos son incoloros y completamente solubles en agua, en tanto que en su forma reducida presentan una intensa coloración rojo-cereza y se tornan insolubles en agua, presentando alta solubilidad en solventes orgánicos.

Al utilizar este proceso de oxido-reducción, la interpretación de resultados involucra la cuantificación del formazán producido por los microorganismos presentes en el alimento y la interpolación en una curva de calibración en que se relacionen la producción de formazán con el crecimiento microbiano (Moojani *et al.*, Food Science, 1957).

Técnica:

Utilizando como principio la reducción de las sales de cloro o bromo del 2,3,5-trifeniltetrazolio como indicativo de la presencia de microorganismos, se pesó 5 g de muestra con 30 ml de agua destilada estéril, se homogenizó en un vaso de licuadora estéril, la solución fué transferida a un matraz erlenmeyer estéril para adicionarle 0.5 ml de la solución de trifeniltetrazolio y 5 ml de la solución amortiguadora estéril. Se incubó a 37°C durante 5 hrs, el formazán producido fue extraído con 30 ml de alcohol butílico, la fase se separó por centrifugación a 3,500 rpm por 15 min, la absorbancia se leyó a 485 nm frente a un blanco de alcohol.

- La cantidad de formazán se obtiene por interpolación de la absorbancia en una curva patrón obtenida, midiendo la absorbancia a 485 nm de soluciones butanólicas de formazán (1-10 $\mu\text{g/ml}$).
- El formazán se obtiene por reducción de 1 g de 2,3,5-trifeniltetrazolio con 1g de ácido ascórbico, disueltos en 25 ml de agua destilada, se adicionó 5 ml de hidróxido de sodio al 10 %. La reducción se realiza en 20 min después de los cuales la solución se neutraliza.
- El formazán se recupera por filtración, se lava con agua sobre papel filtro y se seca a 37°C.

2.3.2 Determinación directa de Carga Microbiana: Cuenta Estándar (CE)

Es una prueba precisa para evaluar deterioro microbiano. Este análisis da idea del manejo que se ha dado al producto, en el caso del pescado desde su captura hasta la distribución y almacenamiento.

Después del sacrificio los mecanismos de defensa son detenidos, con lo que facilita que las bacterias se puedan multiplicar y distribuir a través de los tejidos, que se ven invadidos por los microorganismos contaminantes, esta invasión se halla afectada por la carga microbiana del intestino del animal y la condición fisiológica inmediatamente antes de su sacrificio, así como la velocidad de enfriamiento, para la conservación del producto (AOAC, 1990).

Técnica:

Para conocer la calidad en cuanto al deterioro por microorganismos, se tomó 5 g de muestra con 30 ml de agua destilada estéril, fue homogenizado en un vaso de licuadora estéril, se tomó 1 ml y se hicieron las diluciones correspondientes (10^{-1} a 10^{-6} por duplicado), las cuales fueron sembradas en un medio agar para métodos estándar y se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 72 hrs en una incubadora (Thelco, Precision PS. Scientific).

2.4 Análisis Estadístico

Para la interpretación de los resultados se utilizó la estadística de análisis de varianza (Anova), la cual se basa en la distribución de probabilidad F, con un nivel de significancia (α) igual a 0.01%, se contó con el paquete estadístico SP.SS/PC+, versión 2.0 permitiendo estudiar la diferencia significativa en los parámetros de estudio como pH, VLE, Hx, TTZ, CE, PS y BVT, considerando como variables la época del año, especie y tiempo de almacenamiento.

Para explicar la diferencia entre una variable de estudio en los diversos tratamientos y períodos de almacenamiento, se utilizó la distribución de χ^2 al 0.01% y la estadística de Valores Críticos de Hartley's al 0.01%.

2.5 Estudio Cinético

Con el propósito de analizar el deterioro químico, bioquímico y microbiológico de las dos especies de pescado en las condiciones bajo estudio (refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), se realizó el estudio cinético y utilizando los resultados estadísticos de los cinco lotes (valores promedio finales) para las diferentes pruebas: pH, VLE, Hx, TTZ, CE, PS y BVT, se obtuvieron las ecuaciones de orden de reacción para las dos especies a través del paquete Sigma Plot versión 5.0.

A continuación se presenta el ejemplo para el Cazón (prueba de pH en refrigeración $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)
Cálculo:

Tiempo (días)	0	3	5	7
Media	6	6.2	6.4	6.9
Máximo	6.1	6.7	7.1	8.3
Mínimo	5.8	5.9	6.1	6.2

Tabla. 2.9.1 Datos estadísticos de cazón, durante el almacenamiento en refrigeración.

Datos de regresión:

$$a \approx 5.91$$

$$b \approx 0.135$$

$$r = 0.95$$

Ecuación de orden de reacción obtenida de la gráfica:

$$\text{pH} = 6.0087 + 0.0034 t + 0.00192 t^2$$

$$r = 0.9964$$

Con el fin de evaluar la susceptibilidad entre las especies seleccionadas, se calcularon las energías de activación únicamente para BVT e Hx mediante la ecuación de Arrhenius (1). A continuación se describen los cálculos para la Mojarra (prueba de BVT en refrigeración $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

Cálculo:

La ecuación de Arrhenius

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{2.30RT}$$

(1)

En donde:

k = constante de velocidad

E_a = energía de activación

R = constante de los gases (8.314 J/K mol)

T = temperatura absoluta

A = es una constante

$$\text{Velocidad} = \frac{[\text{concentración}]}{\text{tiempo}}$$

(2)

$$k = \frac{V}{[A]^n} \quad (3)$$

Los datos utilizados corresponden a la prueba de BVT en refrigeración a los cinco días de almacenamiento en mojarra.

1. $V = [25.89] / 432,000 = 5.9 \times 10^{-5} \text{ mg/100 g/s}$
2. $k = V / [A]^2 = 5.9 \times 10^{-5} / [25.89]^2 = 8.9 \text{ mg/100 g/s}$
3. $\log k = -7.05$
4. $T = 273 + 5 \text{ }^\circ\text{C} = 278 \text{ K}$
5. $1/T = 3.6 \times 10^{-3}$

Condición	Día	Orden	[Concentración]	V	k	1/T	log k
Ambiente	1	1	41.76	2.4×10^{-4}	5.7×10^{-6}	3.4×10^{-3}	-5.23
Refrigeración	5	2	25.89	5.9×10^{-5}	8.9×10^{-8}	3.6×10^{-3}	-7.05
Congelación	22	3	23.59	7.5×10^{-6}	5.7×10^{-10}	3.8×10^{-3}	-9.23

Tabla. 2.9.2. Datos para calcular la Ea de BVT, durante el almacenamiento de la mojarra a diferentes condiciones de almacenamiento.

La ecuación 1 representa una línea recta, en la cual al graficar $\log k$ contra $1/T$, se obtiene una pendiente que está dada por $-E_a/2.30R$; en donde se desprende la Energía de Activación. (E_a).

Datos de regresión:

$$a = 22.22$$

$$b = -8121$$

$$r = -0.998$$

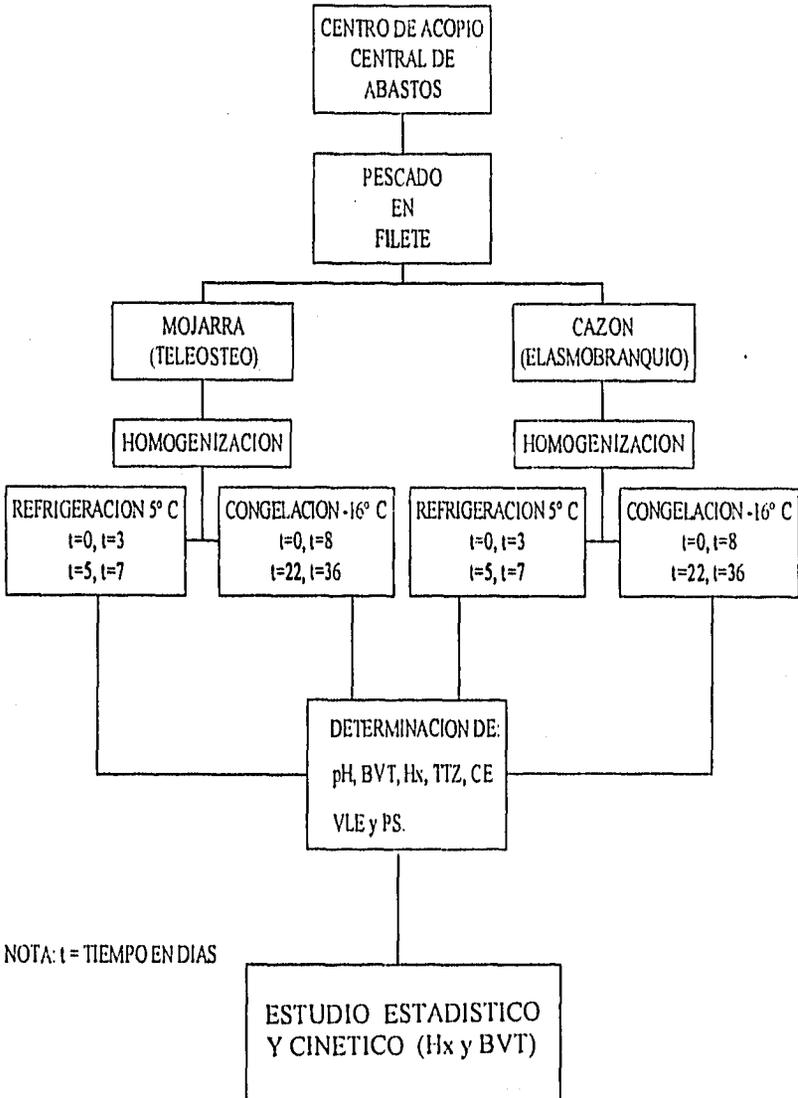
6. Pendiente = $-E_a / 2.30R$

$$E_a = -(\text{Pendiente}) (2.30R)$$

$$E_a = -(-8121 \text{ K}) (2.30) (8.31 \text{ J/K mol}) \times (1 \text{ kJ/1000 J})$$

$$E_a = 155.22 \text{ kJ/mol}$$

2.6 Método General



III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan a continuación los resultados obtenidos de las pruebas realizadas en 5 lotes (por duplicado), de cazón y mojarra, almacenados en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Estos resultados fueron analizados estadísticamente para obtener la media (\bar{x}) y el coeficiente de variación (CV).

3.1 pH

En la figura 3.1 se puede observar que el pH del cazón y la mojarra fue aumentando en el transcurso del almacenamiento en refrigeración, con una tendencia de 2o. orden. Este comportamiento, se considera de segundo orden, ya que los valores aumentan paulatinamente probablemente debido a la producción continua de bases nitrogenadas, y conforme alcanza el pH neutro la elevación de éste parámetro se acentúa. Este comportamiento fue más evidente en el cazón.

Por otro lado, en congelación (figura 3.2) la variación del pH, que también presenta una tendencia de 2o. orden, aparentemente logra un valor máximo y después tiende a permanecer constante, nuevamente en el cazón resulta más evidente este comportamiento.

Al observar de manera aislada los valores de pH (Tabla 3.1 y 3.2) indican un deterioro mayor para el cazón, representado por el diferencial (Δ). Esto fue evidente tanto en la condición de refrigeración como en congelación, la explicación es que esta especie tiene una fracción importante de compuestos nitrogenados no proteicos (CNNP) como la urea y el óxido de trimetilamina, al sufrir desaminación se ven incrementadas las bases volátiles totales y por lo tanto incrementa el pH, aún en etapas tempranas de almacenamiento.

Así mismo los valores de pH alcanzados en la congelación, son menores a los obtenidos en refrigeración, debido a que a temperaturas de -16°C disminuye significativamente la actividad

acuosa, como consecuencia decrece la velocidad de las reacciones que producen la degradación de los compuestos nitrogenados, tanto las debidas a las propias enzimas del músculo, como las derivadas del desarrollo de microbiano.

El pH no se correlaciona significativamente a la aplicación de los métodos cinéticos (Ea), debido a la producción de diversos compuestos como: dióxido de carbono, hidrógeno, amoníaco, ácido sulfhídrico, ácidos orgánicos, alcoholes, aminas, diaminas, mercaptanos y disulfuros orgánicos, derivados de diferentes procesos de descomposición. Asimismo se puede establecer que los valores de pH para elasmobranchios no son indicativos fieles del deterioro actual.

Ecuaciones del comportamiento cinético:

$$\text{pH} = 6.008 + 0.034 t + 0.019 t^2 \text{ (Cazón)}$$

$$\text{pH} = 6.343 + 0.002 t + 0.0084 t^2 \text{ (Mojarra)}$$

**Cazón y Mojarra
pH**

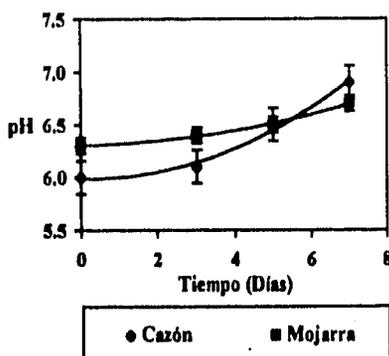


Fig. 3.1 Cambios en el valor de pH, durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

CAZON Orden de Rx 2		MOJARRA Orden de Rx 2	
pH	Tiempo (días)	pH	
6.0	0	6.3	
6.1	3	6.4	
6.5	5	6.5	
6.9	7	6.7	

Tabla 3.1 Valores de pH, durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un C.V. = 2.04 % y C.V. = 0.935% para Cazón y Mojarra respectivamente.

Ecuaciones del comportamiento cinético:

$$\text{pH} = 5.997 + 0.026 t - 0.0005 t^2 \text{ (Cazón)}$$

$$\text{pH} = 6.352 + 0.009 t - 0.0002 t^2 \text{ (Mojarra)}$$

**Cazón y Mojarra
pH**

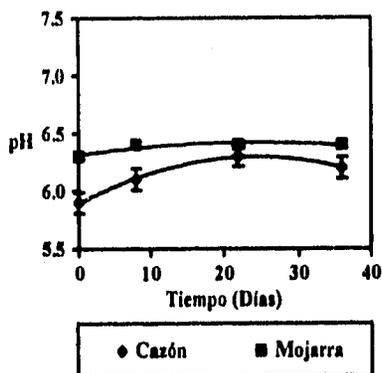


Fig. 3.2 Cambios en el valor de pH, durante 36 días de almacenamiento en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

CAZON Orden de Rx 2		MOJARRA Orden de Rx 2	
pH	Tiempo (días)	pH	
5.9	0	6.3	
6.1	8	6.4	
6.3	22	6.4	
6.2	36	6.4	

Tabla 3.2 Valores de pH, durante 36 días de almacenamiento en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un C.V. = 0.996% y C.V. = 0.522 % para Cazón y Mojarra respectivamente.

3.2 Bases Volátiles Totales (BVT)

Al realizar el estudio cinético de la evolución de bases volátiles totales en condiciones de refrigeración, el comportamiento se ajustó a un modelo de 2o. orden, mientras que la congelación el comportamiento fue de 3^{er} orden, para ambas especies.

Durante el almacenamiento del cazón en refrigeración a 5°C (figura 3.3), en las primeras etapas se observa que la velocidad de degradación de compuestos básicos del tipo de TMAO, DMA, y la actividad catalítica que genera el NH₃, derivada de la desaminación de proteínas y nucleótidos es todavía incipiente y para la mojarra se mantiene relativamente constante por un amplio período.

Particularmente en el cazón la producción de BVT se ve incrementada a partir del tercer día, es importante señalar que el aporte de BVT por la degradación de TMAO es significativo, debido a que la presencia de este compuesto se encuentra de manera natural en mayor concentración en esta especie, llegando a obtener valores de 4 veces mayor a los obtenidos en la mojarra.

La NOM-027-SSA-1993, indica un máximo de 30 mg/100 g, por lo que al confrontar los valores de BVT con la especificación se observa que la mojarra alcanza una concentración de BVT de 29.01 mg/100g a los 7 días en refrigeración a 5°C, por lo tanto de acuerdo a este parámetro estaría en tiempo límite para consumo (tabla 3.3).

Por otro lado para el cazón, desde el tercer día de evaluación presentó valores por arriba de dicha especificación (38.84 mg/100g), llegando a alcanzar los 109.53 mg/100g a los 7 días. Este valor tan alto se debe, como se discutió con anterioridad a los compuestos nitrogenados no proteicos que se encuentran presentes de manera natural en mayor cantidad en los pescados elasmobranquios que en los teleosteos. Con lo anterior se puede establecer que la especificación de BVT no es válida para los elasmobranquios, dado que un animal recién

capturado puede rebasar esa concentración. Es evidente que la especificación en la NOM-027-SSA1-1993 no toma en cuenta las diferentes especies.

Con lo anterior se encuentra que este parámetro es indicativo solo para estudios de almacenamiento en donde se realiza un monitoreo contra tiempo inmediatamente después de la captura y se establece el perfil evolutivo de estos compuestos.

Para la congelación (figura 3.4) la tendencia en las dos especies fue de 3^{er} orden, es decir se presenta una inhibición en la actividad acuosa y fluidos, teniendo como consecuencia una disminución en la velocidad de degradación de TMAO, por lo tanto la expresión de las reacciones de desaminación en las primeras etapas de almacenamiento se mantuvo constante durante el estudio.

Al realizar el análisis de los valores alcanzados (Tabla 3.4) en el cazón almacenado en congelación, la concentración de BVT a partir del octavo día ya se encontraba fuera de especificación (48.85 mg/100g), posteriormente fue aumentando muy lentamente hasta alcanzar una concentración de 53.78 mg/100g a los 36 días. En contraste para la mojarra la concentración de BVT se mantuvo constante a partir del octavo día (23.72 mg/100g), es probable que en los primeros días de almacenamiento, se hayan presentado zonas en donde el agua ligada aún no cristalizara, permitiendo condiciones para una catálisis enzimática incipiente. Este comportamiento puede deberse a la presencia de compuestos solubles, propios del músculo de la mojarra principalmente al nitrógeno no proteico, proteínas de bajo peso molecular y sales que existen en el fluido extracelular durante la congelación y que inciden sobre los fenómenos de cristalización, causando variaciones en la presión osmótica y consecuentemente mayor o menor salida de líquido intracelular. Esto conduce de manera adicional a alteraciones irreversibles en las células como resultado de daños estructurales, de la dislocación de funciones o de ambos fenómenos a la vez.

Al calcular la Energía de Activación (E_a), aparentemente la reacción de reducción del óxido de trimetilamina (OTMA) a dimetilamina (DMA), que finalmente es transformada a amoníaco

(NH₃) (reacción 1.6.6 a 1.6.8, pag. 24-25), presentó un valor de 180.88 kJ/mol para cazón y 155.22 kJ/mol para mojarra, indicando un ligero aumento en la susceptibilidad al deterioro en la segunda, lo cual no es significativo puesto que la Ea está representando solamente un proceso global y la sumatoria de eventos encadenados, asimismo considerando también que las bases volátiles están a expensas del TMAO y de compuestos nitrogenados, **la Ea se tomará como dato empírico, ya que la evaluación debe realizarse para cada una de las etapas en particular.**

El coeficiente de variación (CV) en la determinación de BVT en refrigeración para cazón es 16.32% y para mojarra 9.3%, en congelación 8.58% y 8.93% respectivamente, valores que resultaron mayores del 5 % reportado en la bibliografía (Cantillo Beato, 1994), una posible explicación para ello es que se trabajó con 5 lotes de cada especie con diferentes periodos de captura, historias de almacenamiento, manipulación, transporte y temperatura de almacenamiento hasta su venta al público. Con lo que se puede justificar la variación en la determinación de los 5 lotes.

Ecuaciones del comportamiento cinético:

$$\text{BVT} = 29.491 - 3.121 t + 2.079 t^2 \text{ (Cazón)}$$

$$\text{BVT} = 15.088 + 2.590 t - 0.085 t^2 \text{ (Mojarra)}$$

**Cazón y Mojarra
BVT**

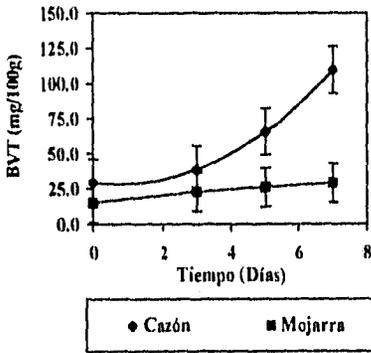


Fig. 3.3 Variaciones en la concentración de Bases Volátiles Totales, durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a 5°C ± 1°C.

CAZON Orden de Rx 2		MOJARRA Orden de Rx 2
BVT (mg/100g)	Tiempo (días)	BVT (mg/100g)
29.49	0	15.08
38.84	3	22.89
65.87	5	25.89
109.53	7	29.01

Tabla 3.3 Valor de Bases Volátiles Totales, durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a 5°C ± 1°C, con un C.V. = 16.32% y C.V.=9.13% para Cazón y Mojarra respectivamente

Ecuaciones del comportamiento cinético:

$$\text{BVT} = 28.640 + 3.789 t - 0.179 t^2 + 0.002 t^3 \text{ (Cazón)}$$

$$\text{BVT} = 15.103 + 1.684 t - 0.085 t^2 + 0.001 t^3 \text{ (Mojarra)}$$

**Cazón y Mojarra
BVT**

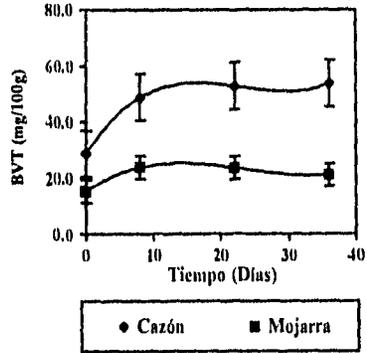
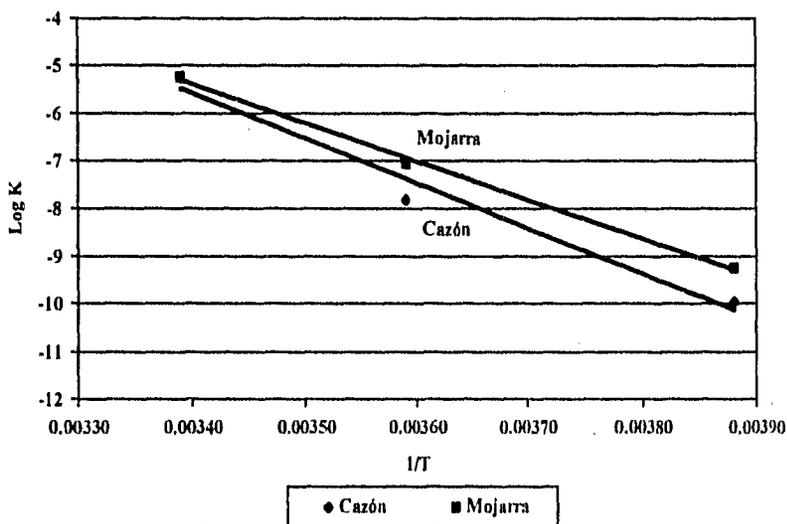


Fig. 3.4 Variaciones en la concentración de Bases Volátiles Totales, durante 36 días de almacenamiento en congelación a -16°C ± 1°C.

CAZON Orden de Rx 3		MOJARRA Orden de Rx 3
BVT (mg/100g)	Tiempo (días)	BVT (mg/100g)
28.69	0	15.10
48.85	8	23.72
52.86	22	23.59
53.78	36	21.04

Tabla 3.4 Valor de Bases Volátiles Totales, durante 36 días de almacenamiento en congelación a -16°C ± 1°C, con un C.V. = 8.58% y C.V.= 8.93% para Cazón y Mojarra respectivamente.

**Cazón y Mojarra
Energía de Activación**



Condición	1/T	Cazón	Mojarra
		log k	log k
*Ambiente	3.39×10^{-3}	-5.23	-5.23
Refrigeración (5°C)	3.59×10^{-3}	-7.82	-7.05
Congelación (-16°C)	3.88×10^{-3}	-9.95	-9.24

* Condición utilizada para contar con más elementos para el cálculo

Fig. 3.5 Energía de activación (Ea), de bases volátiles totales durante el deterioro del pescado a diferentes condiciones de almacenamiento.

Cazón	Ea = 180.88 kJ/mol
Mojarra	Ea = 155.22 kJ/mol

Tabla. 3.5. Valores de la Ea para BVT.

3.3 Hipoxantina (Hx)

Al realizar el estudio cinético de la concentración de hipoxantina en función al tiempo de almacenamiento (figuras 3.6 y 3.7), se encontró que tanto la refrigeración como la congelación, se ajustaron a un comportamiento de 3er. orden.

En la figura y tabla 3.6 se observa que al inicio del experimento existen bajos niveles de Hx (0.205 $\mu\text{mol/g}$ y 0.293 $\mu\text{mol/g}$ para cazón y mojarra respectivamente) en refrigeración, lo que significa que en los primeros estadios post-mortem del pescado los niveles de adenosin-difosfato (ADP), adenosin monofosfato (AMP) e inosina-5'-monofosfato (IMP) son relativamente altos (reacción 1.6.2 y 1.6.3, pag. 22). A medida que transcurren los días y dependiendo del método de conservación, los niveles de estos compuestos descienden estableciéndose un aumento paulatino de los niveles de inosina (INO) e hipoxantina (Hx), a expensas del IMP (reacción 1.6.4 y 1.6.5, pag. 22). Esto explica que a los 5 días se obtenga el valor máximo de Hx (1.233 $\mu\text{mol/g}$) para mojarra y a los 7 días (0.858 $\mu\text{mol/g}$) para cazón, posteriormente este nivel comienza a decaer principalmente en la mojarra, ya que continúa el proceso de degradación, lo cual para el cazón durante el tiempo de estudio, no se observa esta disminución.

Las marcadas diferencias entre especies en la velocidad de degradación del IMP, pueden estar relacionadas con la cantidad de fosfatasa o 5-nucleotidasas e IMP existentes en la célula muscular, a las diferencias de actividad de estas enzimas, así como a los niveles iniciales de ATP en el músculo.

En la congelación (figura 3.7) se observa la misma tendencia de tercer orden, sin embargo, los valores máximos alcanzados son menores para las dos especies, ya que la congelación reduce la velocidad de las reacciones bioquímicas debido a la disminución de la actividad acuosa (A_w), quedando solo una incipiente actividad.

En los resultados obtenidos durante el almacenamiento en congelación a -16°C en el transcurso de 36 días (tabla 3.7), el valor de Hx para cazón aumenta muy poco ($0.198 \mu\text{mol/g}$ a $0.270 \mu\text{mol/g}$). Es importante señalar que un valor de Hx muy elevado como ocurrió en la mojarra ($0.738 \mu\text{mol/g}$) a los 8 días en congelación a -16°C , puede indicar que en este tejido se presentaron condiciones favorables de movilidad acuosas que permitieron una actividad enzimática, favoreciendo la degradación.

Las reacciones de defosforilación y desaminación de adenosintrifosfato (ATP) a hipoxantina (Hx), (reacción 1.6.1 a 1.6.5, pag. 21-22) ocurrieron de una manera más intensa en el cazón que en la mojarra, estos resultados son sumamente importantes, si se considera que los niveles de Hx se emplean como indicadores de la calidad (frescura). Esto sugiere que para que la Hx pueda ser considerada como un parámetro válido de calidad y para no caer en decisiones erróneas, es necesario conocer la evolución de este compuesto en cada especie.

Al calcular las energías de activación (E_a) para el cazón se obtuvo un valor de 2.88 kJ/mol y 26.78 kJ/mol para mojarra, estos valores indican que la degradación de ATP a Hx fue mucho más intensa en el elasmobranquio que en el teleosteo.

Retomando los valores de la energía de activación (E_a) en la figura 3.8, para el cazón se muestra un comportamiento con mucha dispersión, ya que el valor de congelación es mayor que el de refrigeración, esto se debe a que la reacción de desaminación y defosforilación del ATP es compleja (transcurre en varias etapas), por lo que el parámetro E_a , no tiene un sentido físico sencillo y representa cierta función de las energías de activación de las etapas particulares o incluso una magnitud empírica. Sin embargo en este caso sería más correcto llamarlo energía de activación efectiva o empírica, ya que no está siendo un parámetro fiel en cuanto a la susceptibilidad de una especie a otra.

El coeficiente de variación (CV) en la determinación de Hx en refrigeración para cazón es 27.29% y para mojarra 29.00% , en congelación 16.566% y 30.145% respectivamente, valores que como se mencionó anteriormente resultaron mayores del 5% reportado en la bibliografía

(Cantillo Beato, 1994), una posible explicación para ello es que se trabajó con 5 lotes de cada especie con diferentes periodos de captura, diferentes historias de almacenamiento, manipulación, transporte y temperatura de almacenamiento y además la época del año en que se obtiene el pescado. Con lo que se puede justificar la alta variación en la determinación de los 5 lotes.

Ecuaciones del comportamiento cinético:

$$H_x = 0.205 + 0.026 t + 0.057 t^2 - 0.0023 t^3 \text{ (Cazón)}$$

$$H_x = 0.293 + 0.512 t - 0.082 t^2 + 0.0035 t^3 \text{ (Mojarra)}$$

Cazón y Mojarra
Hx

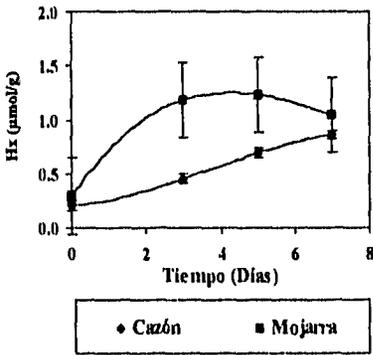


Fig. 3.6 Cambios en Hx, durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a 5°C ± 1°C.

CAZON Orden de Rx 3		MOJARRA Orden de Rx 3	
Hx (µmol/g)	Tiempo (días)	Hx (µmol/g)	Tiempo (días)
0.205	0	0.293	
0.452	3	1.182	
0.690	5	1.233	
0.858	7	1.044	

Tabla 3.6 Valores de Hx, durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a 5°C±1°C, con un C.V. = 27.29% y C.V.=29.00% para Cazón y Mojarra respectivamente.

Ecuaciones del comportamiento cinético:

$$H_x = 0.198 + 0.012t - 0.0007 t^2 + 1.12 \times 10^{-5} t^3 \text{ (Cazón)}$$

$$H_x = 0.293 + 0.084t - 0.0041 t^2 + 0.0001 t^3 \text{ (Mojarra)}$$

Cazón y Mojarra
Hx

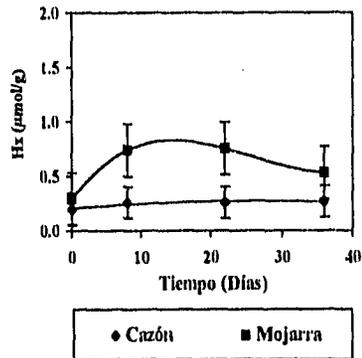
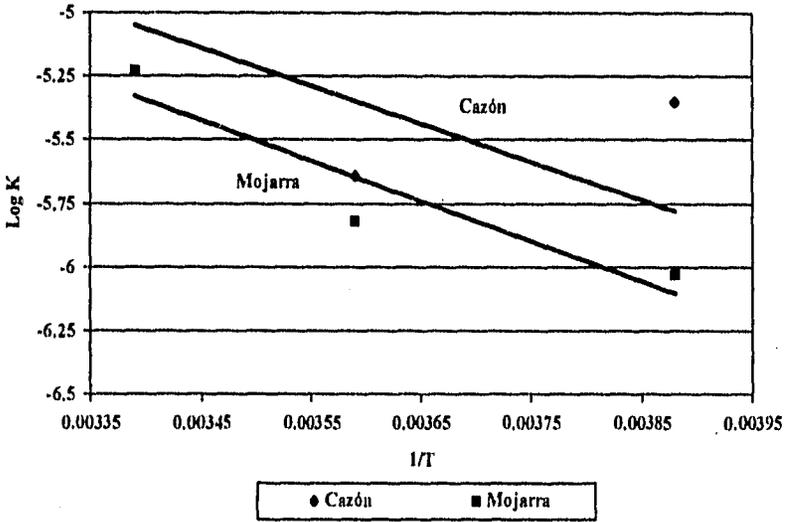


Fig. 3.7 Cambios en Hx, durante 36 días de almacenamiento en congelación a -16°C ± 1°C.

CAZON Orden de Rx 3		MOJARRA Orden de Rx 3	
Hx (µmol/g)	Tiempo (días)	Hx (µmol/g)	Tiempo (días)
0.198	0	0.293	
0.260	8	0.738	
0.258	22	0.752	
0.270	36	0.532	

Tabla 3.7 Valores de Hx, durante 36 días de almacenamiento en congelación a -16°C±1°C, con un C.V.= 16.566% y C.V.= 30.145% para Cazón y Mojarra respectivamente.

Cazón y Mojarra
Energía de Activación



Condición	1/T	Cazón	Mojarra
		log k	log k
*Ambiente	3.39×10^{-3}	-5.23	-5.23
Refrigeración (5°C)	3.59×10^{-3}	-5.64	-5.82
Congelación (-16°C)	3.88×10^{-3}	-5.35	-6.03

* Condición utilizada para contar con más elementos para el cálculo.

Fig. 3.8 Energía de activación (Ea), de Hipoxantina (Hx), durante el deterioro del pescado a diferentes condiciones de almacenamiento.

Cazón	Ea = 2.88 kJ/mol
Mojarra	Ea = 26.78 kJ/mol

Tabla. 3.8 Valores de la Ea para Hx.

3.4 Crecimiento Microbiano

Prueba de Trifeniltetrazolio (TTZ) y Cuenta Estándar (CE)

Al realizar el estudio cinético para la mojarra durante la evolución del trifenilformazán producido por reducción microbiana en refrigeración, el comportamiento se ajustó a un modelo de 3^{er} orden (figura 3.9). Al inicio se observa un aumento, lo que indica que las bacterias viables psicrófilas presentes en el pescado se desarrollaron rápidamente en los primeros 3 días de almacenamiento, manteniéndose prácticamente constante el resto del estudio (hasta 7 días).

Para el cazón el comportamiento se ajustó a un modelo de 2o. orden (figura 3.9), se puede apreciar un incremento paulatino en todo el intervalo, al comparar los valores obtenidos entre las dos especies se puede sugerir que se establecen condiciones diferentes de óxido-reducción entre las especies.

En el caso de la mojarra el crecimiento microbiano evaluado como cuenta estándar (figura 3.10), mostró una cinética de 3^{er} orden con una fase logarítmica o exponencial (log) constante. Para el cazón la reacción es de 2o. orden comenzando con una fase de retardo al inicio y un ligero crecimiento constante a lo largo del estudio.

Al confrontar los valores de trifenilformazán producido con la cuenta estándar (Tablas 3.9 y 3.10) se observa que los microorganismos que degradan al cazón parecen tener vías diferentes de reducción que generan los propios microorganismos y los asignables a la propia naturaleza del músculo, de esta forma cuando la cuenta estándar indica valores del orden de 2,888 UFC/g la cantidad de trifenilformazán formado, llega a solo 1.17 $\mu\text{g/ml}$, llegando a producir concentraciones finales de 1.619 $\mu\text{g/ml}$ y 39,900 UFC/g, en tanto que las 1,385 UFC/g presentes en la mojarra producen más de 1.5 $\mu\text{g/ml}$, alcanzando valores de 4.5 $\mu\text{g/ml}$ cuando se incrementan a más de 100,000 UFC/g.

Así mismo la disminución en los valores de CE es 39,900-2,888 UFC/g de microorganismos presentes en cazón produce un decremento de solo 1.619-0.17 $\mu\text{g/ml}$ de trifenílformazán producido en 7 días y una disminución de 101,000-1,385 UFC/g en mojarra producen un decremento de 4.513-1.581 $\mu\text{g/ml}$ de trifenílformazán.

En cuanto a las especificaciones de la norma de calidad (NOM-027-SSAI-1993), se observa que en ninguno de los 2 casos se rebasa el valor indicado, aún cuando el producto se encuentra en franca descomposición.

Por otro lado, un aspecto de suma importancia fue que se puso en evidencia que no existe relación entre el valor establecido por la norma y el aspecto sensorial del pescado, ya que para estos valores de microorganismos se apreciaba la presencia de olores y sabores objetables, pérdida de textura y consistencia.

REFRIGERACION

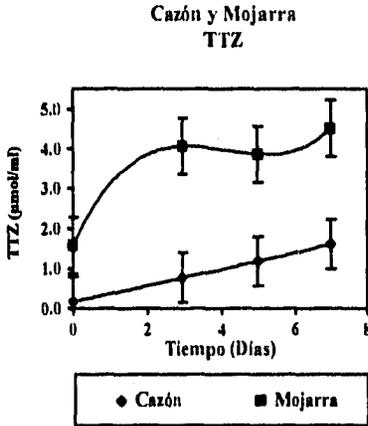


Fig. 3.9 Evolución en la cuenta indirecta (TTZ) de microorganismos, durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

CAZON Orden de Rx 2		MOJARRA Orden de Rx 3	
TTZ (µg/ml)	Tiempo (días)	TTZ (µg/ml)	
0.170	0	1.581	
0.776	3	4.062	
1.192	5	3.863	
1.619	7	4.513	

Tabla 3.9 Valores de trifenilformazan, durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un C.V.=30.32% y C.V.=20.15% para Cazón y Mojarra respectivamente.

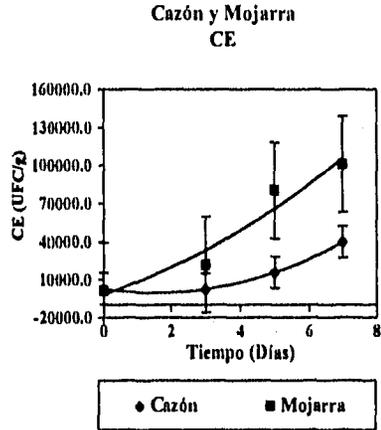


Fig. 3.10 Evolución en la cuenta directa (CE) de microorganismos, durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

CAZON Orden de Rx 2		MOJARRA Orden de Rx 3	
CE (UFC/g)	Tiempo (días)	CE (UFC/g)	
2,888	0	1,385	
2,562	3	21,700	
15,800	5	80,300	
39,900	7	190,000	

Tabla 3.10 Valores de CE, durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un C.V.=56.93% y C.V.=24.21% para Cazón y Mojarra respectivamente.

En congelación (figura 3.11 y 3.12) el cambio en producción de trifenilformazán por acción microbiana y la cuenta total se ajustó a un comportamiento de 3er. orden similar en las dos especies, observando primero una disminución del número de bacterias, posiblemente debido al efecto de la temperatura y posteriormente un ligero aumento con una fase constante. Esta disminución de la velocidad de crecimiento al inicio puede deberse a que hay destrucción de las bacterias psicrófilas y por lo tanto predominan las de tipo psicrotrófico, que acaban siendo la causa de las alteraciones. Así mismo puede considerarse la desnaturalización reversible o irreversible de determinadas enzimas limitantes de la velocidad, y la supresión general de la síntesis enzimática a bajas temperaturas.

Al contrario de lo que ocurre en los alimentos conservados a temperaturas por encima de 0°C, en los congelados no existe correlación entre los recuentos de microorganismos viables, y el producto de su metabolismo, lo que dificulta la apreciación de la calidad de estos productos. Es decir, no existe correlación entre los recuentos de UFC y la producción de TFF, así a los 10 días de almacenamiento cuando el resultado de la prueba de TTZ disminuyó; la CE disminuyó ligeramente y luego aumentó, no viéndose reflejada en la producción del TFF, la cual se mantuvo constante. El decremento inicial indica que se manifiestan en el pescado los cambios autolíticos causados por sus propias enzimas (deterioro bioquímico), con lo que aumenta la reserva de nutrientes nitrogenados (aminoácidos y aminas) y la glucosa, necesarios para el crecimiento bacteriano, posteriormente a partir de estos compuestos las bacterias remanentes pueden reproducirse, manteniendo un equilibrio de oxido-reducción, todo esto en un ambiente restringido de movilidad acuosa.

CONGELACION

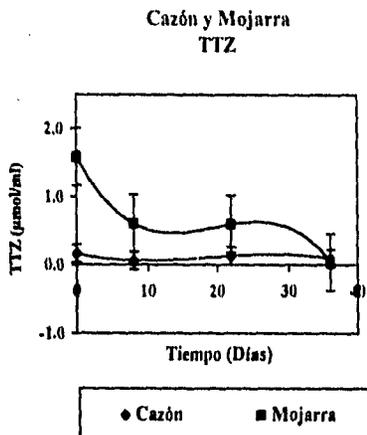


Fig. 3.11 Evolución en la cuenta indirecta (TTZ) de microorganismos, durante 36 días de almacenamiento en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

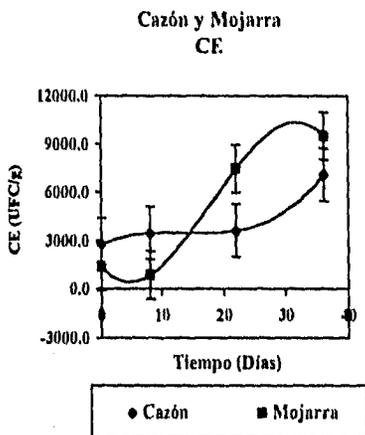


Fig. 3.12 Evolución en la cuenta directa (CE) de microorganismos, durante 36 días de almacenamiento en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

CAZON Orden de Rx 3		MOJARRA Orden de Rx 3	
TTZ (µg/ml)	Tiempo (días)	TTZ (µg/ml)	
0.170	0	1.581	
0.061	8	0.608	
0.130	22	0.598	
0.040	36	0.120	

Tabla 3.11 Valor de trifenilformazan, durante 36 días de almacenamiento en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un C.V. = 46.86% y C.V.=26.91% para Cazón y Mojarra respectivamente.

CAZON Orden de Rx 3		MOJARRA Orden de Rx 3	
CE (UFC/g)	Tiempo (días)	CE (UFC/g)	
2888	0	1385	
3478	8	869	
3634	22	7460	
7092	36	9512	

Tabla 3.12 Valores de CE, durante 36 días de almacenamiento en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un C.V. = 60.51% y C.V.=27.18% para Cazón y Mojarra respectivamente.

3.5 Volumen de Liberación de Extracto (VLE) y Proteína Soluble (PS)

En el cazón el volumen de liberación de extracto (VLE) en condiciones de refrigeración, disminuyó paulatinamente, mientras que en la mojarra aumentó hasta el tercer día y finalmente disminuyó (figura 3.13 y Tabla 3.13), por otro lado la proteína soluble (PS) disminuyó en ambos casos (figura 3.14 y Tabla 3.14). Este comportamiento podría indicar una capacidad de retención de agua mayor, lo que no es congruente si se relaciona con el deterioro bioquímico de las proteínas, ya que la conformación de la mayoría de ellas usualmente sigue un modelo general, en el cual una fracción substancial de la cadena por el lado hidrofóbico está localizada hacia el centro de la molécula. Otra explicación del incremento en la capacidad de retención de agua, puede deberse a que las moléculas de agua también se adhieren a aquellos lados de la cadena en donde están expuestos grupos hidrofóbicos, formando una barrera altamente organizada y mediante enlaces hidrofóbicos-hidrofílicos entre moléculas, como sucede en la formación de "clusters". Klots propuso un tipo bastante diferente de interacción entre el agua y las cadenas no polares laterales de las proteínas. Comprobó que las cadenas no polares de ciertos aminoácidos son análogas a productos de los que se sabe forman grupos cristalinos y dado que en la macromolécula de proteína existe gran número de estos grupos, se concluye que éstos actúan mancomunadamente para inducir una "ordenación estabilizada del agua en una disposición cristalina microscópica" (Fennema, 1989).

Por otro lado, la estabilidad de la estructura tridimensional de las moléculas de proteínas es altamente dependiente de una red de puentes de hidrógeno, muchos de los cuales son mediados a través de moléculas de agua, lo que provocará un incremento en la retención de agua al tratar de mantener la estabilidad del sistema.

Es necesario diseñar metodologías para la determinación de la capacidad de retención de agua, para los productos que se sometan a un tratamiento de conservación, por tiempos prolongados.

REFRIGERACION

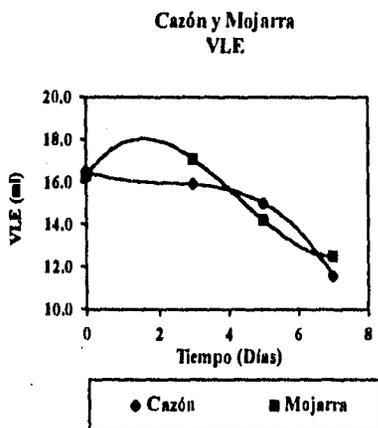


Fig. 3.13 Evolución en la capacidad de retención de agua (VLE), durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

CAZÓN Orden de Rx 3		MOJARRA Orden de Rx 3	
VLE (ml)	Tiempo (días)	VLE (ml)	Tiempo (días)
16.5	0	16.6	
15.9	3	17.1	
15.0	5	14.2	
11.9	7	12.5	

Tabla 3.13 Valores de VLE, durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

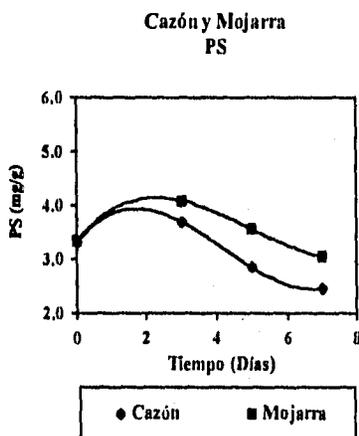


Fig. 3.14 Evolución en la proteína soluble (PS), durante 7 días de almacenamiento en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

CAZÓN Orden de Rx 3		MOJARRA Orden de Rx 3	
PS (mg/g)	Tiempo (días)	PS (mg/g)	Tiempo (días)
3.312	0	3.331	
3.689	3	4.089	
2.849	5	3.557	
2.462	7	3.045	

Tabla 3.14 Valores de PS, durante 36 días de almacenamiento en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Asimismo la congelación presenta el mismo comportamiento (figura 3.15 y 3.16, Tabla 3.15 y 3.16) en VLE y PS, como se sabe causa la formación de cristales de hielo inter e intracelular, los cuales llevan al rompimiento en las células, vía ruptura de membranas y desordenes ultraestructurales de células y tejidos, esto sumado a otros factores como el estado fisiológico del pescado, la velocidad en el proceso de congelación, el tiempo de almacenamiento y variaciones de temperatura pueden causar una apariencia seca en los tejidos de los pescados descongelados.

De este modo la deshidratación de moléculas de proteínas por la refrigeración y congelación, que resulta de un rompimiento del sistema de puentes de hidrógeno, y de la exposición de regiones hidrofóbicas o hidrofílicas, de moléculas proteicas. Estas regiones expuestas y reactivas pueden reaccionar con otros compuestos derivados de la oxidación de lípidos o de la reacción con formaldehído que proviene de la degradación del TMAO. Asimismo interacciones hidrofóbicas-hidrofóbicas e hidrofílicas-hidrofílicas, podrían tomar lugar dentro de la misma molécula proteica, causando deformación de la estructura tri-dimensional o entre moléculas proteicas adyacentes, induciendo a interacciones proteína-proteína y una consecuente agregación de grupos no polares de otros compuestos tales como alcoholes, ácidos grasos y aminoácidos.

A temperaturas comunes de congelación (-10° a -20°C) más del 90% de la humedad se congelará, produciendo un aspecto áspero y un incremento en la concentración de solutos solubles en la vecindad de las macromoléculas. Un incremento en la concentración de sales afecta la permeabilidad celular y se sabe que las propiedades de las proteínas causan rompimiento de enlaces electrostáticos. Esto puede favorecer cambios conformacionales y agregación de los conglomerados proteínicos de actina y miosina. El incremento en la concentración de soluto como resultado de la congelación, involucrará un incremento en la concentración de ciertos cationes, tales como el calcio y el magnesio causado por salida de las cisternas del retículo sarcoplásmico. El incremento en la concentración de esos cationes causa la contracción del músculo, es decir la interacción actina y miosina.

CONGELACION

Cazón y Mojarra
VLE

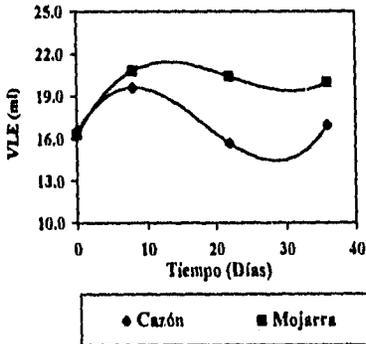


Fig. 3.15 Evolución en la capacidad de retención de agua (VLE), durante 36 días de almacenamiento en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

CAZON Orden de Rx 3		MOJARRA Orden de Rx 3	
VLE (ml)	Tiempo (días)	VLE (ml)	
16.5	0	16.6	
19.6	8	20.8	
15.7	22	20.4	
17.0	36	20.0	

Tabla 3.15 Valores de VLE, durante 36 días de almacenamiento en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Cazón y Mojarra
PS

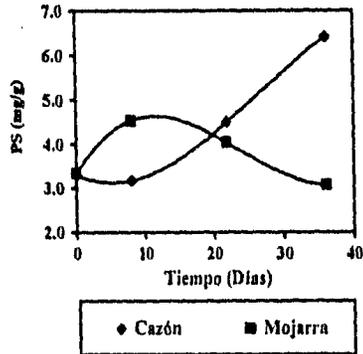


Fig. 3.16 Evolución en la proteína soluble (PS), durante 36 días de almacenamiento en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

CAZON Orden de Rx 3		MOJARRA Orden de Rx 3	
PS (mg/g)	Tiempo (días)	PS (mg/g)	
3.312	0	3.331	
3.172	8	4.328	
4.498	22	4.035	
6.412	36	3.072	

Tabla 3.16 Valores de PS, durante 36 días de almacenamiento en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.6 Resultados del Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA y X^2 (prueba de homogeneidad) calculados con el paquete sp.ss/pc. Versión 2 (Anexo I). Para las diferentes pruebas se analizó la influencia de la época del año y las condiciones de almacenamiento (refrigeración a 5°C y congelación a -16°C), entre las diferentes especies de pescado (Elasmobranquio y Teleosteo).

Efecto de la Refrigeración

Para evaluar el efecto de la condición de almacenamiento entre especies, se realizó el siguiente análisis estadístico, tomando únicamente como ejemplo la determinación del Lote 4 (28 abril 1994 - 2 junio 1994).

Se observa que no hubo diferencia significativa (Ds) durante el almacenamiento en refrigeración para cazón y mojarra en las pruebas de pH y TTZ (tabla 3.7.1). El cazón no presenta diferencia significativa, mientras la mojarra si presenta una diferencia significativa en las pruebas de BVT, Hx y CE en esta condición, lo que nos indica mayor estabilidad para el cazón que la mojarra. Los valores alcanzados para BVT fueron de 57.05 mg/100 g de cazón y de 25.95 mg/100 g para mojarra durante el almacenamiento para Hx 0.362 μ mol/g para cazón y 0.969 μ mol/g para mojarra, finalmente para CE los valores son de 4,617 UFC/g y 51,422 UFC/g de respectivamente.

Nota:

C = Cazón

M= Mojarra

X = Media

DS = Desviación Estándar

F = F calculada

Ds = Diferencia significativa

N = No existe diferencia significativa

S = Si existe diferencia significativa

PRUEBA	X		DS		F calculada		Ds	
	C	M	C	M	C	M	C	M
	pH	6.26	6.5	0.078	0.026	4.688	1.330	N
BVT	57.05	25.95	9.902	1.765	2.087	18.340	N	S
Hx	0.326	0.969	0.116	0.144	7.721	18.26	N	S
TTZ	1.232	4.196	0.330	0.414	1.406	2.430	N	N
CE	4,617	51,422	2,599	18,361	8.057	1,075,784	N	N

Tabla 3.7.1 Valores del análisis estadístico para cazón y mojarra en refrigeración 5°C, Hartley's (0.01%), F de tablas 16.69

Efecto de la Congelación

Para evaluar el efecto de la congelación se realizó de igual manera el análisis estadístico de los datos, se encontró que como era de esperarse la temperatura influyó en la velocidad de reacción, ya que como se discutió con anterioridad la congelación disminuye el agua disponible del músculo, retardando en lo posible reacciones enzimáticas y el crecimiento de microorganismos. Por lo tanto se observa que no hubo diferencia significativa durante el almacenamiento en congelación para ambas especies en las pruebas de pH, BVT y CE (tabla 3.7.2). En contraste, los parámetros de Hx y TTZ si hubo diferencia significativa entre especies llegando a tener una concentración promedio de Hx de 0.091 $\mu\text{mol/g}$ y de TTZ de 0.255 $\mu\text{g/ml}$ para cazón durante el almacenamiento, para la mojarra con una concentración de Hx de 0.832 $\mu\text{mol/g}$ y de TTZ de 1.459 $\mu\text{g/ml}$.

PRUEBA	X		DS		F calculada		Ds	
	C	M	C	M	C	M	C	M
	pH	6.11	.46	0.035	0.018	1.285	0.33	N
BVT	41.30	24.95	4.090	2.001	3.002	1.127	N	N
Hx	0.091	0.832	0.015	0.114	0.176	25.189	N	S
TTZ	0.255	1.459	0.109	0.386	17.91	2.111	S	N
CE	165.5	1,592	32.27	399.4	0.729	72.42	N	N

Tabla 3.7.2 Valores del análisis estadístico global para cazón y mojarra en congelación a -16°C, Hartley's (0.01%), F de tablas 16.69

Análisis Global

En los resultados estadísticos globales (valores de ambas especies en dos tratamientos) presentados para cazón y mojarra, no se encontró diferencia significativa para la determinación de pH y CE entre las especies en los 5 lotes. En contraste se estableció diferencia significativa para los parámetros de BVT, Hx y TTZ entre las especies, esto sugiere que las especificaciones de las normas no son válidas. Por lo cual sería conveniente realizar especificaciones de calidad de acuerdo a la especie (Elasmobranquio y Teleosteo) y condiciones de almacenamiento. A continuación se presenta un ejemplo del análisis estadístico global (Lote 4, Anexo I).

PRUEBA	X		DS		F calculada	D _s
	C	M	C	M		
pH	6.305	6.49	0.098	0.0185	3.573	N
BVT	59.29	28.35	9.605	2.741	9.591	S
Hx	0.311	0.832	0.096	0.0817	17.085	S
TTZ	1.046	4.164	0.302	0.995	8.979	S
CE	11,924	31,423	6,825	10,301	2.489	N

Tabla 3.7.3 Valores del análisis estadístico global para cazón y mojarra
Hartley's (0.01%), F de tablas 7.35

3.7 Análisis y Resultados del Grado de Deterioro

CAZON

A continuación se presentan los valores de pH, Hx y BVT (figura 3.17.1 y 3.17.2, Tabla 3.17), considerando 7 días de almacenamiento en refrigeración a 5°C.

Al comparar los valores obtenidos con la Norma (NOM-027-SSA-1993) (Tabla 3.18) la cantidad inicial y final de BVT, no corresponde con el límite establecido, como se había mencionado anteriormente, los pescados que pertenecen al grupo de elasmobranquios presentan mayor contenido de compuestos nitrogenados no proteícos (CNNP), que en muchos casos son volátiles, es importante establecer otro valor de aceptación para esta especie.

En cuanto al parámetro de aceptación microbiológico ($>10,000,000$ UFC/g), se observó que durante el estudio, se obtuvieron valores menores a dicho límite, por lo que es conveniente establecer para este parámetro de calidad valores de acuerdo a la especie, ya que cada pescado presenta un tipo de contaminación (flora banal, etc.), que causa las alteraciones importantes que lo hace finalmente no apto para consumo.

Cuando se consideran los valores en congelación a -16°C el cazón, mostró valores máximos de Hx y BVT a los 36 días de almacenamiento y un pH ligeramente elevado, cabe hacer notar que estos valores no corresponden al grado máximo de deterioro, la textura se encontraba francamente estropeada. De la misma forma para el deterioro microbiológico no existe correlación entre los recuentos de CE (Cuenta estándar) y los valores de TTZ (Cuenta indirecta), por lo que la determinación de estos parámetros no resultan indicativos del grado de deterioro en esta condición.

Con el objeto de definir con mayor precisión el tiempo límite de consumo del cazón (elasmobranquio), se debe prolongar el período de almacenamiento en refrigeración hasta que se pueda observar la caída del valor de Hx.

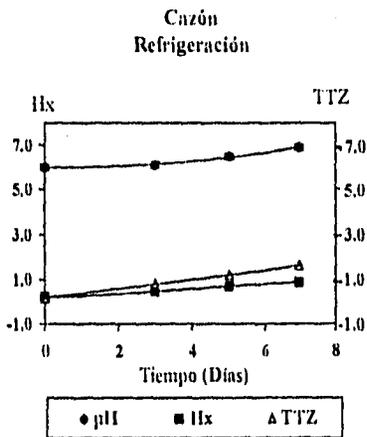


Fig. 3.17.1 Evolución del deterioro en los diferentes parámetros, durante el almacenamiento en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

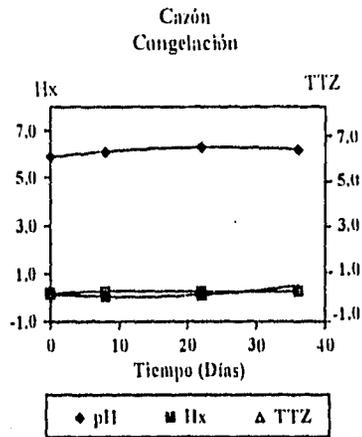


Fig. 3.17.2 Evolución del deterioro en los diferentes parámetros, durante el almacenamiento en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tratamiento	Día	pH	Hx (μmol/g)	TTZ (μmol/ml)	CE (UFC/g)	BVT (mg/100g)
Inicial	0	6.0	0.205	0.170	2,888	29.49
Refrigeración 5°C	7	6.9	0.858	1.619	39,900	109.5
Congelación -16°C	36	6.2	0.270	0.040	7,092	53.78

Tabla 3.17 Límites de aceptación experimentales para el cazón en los diferentes tratamientos.

pH	Hx	CE	BVT
> 6.5	> 1 μmol/g	> 10,000,000 UFC/g	> 30 mg/100g

Tabla 3.18 Límites de aceptación teóricos (NOM-027-SSA1-1993)

• No existe correlación

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

MOJARRA

Tomando como base la especificación que existe de la norma en BVT de $>30\text{mg}/100\text{g}$ (NOM-027-SSAI-1993), se pueden hacer algunas consideraciones; a pesar de que a los 5 días y 7 días de almacenamiento en refrigeración a 5°C el valor cae todavía dentro de especificación (25.89 y $29.01\text{ mg}/100\text{g}$, tabla 3.3 pág. 60), se obtuvo un valor de pH de 6.5, para Hx de $1.233\text{ }\mu\text{mol}/\text{g}$ el cual está fuera de especificación, para CE fue de 80,300 UFC/g que equivale a $3.863\text{ }\mu\text{mol}/\text{ml}$ en TTZ, y el pescado mostraba una franca descomposición. Resulta de suma importancia recalcar, que estos parámetros de las normas no están siendo indicativos del deterioro. Estos valores altos de pH, Hx, CE y TTZ se explican si se analiza que esencialmente provienen de la desaminación de nucleótidos, proteólisis de las proteínas del músculo (actina-miosina), autólisis enzimática llevada a cabo por las enzimas propias del músculo y de las proteínas, degradación de TMAO, todo esto ocasiona una hidrólisis proteínica aumentando los sustratos disponibles para un mayor crecimiento de microorganismos.

Durante la congelación a -16°C en la mojarra, se obtuvieron los valores de pH, Hx y BVT fuera de especificación a los 22 días de almacenamiento.

En cuanto al deterioro microbiano no existe correlación entre los recuentos de CE (Cuenta Estándar) y los valores de TTZ (Cuenta indirecta) en congelación, por lo que la determinación de estos parámetros no son indicativos del grado de deterioro en esta condición.

Se observó que los valores obtenidos son menores en la congelación, porque la disminución de la temperatura reduce la velocidad de las reacciones bioquímicas, pero no inactiva a las enzimas.

A manera de análisis global, tomando en cuenta el deterioro bioquímico, químico, microbiológico y sensorial, se dan las siguientes propuestas para la comercialización (compra-venta) en el mercado de estos productos: para el cazón un pH de 5.8-6.1, BVT de $23.4\text{-}32.48\text{ mg}/100\text{g}$, Hx de $0.017\text{-}0.860\text{ }\mu\text{mol}/\text{g}$, TTZ de $0\text{-}0.365\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ y CE de $18\text{-}8,600\text{ UFC}/\text{g}$.

Asímismo se proponen los siguientes valores: pH de 6.1-6.5, BVT de 9.8-19.88 mg/100g, Hx de 0.039-0.78 $\mu\text{mol/g}$, TTZ de 0.285-4.1 $\mu\text{g/ml}$ y CE de 40-2,260 UFC/g.

Mojarra
Refrigeración

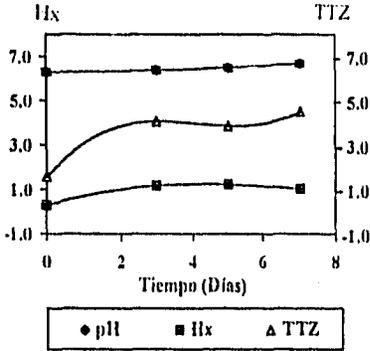


Fig. 3.19.1 Evolución del deterioro en los diferentes parámetros, durante el almacenamiento en refrigeración a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Mojarra
Congelación

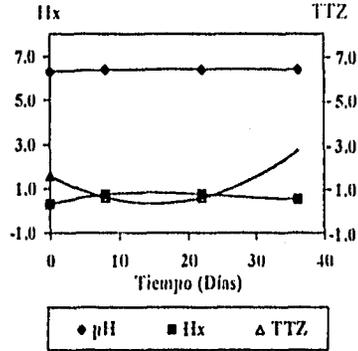


Fig. 3.19.2 Evolución del deterioro en los diferentes parámetros, durante el almacenamiento en congelación a $-16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tratamiento	Día	pH	Hx (μmol/g)	TTZ (μmol/ml)	CE (UFC/g)	BVT (mg/100g)
Inicial	0	6.3	0.293	1.581	1.385	15.80
Refrigeración 5°C	5	6.5	1.233	3.863	80,300	25.89
Congelación -16°C	22	6.4	0.752	0.598	7,460	23.59

Tabla 3.19 Límites de aceptación experimentales para la mojarra en los diferentes tratamientos.

pH	Hx	CE	BVT
> 6.5	> 1 μmol/g	> 10,000,000 UFC/g	> 30 mg/100g

Tabla 3.20 Límites de aceptación teóricos (NOM-027-SSA1-1993)

* No existe correlación

IV. CONCLUSIONES

1. Se encontraron diferencias en la cinética de deterioro bioquímico y microbiológico en las dos especies de pescado.
2. El deterioro fue más rápido para la mojarra que para el cazón, con excepción de la evolución de bases volátiles totales.
3. Tomando como base los índices de deterioro bioquímico, químico, microbiológico y sensorial, se estableció como tiempo límite para el consumo de cazón 7 días, mientras que para mojarra 5 días durante el almacenamiento en refrigeración.
4. El pH no puede ser usado como única medida del grado de frescura, sin embargo los límites pueden dar información del posible deterioro del pescado, así como también la diferencia entre uno fresco y uno en proceso de descomposición.
5. Los niveles iniciales de bases volátiles totales para las especies estudiadas variaron significativamente, se presentan valores iniciales muy elevados para el cazón, encontrándose practicamente en el límite establecido por la norma.
6. Los valores finales de bases volátiles totales para la mojarra no rebasaron los niveles establecidos por la norma, a pesar de que el producto estaba deteriorado, por lo cual se propone establecer normas independientes para cada especie.
7. Las determinaciones de: hipoxantina, bases volátiles totales y el análisis microbiológicos, resultan ser válidos como indicadores del grado de frescura de pescados almacenados en refrigeración, no así las determinaciones de proteínas solubles y volumen de liberación de extracto, las cuales se consideran válidas solamente para el pescado en estado fresco, y no para aquellos sometidos a un tratamiento de conservación en refrigeración o congelación.

8. La energía de activación (E_a) en las reacciones de deterioro estudiadas, representó un significado empírico dificultándose enormemente su interpretación en los alimentos, debido a las múltiples alteraciones que ocurren durante la interrelación entre los diferentes componentes, al igual que tampoco se consideran respuestas microbiológicas (TTZ, CE).
9. En pescados congelados no existe correlación directa entre los recuentos de microorganismos viables y el grado de deterioro microbiano (prueba de TTZ y CE), lo que dificulta la apreciación de la calidad de estos productos. Haría falta estudiar con detalle que tipo de comportamiento óxido-reductor se presenta o si hay factores adicionales en los que los microorganismos produzcan componentes celulares con posibilidad de reducción.
10. La cuantificación de Hx es un parámetro indicativo del deterioro en la calidad del pescado.
11. Considerando de manera integral se propone en este estudio que los valores para venta en el mercado (menudeo-mayoreo) para tomar la decisión de consumo sean de:

PRUEBA	CAZON	MOJARRA
pH	5.8 - 6.1	6.1 - 6.5
BVT	23.4 - 32.4 mg/100g	9.8 - 19.8 mg/100 g
Hx	0.017 - 0.86 $\mu\text{mol/g}$	0.039 - 0.78 $\mu\text{mol/g}$
TTZ	0 - 0.365 $\mu\text{mol/ml}$	0.285 - 4.1 $\mu\text{mol/ml}$
CE	18 - 8,600 UFC/g	40 - 2,260 UFC/g

V. BIBLIOGRAFIA

- Alvarado Ballester, R. y Aguilar Baltar, A., Mundo Animal, Ed. Carroggio, S. A, Barcelona España 1983:69-75, 83-84.
- Borderías, A.J., Tejada, M., Jiménez, F. y Montero, P., El Músculo de Pescado: conservación a bajas temperaturas, *Alimentaria* 1987:25-36.
- Brown, T.L. y Lemay, H. E., Química La Ciencia Central, Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A., 3er. edición, 1987:421-422.
- Burmistrova, O. A., Karapetians, G.S. y Kudriashov, E., Prácticas de Química Física. De. Mir Moscú. URSS 1977:374-375.
- By, N., Jones, J., Murray, M. Livingstone and Murray, C., Rapid estimations of hypoxantine concentrations as indices of the freshness of chill-stored fish, *Journal of Science Food Agriculture* 1964; 15: 763-774.
- Cantillo Beato, J.A. Fernández Torres, C.M. y Nuñez de Villavicencio Ferrer, M. Durabilidad de los Alimentos. Métodos de Estimación, Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, La Habana Cuba 1994: 28, 93-99, 125-130.
- Catálogo de Especies Acuáticas de Importancia Comercial en el Estado de Tabasco., Artes y Métodos de Captura, Gobierno del estado de Tabasco., Secretaría de Desarrollo 1990: 109-110, 251-252.
- Conell, J. J., Control de la Calidad del Pescado., 1a. Ed. de. Acribia, S.A., Zaragoza España 1978:56.
- Damodaran Nambudiri, D., and Gopakumar, K., ATPase and Lactate Dehydrogenase Activities in Frozen Stroed Fish Muscle as Indices of Cold Storage Deterioration, *Journal of Food Science* 1992; 57 (1): 72-76.
- DJ Van Den Heever, and BJ Frey, Microbiological quality of the catfish (*Clarias gariepinus*) kept in treated waste water and natural dam water, *Water SA* 1994; 20 (2): 113-118.
- Egan Harold, S., Kirk, R. and Sawyer, R. Análisis Químico de Alimentos de Pearson., Ed. Compañía Continental, S.A. de C.V., México, 1987:397
- Fauconneau, B. Durante, H., Laroche, M., Marcel, J. and Vallot, D., Growth and meat quality relations in carp., *Aquaculture* 1995: 265-297.

- Fraizer, M. L., Microbiología de los Alimentos, Ed. Acribia., S.A., Zaragoza España 1976: 47-53, 239-250.
- Fennema, Owen R., Introducción a la Ciencia de los Alimentos, Department of Food Science, Ed. Reverte, S.A. Barcelona- Bogotá- Buenos Aires- Caracas- México 1985: 15-45.
- Fereidoon, S., Chong, X., and Dunajski, E., Freshness Quality of Harp Seal (*Phoca groenlandica*) Meat, *Journal Agriculture Food Chemistry* 1994; 42:868-872.
- Gómez, M.C., Cañada, J., Moral, A., El valor K como índice de calidad del pescado. I. Fundamentos y factores que lo modifican, *Alimentaria* 1990:37-45
- Gould, E. and Peters, J.A. On testing the Freshness of Frozen Fish, Ltd., Grosvenor Press, *Eyre and Spottiswoode* 1971:80
- Greene, D.H., Babbit, J.K., and Reppond K.D., Patterns of Nucleotide Catabolism as Freshness Indicators in Flatfish from the Gulf of Alaska, *Journal of Food Science* 1990; 55 (5): 1236-1238.
- Guyton C, Arthur, Tratado de Fisiología Médica, 7a. Ed., Interamericana Mc Graw Hill, 1986: 121-126.
- Handumrongkul, C., and Silva, J.L., Aerobic Counts, Color and Adenine Nucleotide Changes in CO Packed Refrigerated Striped Bass Strips, *Journal of Food Science* 1994; 59 (1): 67-69.
- Jay, James M., Microbiología de los Alimentos, Ed. Acribia S.A., Zaragoza España, 1994: 237-266.
- Kietman, U., Priebe, K. and Reichtein K., Inspección Veterinaria del Pescado, Ed. Acribia, S.A., Zaragoza España 1974: 326.
- Krzymien, M.E., and L. Elias, Feasibility Study on the Determination of Fish Freshness by Trimethylamine Headspace Analysis, *Journal of Food Science* 1990; 55 (5): 1228-1232.
- Lowe, T.E., Ryder, J.M., Carragher, J.F., and Wells, R.M.G., Flesh Quality in Snapper, *Pagrus auratus*, Affected by Capture Stress, *Journal of Food Science* 1993; 58 (4): 770-773.
- Luong, J.H.T., Male, K.B., Masson, C., and Nguyen, A.L., Hypoxanthine Ratio Determination in Fish Extract Using Capillary Electrophoresis and Immobilized Enzymes, *Journal of Food Science* 1992; 57 (1): 77-81.
- Lythgol, J. and Gillian., Fishes of the sea, The MIT Press, United Kingdom 1991:300.
- Macouzet, M. y Rodriguez, M., Organización estructural y composición química del pescado, Departamento de Alimentos y Biotecnología., Fac. de Química, UNAM 1992.

- Macouzet, M. y Rodríguez, M., Naturaleza de la descomposición del pescado, Departamento de Alimentos y Biotecnología., Fac. de Química, UNAM 1993.
- Minelli, A. Nueva Enciclopedia del Reino Animal. Peces 1., Promociones Editoriales Mexicanas S.A. de C.V., Instituto de Biología Animal, Universidad de Padua, Italia 1983:43-58.
- Moral Rama, A. Tendencias Actuales en el Control de la Calidad de Pescados Destinados a la Elaboración de Productos del Mar, *Alimentaria* 1989: 29-38.
- Moral Rama, A. y Beltrán, A., Tecnologías usadas en el pescado y su Influencia sobre la calidad, *Alimentaria* 1989: 37-45.
- Moreno, B., Díez, V., García, Ma. L., Menes, Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de análisis microbiológicos, 2a. ed., Editorial Acribia, Zaragoza España 1989; 1: 5-7.
- Mossel, A. A., Moreno, García, B., Microbiología de los Alimentos (Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los Alimentos), 1er. ed., Editorial Acribia, S.A., Zaragoza España 1990: 77-93.
- Nelson, S. L., Fishes of the World, John Wiley and Sons, 2nd., USA 1984:300.
- Nickerson, John T., Sinkey, Anthony J., Microbiología de los Alimentos y sus procesos de elaboración, Ed. Acribia, S.A., Zaragoza España 1980: 144-149.
- Nicol, J.A., The Biology of Marine Animals, Interscience Publishers, Inc., Nueva York, 1970: 14-19, 250-281, 329-368, 390-396.
- **NOM-027-SSAI-1993.** Bienes y Servicios Productos de la Pesca. Pescados frescos refrigerados y congelados. Especificaciones Sanitarias.
- Official Method of Analysis of the Association of Official analytical Chemistry (AOAC) 15 th., ed. Washington D.C. 1990.
- Otsuka, Y., Tanaka, S., Nishigaki, K., and Miyagawa, M., Change in the Contents of Arginine, Ornithine, and Urea in the Muscle of Marine Invertebrates Stored in Ice, *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992; 56 (6): 863-866.
- Reddy, N.R., Schreiber, C.L., Buzard, K.S., Skinner, G.E., and Armstrong, D.J., Shelf Life of Fresh Tilapia Fillets Packaged in High Barrier Film with Modified Atmospheres, *Journal of Food Science* 1994; 59 (2): 260-264.
- Reino, W. Korhonen, Tyre C. Lanier and Giesbrecht, F., An Evaluation of Simple Methods for Following Rigor Development in Fish, *Journal of Food Science* 1990; 55 (2): 346-348.

- Rojas Gil, E., Variación de Calidad en Pescados por los Procesos de Congelación, *Alimentaria* 1988: 53-60.
- Soliman, Y. y Shenouda, K., Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh, *National Marine Fisheries Service* 1980: 275-311.
- Tapani, H., Marti, K., Patterns of Adenosine Triphosphate Catabolism as Freshness Indicators in Fish Species from the Baltic Sea, *Journal of Food Science Agriculture* 1992; 58: 485-488.
- Valdivia López, M.A. e Iturbe Chiñas, F.A., Verificación de la calidad en carne y pescados frescos. Depto. de Alimentos y Biotecnología. Fac. de Química, UNAM 1993.
- Van den Heever, B. J. and Frey, B. j. Microbiological quality of the cattish (*Clarias gariepinus*) kept in treated waste water and natural dam water, *Water S.A.* 1994; 20 (2): 113-118.
- Vera Yankah, V., Ohshima Toshiaki, O., and Koizumi, C., Effects of Processing and Storage on Some Chemical Characteristics and Lipid Composition of a Ghanaian Fermented Fish Product, *Journal of Food Science Agriculture* 1993; 63: 227-237.
- Watanabe, E., Nagumo, A., Hoshi, M., Konagaya, S., and Tanaka, M., Microbial Sensors for the Detection of Fish Freshness, *Journal of Food Science* 1987; 52 (3): 592-595.
- Yaw, J., Owusu-Ansah and Hultin, O.H., Differential Insolubilization of Red Hake Muscle Proteins During Frozen Storage, *Journal of Food Science* 1992;57 (2): 265-266.
- Ier. Simposio Internacional. Educación y Organización Pesqueras, Cancún- Quintana Roo- Mérida Yucatán- Cd. del Carmen- Campeche 1979;3.

ANEXO I

Determinación Lote 4

Page 4 DETERMINACION 4

11/14/76

Number of cases read = 40 Number of cases listed = 40

Page 5 DETERMINACION 4

11/14/76

This procedure was completed at 12:00:12

VARIABLE LABELS V1 'ESPECIE'
 V2 'CONDICION'
 V3 'REPETICION'
 V4 'pH'
 V5 'VLE'
 V6 'HK'
 V7 'TTZ'
 V8 'CE'
 V9 'PS'
 V10 'BVT'

VALUE LABELS V1 1 'CAZON'
 2 'MOJARRA'
 V2 1 'TIEMPO 0'
 2 'TEMPERATURA AMBIENTE'
 3 'TIEMPO 0'
 4 'REFRIGERACION 1'
 5 'REFRIGERACION 2'
 6 'REFRIGERACION 3'
 7 'TIEMPO 0'
 8 'CONGELACION 1'
 9 'CONGELACION 2'
 10 'CONGELACION 3'
 11 'TIEMPO 0'
 12 'TEMPERATURA AMBIENTE'
 13 'TIEMPO 0'
 14 'REFRIGERACION 1'
 15 'REFRIGERACION 2'
 16 'REFRIGERACION 3'
 17 'TIEMPO 0'
 18 'CONGELACION 1'
 19 'CONGELACION 2'
 20 'CONGELACION 3'
 V3 1 'REPETICION 1'
 2 'REPETICION 2'

DISPLAY.

Page 6 DETERMINACION 4

11/14/76

V1	-	ESPECIE
V2	-	CONDICION
V3	-	REPETICION
V4	-	pH
V5	-	VLE
V6	-	HK
V7	-	TTZ
V8	-	CE
V9	-	PS
V10	-	BVT

TITLE 'DETERMINACION 4'.

DATA LIST FIXED /V1 1 V2 2-3 V3 4 V4 6-8 V5 10-11 V6 13-17 V7 19-24 V8 26-32
 V9 33-36 V10 38-42.

FORMATS V4(F3.1) V6(F3.0) V7 (F6.0) V9 (F4.2) V10 (F5.1).

BEGIN DATA.

40 cases are written to the uncompressed active file.

This procedure was completed at 11:59:37
 LIST.

Page 2 DETERMINACION 4 11/14/96

V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
1	1	1	6.1	14	.066	.325	214	3.12	32.2
1	1	2	6.0	16	.062	.185	18	3.55	29.4
1	2	1	7.5	10	1.279	4.574	100000	2.34	183.4
1	2	2	7.5	12	1.452	4.035	100000	3.24	154.0
1	3	1	6.1	14	.066	.225	214	3.12	32.2
1	3	2	6.0	16	.062	.185	18	3.55	29.4
1	4	1	6.4	16	.226	3.098	206	3.10	66.6
1	4	2	6.1	19	.176	.704	64	3.96	37.8
1	5	1	6.3	14	.274	1.621	3640	2.70	70.0
1	5	2	6.1	20	.173	1.163	1800	3.69	42.0
1	6	1	6.6	12	1.038	1.402	20600	2.70	113.4
1	6	2	6.5	15	.560	1.462	10400	2.84	63.0
1	7	1	6.1	14	.086	.225	214	3.12	32.2
1	7	2	6.0	16	.062	.185	18	3.55	29.4
1	8	1	6.1	22	.071	.000	90	1.78	44.0
1	8	2	6.0	22	.100	.000	140	3.29	39.2
1	9	1	6.3	13	.082	.604	136	2.02	42.0
1	9	2	6.1	27	.109	.844	320	3.87	33.2
1	10	1	6.2	14	.040	.185	190	1.97	45.8
1	10	2	6.1	20	.187	.000	216	2.65	44.8

Page 3 DETERMINACION 4 11/14/96

V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
1	11	1	6.4	11	.333	1.622	2080	3.25	18.3
1	11	2	6.5	10	.357	4.055	2260	3.11	19.8
1	12	1	6.6	10	.792	17.740	100000	2.77	57.4
1	12	2	6.7	13	.762	14.620	100000	4.00	64.4
1	13	1	6.4	11	.333	1.622	2080	3.25	18.3
1	13	2	6.5	10	.357	4.055	2260	3.11	19.8
1	14	1	6.4	14	1.000	4.993	3460	4.02	26.0
1	14	2	6.5	12	1.095	4.973	3520	3.82	23.6
1	15	1	6.5	12	1.395	3.550	100000	3.57	28.0
1	15	2	6.6	13	1.107	4.434	100000	4.06	31.7
1	16	1	6.6	12	1.104	4.813	100000	3.33	29.4
1	16	2	6.5	10	1.362	5.132	100000	3.77	30.8
1	17	1	6.4	11	.333	1.622	2080	3.25	18.3
1	17	2	6.5	10	.357	4.055	2260	3.11	19.8
1	18	1	6.4	14	.334	.704	626	3.98	25.6
1	18	2	6.5	14	.650	1.163	650	4.15	27.0
1	19	1	6.4	17	.996	.943	612	3.20	24.0
1	19	2	6.5	27	1.173	1.342	472	5.32	19.6
1	20	1	6.5	12	.951	.704	2760	3.57	25.2
1	20	2	6.5	15	1.155	1.143	3260	3.29	25.2

This procedure was completed at 12:02:02
 ONEWAY V6 BY V1(1,2) /STATISTICS ALL.

----- ONEWAY -----

Variable V6 Hh
 By Variable V1 ESPECIE

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	1	2.7166	2.7166	17.0851	.0002
Within Groups	38	6.0466	.1591		
Total	39	8.7631			

----- ONEWAY -----

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
GRU 1	20	.3113	.4297	.0961	.1102 To .5124
GRU 2	20	.8227	.3655	.0817	.6617 To 1.0037
Total	40	.5720	.4741	.0750	.4204 To .7236
Fixed Effects Model					.7989 To .6997
Random Effects Model					.2607 To 2.0845
Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance					.1280

Group	Minimum	Maximum
GRU 1	.0400	1.4520
GRU 2	.3200	1.2950
Total	.0400	1.4520

Tests for Homogeneity of Variances

Cochran's C = Max. Variance/Sum of Variances = .0807, F = .487 (Approx.)
 Bartlett-bow. F = .464, F = .487
 Minimum Variance = Minimum Variance = 1.300