EFECTO DEL ERITORBATO DE SODIO EN EL DESARROLLO DE RANCIDEZ OXIDATIVA EN FILETES DE PACÚ (*Colossoma macropomum*) CONGELADOS

Por

OSCAR ELIECER CABARCAS-NÚÑEZ

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

En

Ciencia y Tecnología de Alimentos

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2007

Aprobado por:

_____	_____
John M. Kubaryk, Ph.D. Miembro, Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Marco De Jesús, Ph.D. Miembro, Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Dallas E. Alston, Ph.D. Miembro, Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Emilio Díaz, Ph.D. Director, Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Edna Negrón de Bravo, Ph.D. Coordinadora del programa	Fecha
_____	_____
Nairmen Mina, Ph.D. Representante de Escuela Graduada	Fecha

ABSTRACT

Fish consumption is highly recommended as a healthy alternative to replace saturated fats in diets, due to its high poly-unsaturated fatty acids content. However, this poly-unsaturation makes them more susceptible to autooxidation, causing rancidity in the product, which generates subproducts whose characteristics give bad odor and taste to the food. Antioxidants such as sodium erythorbate are widely used in the food industry to reduce or avoid this oxidative rancidity. The main objective of this study was to determine the feasibility of using sodium erythorbate as an antioxidant agent to avoid the oxidative rancidity of *Colossoma macropomum* ("pacú"), and determine its effect throughout different product storage times. An average freezing curve was determined for the Pacú fillets; this curve established the water content during freezing (-0.2^{o}C to -4^{o}C) which determined the storage temperature. Pacú fillets were randomly distributed in the following treatments: 4 sodium erythorbate concentrations (0, 5, 500, and 50,000 ppm) and 4 storage times (0, 2, 4, and 6 months). The fillets were stored in plastic bags and frozen at -8°C. Proximal analysis of the fillets determined no variation in the fat content and a slight decrease in humidity throughout the storage times. HPLC analysis of aqueous extracts of the fillets showed low sodium erythorbate absorption in all the fillets. The volatile components were extracted from the fish samples via solid phase microextraction (SPME) and hexanal was determined using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The GC-MS analysis indicated the presence of hexanal during the second month of storage, observing a higher concentration of hexanal in the fillets with lower concentrations of erythorbate. This relationship between the sodium erythorbate concentration and hexanal production suggests that sodium erithorbate has an antioxidant effect on the polyunsaturated fatty acids of the pacú fillet. Hexanal concentration decreased considerably after the second month, suggesting its degradation to hexanoic acid and/or other products. A sensorial panel established the acceptability of the fish

stored containing sodium erythorbate, and identified the control fillets (0 ppm erythorbate) as having no rancidity. These results do not agree with the hexanal analysis, which suggest the lower the erythorbate concentration used, the higher the hexanal production.

RESUMEN

El consumo de pescado es muy recomendado como una alternativa saludable para reemplazar las grasas saturadas en las dietas, debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, esta insaturación los hace más susceptibles a autooxidación, causando rancidez en el producto y generando subproductos que proporcionan mal olor y mal sabor a los alimentos. Antioxidantes como el eritorbato de sodio son ampliamente utilizados en la industria de alimentos para evitar y/o reducir esta rancidez oxidativa. El objetivo principal de este estudio fue determinar la posibilidad de usar eritorbato de sodio como antioxidante para evitar la rancidez oxidativa del *Colossoma macropomum* (‘pacú”) y ver su efecto a través de diferentes tiempos de almacenamiento del producto. Se hizo una curva de congelación promedio de filetes del pacú, donde se estableció el intervalo del contenido de agua en el producto (-0.2˚C hasta -4˚C) durante la congelación, para determinar la temperatura de almacenamiento. Filetes de pacú fueron distribuidos aleatoriamente entre los siguientes tratamientos: 4 concentraciones de eritorbato (0, 5, 500, y 50000 ppm) y 4 tiempos de almacenamiento (0, 2, 4 y 6 meses). Los filetes se almacenaron en bolsas plásticas y se congelaron a -8°C. Análisis proximal de los filetes determinó que el contenido de grasa no tuvo variación y la humedad disminuyó levemente a través de los tiempos de almacenamiento. Análisis de HPLC de extractos acuosos de los filetes mostró una baja absorción del eritorbato de sodio en todas las muestras. Se extrajeron los componentes volátiles de las mueatras de pescado mediante microextracción en fase sólida (SPME) y se determinó hexanal mediante cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masa (GC-MS). El análisis de GC-MS indicó la presencia de hexanal durante el segundo mes de almacenamiento, observándose una mayor concentración de hexanal en los filetes con concentraciones más bajas del eritorbato. Esta relación entre las concentraciones de eritorbato de sodio y la cantidad de hexanal producido sugiere que el eritorbato de sodio tiene un

efecto antioxidante sobre los ácidos grasos poliinsaturados del pescado. La concentración de haxanal disminuyóconsiderablemente después del segundo mes, lo que sugiere su degradación a ácido hexanoico y/u otros productos. Un panel sensorial estableció la aceptabilidad del pescado almacenado para las muestras que contenían eritorbato de sodio, y no detectó rancidez oxidativa en la muestra control (0 ppm). Estos resultados no coinciden con el análisis de hexanal, el cual sugiere que a menor contenido de eritorbato de sodio, mayor producción de hexanal.

DEDICATORIA

Para mi Familia

!A ti, mi Manuela, a Keyla y Ronaldo, para mi lo son todo!
Una vez mas gracias por la espera. Su distancia fue el examen más difícil de pasar, pero al final aquí estoy incólume en mis votos por ustedes.

A mi querida y entrañable madre, preocupada hasta por mis preocupaciones, tal vez ella es la más feliz con este logro.
Gracias por tenerme siempre en tus oraciones y tus bendiciones.
Justo vino a tocarme una mama como tú.
Gracias Señor.

A mis hermanos Alexis, Rita y Camilo, gracias por su apoyo y preocupación.

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a la persona que ha hecho posible la culminación de esta meta, a mi hermano Alexis, por su apoyo a pesar de las dificultades, quien hizo posible mi presencia en Puerto Rico.

Deseo dar las gracias al Dr. Emilio Díaz por darme la oportunidad de trabajar en su proyecto, su apoyo y paciencia durante la evolución del mismo. A la profesora Maritza de Jesús por ser generosa y desinteresada en sus aportes que facilitaron mi trabajo durante la investigación, especialmente en las técnicas instrumentales. Doy las gracias al Dr. Fernando Pérez Muñoz, por su vocación de servicio desinteresado. En el camino encontramos pocas personas como él, pero no es casual encontrarlas.

Quiero dar las gracias al Dr. Nairmen Mina por ser amigo y consejero especialmente en momentos difíciles de mi paso por Puerto Rico.

Estoy muy agradecido con el Dr. Dallas Alston por bridarme su apoyo logístico, su confianza y su calidad humana. Agradezco al Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, a la Dra. Edna Negrón, a doña Besie, al personal administrativo, profesores, y a los compañeros estudiantes que contribuyeron al mejoramiento de mi carrera profesional. Doy gracias a los Drs. Marco de Jesús y John Kubaryk por su apoyo y colaboración durante el desarrollo del estudio. Agradezco al Dr. Francis Patrón por su apoyo y confianza.

Estoy muy agradecido al Departamento de Química, incluido el personal administrativo, profesores, empleados y estudiantes.

TABLA DE CONTENIDO

Página

ABSTRACT ii

RESUMEN iv

DEDICATORIA vi

AGRADECIMIENTOS vii

TABLA DE CONTENIDO viii

LISTA DE TABLAS xi

LISTA DE FIGURAS xii

LISTA DE APÉNDICES xiii0

1. INTRODUCCIÓN 1

2. REVISIÓN DE LITERATURA 3

2.1. Importancia del pescado como fuente de grasas poliinsaturadas 3

2.2. Rancidez 3

2.3. Rancidez oxidativa 5

2.3.1. Iniciación 6

2.3.2. Propagación 6

2.3.3. Terminación 9

2.4. Antioxidantes 13

2.4.1. Efecto del antioxidante en la autooxidación 13

2.4.2. Eritorbato de sodio 14

2.5. Pacú (*Colosomma macropomun*) 15

2.6. Análisis proximal del pacú 17

2.7. Congelación y descongelación del Pacú. 18

2.7.1. Congelación de un alimento 18

2.7.2. Descongelación de un alimento 20

2.8. ANÁLISIS QUÍMICOS 21

2.8.1. Determinación de eritorbato de sodio por cromatografía líquida de alta eficacia. 21

2.8.2. Determinación de hexanal por medio de extracción y caracterización de GC - MS. 24
2.8.2.1. Extracción de componentes volátiles por microextracción de fase sólida (SPME). 26
OBJETIVOS *28*
Objetivo general **28**
Objetivos específicos **28**
3. MATERIALES Y MÉTODOS *29*
3.1. Determinación de la temperatura de congelación de los filetes de pacú. **29**
3.2. Recolección de las muestras **30**
3.3. Tratamiento de los filetes y almacenamiento **30**
3.4. Preparación de las muestras **31**
3.5. Análisis químicos **31**
3.5.1. Determinación del contenido de humedad 32
3.5.2. Determinación del contenido de grasa 32
3.5.3. Determinación del contenido de eritorbato de sodio 33
3.5.3.1. Identificación del eritorbato de sodio en las fracciones del cromatograma. 33
3.5.3.2. Extracción del eritorbato de sodio 34
3.5.3.3. Cuantificación de eritorbato de sodio mediante cromatografía líquida de alta eficacia ("HPLC") 35
3.5.3.4. Preparación de la curva estándar 36
3.5.4. Determinación de hexanal mediante microextracción de fase sólida (SPME) y análisis por cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS) 36
3.5.4.1. Extracción mediante microextracción de fase sólida ("SPME") 37
3.5.4.2. Caracterización de hexanal 38
3.6. Análisis sensorial **39**
3.6.1 Adiestramiento de panelistas 40
3.6.2. Preparación de las muestras de pescado 40
3.7 Análisis estadísticos **41**
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN *43*
4.1. Elaboración de la curva de congelación del pescado **43**
4.2. Análisis proximal **46**
4.2.1. Determinación del contenido de humedad 46

4.2.2. Determinación del contenido de grasa 48
4.3. Cuantificación de eritorbato de sodio mediante cromatografía liquida de alta eficacia (HPLC). 50
4.4. Cuantificación y caracterización de hexanal mediante SPME/GC-MS 53
4.4.1. Cuantificación de hexanal mediante SPME-GC/MS 54
4.5. Análisis sensorial 59
5. CONCLUSIONES 61
6. RECOMENDACIONES O TRABAJOS FUTUROS 63
7. LITERATURA CITADA 64
8. APÉNDICES 70

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Valores de talla (cm), peso (kg) y altura (cm) de Pacú.....17
Tabla 2. Condiciones utilizadas durante el análisis de eritorbato de sodio por HPLC.....35
Tabla 3. Condiciones utilizadas por cromatografía líquida en la cuantificación del eritorbato de sodio.....39
Tabla 4. Combinaciones del panel sensorial de la prueba de ordenamiento simple para detectar rancidez oxidativa en filetes "pacú" tratados con diferentes concentraciones de eritorbato de sodio: A-50,000 ppm; B-50 ppm; C-5 ppm y D-0 ppm.....41
Tabla 5. Composición proximal de los filetes de pescado ("pacú").....47
Tabla 6. Resultados de eritorbato de sodio por HPLC. 52
Tabla 7. Producción de hexanal en los filetes de pescado (pacú) en las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio, durante seis meses de almacenamiento. Donde (*), representa las áreas (uA).....54
Tabla 8. Producción de hexanal en los filetes de pescado (pacú) en las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio, durante el segundo mes de almacenamiento. Donde A = 50,000 ppm; B = 500 ppm; C = 5 ppm y D = 0 ppm.....56
Tabla 9. Resultados de la prueba de comparaciones múltiples.....59
Tabla 10. Resultados de la evaluación sensorial de la prueba de ordenamiento simple.....60

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Productos secundarios obtenidos en la autooxidación 8
Figura 2. Triglicérido que contiene ácidos grasos insaturados. Ácido palmítico, 16:0 en la posición 1; EPA (eicosapentanoico), 20:5, en la posición 2; ácido oleico, 18:1, en la posición 3. 12
Figura 3. Ácido graso poliinsaturados. EPA: [1]acido eicosa-5:811:14:17-pentanoico ó 20:5 ω^3. 12
Figura 4. Estructura del eritorbato de sodio. 15
Figura 5. Curva de congelación del agua pura. 19
Figura 6. Curva de congelación de un alimento. 20
Figura 7. Diagrama del funcionamiento del equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). 23
Figura 8. Diagrama del funcionamiento del equipo de cromatografía de gas acoplado a un espectrómetro de masa (GC-MS). 25
Figura 9. Termopares conectados al filete "de pacú".....29
Figura 10. Midi logger (Modelo No. GL450-UM-151).....30
Figura 11. Equipo liofilizador.....33
Figura 12. Equipo de resonancia magnética nuclear (RMN).....34
Figura 13. Equipo de cromatografía liquida (HPLC). 36
Figura 14. Extracción de volátiles del "headspace" mediante la aguja de microextracción de fase sólida (SPME).....38
Figura 15. Cromatógrafo de gas acoplado a un espectrómetro de masa (GC-MS). 39
Figura 16. Curva de promedio congelación del "pacú" con los diferentes termopares colocados en diferentes partes de cada filete de pescado (pacú). 43
Figura 17. Curvas de congelación y descongelación del "pacú". 44
Figura 18. Etapas de la curva promedio de congelación del pescado. 46
Figura 19. Contenido promedio de humedad en cada uno de los tiempos de almacenamiento del pescado. 47
Figura 20. Contenido de la humedad a través de los tiempos de almacenamiento y las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio. 48
Figura 21. Resultados del contenido de grasa en los filetes de pescado ("pacú") a través de los diferentes tiempos de almacenamiento con las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio. 49
Figura 22. Comparación del espectro del eritorbato de sodio por resonancia magnética nuclear con los respectivos tiempos de retención.....50
Figura 23. Contenido promedio de eritorbato de sodio en la muestra en los diferentes tiempos de almacenamiento. 51
Figura 24. Contenido de eritorbato de sodio en las muestras de pescado (pacú) durante los diferentes tiempos de almacenamiento, por HPLC. 53
Figura 25. Producción hexanal en los diferentes tiempos de almacenamiento y las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio, detectados a través de GC-MS. 55
Figura 26. Producción de hexanal en los filetes de pescado (pacú) en diferente concentración de eritorbato de sodio durante seis meses de almacenamiento. 57
Figura 27. Contenido de hexanal vs tiempo de oxidación (Navarro-García 2002).....58

LISTA DE APÉNDICES

Página

Apéndice 1. Cromatograma característico del eritorbato de sodio por resonancia magnética nuclear (RMN).....70
Apéndice 2. Hoja de la evaluación sensorial de los panelistas. 71
Apéndice 3. Curva de congelación de la parte que más tiene músculo. 72
Apéndice 4. Curva de congelación de la parte intermedia del musculo. 72
Apéndice 5. Curva de congelación de la parte que menos tiene musculo.....73
Apéndice 6. Ubicación de los termopares en el filete congelado 73
Apéndice 7. Composición proximal promedio de los filetes de pescado (pacú). 74
Apéndice 8. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) del contenido de humedad. 74
Apéndice 9. Resultados promedio del contenido de humedad.....75
Apéndice 10. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) del contenido de grasa. 75
Apéndice 11. Resultados promedios del contenido de grasa. 76
Apéndice 12. Curva de calibración para la cuantificación del eritorbato de sodio por HPLC. ...76
Apéndice 13. Resultados del eritorbato de sodio encontrados por cromatografía liquida (HPLC). 77
Apéndice 14. Análisis de varianza (ANOVA) de la prueba de cromatografía liquida (HPLC).....77
Apéndice 15. Cromatograma del hexanal presente en los filetes de pescado con las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio por GC-MS. 78
Apéndice 16. Picos característicos del cromatograma de hexanal por GC-MS. Donde los picos más importantes son: 41, 44, 56, 72 y 82. 79
Apéndice 17. Contenido de hexanal (en área (uA)) presente en el pescado (pacú), por GC-MS, durante los seis meses de almacenamiento.....79
Apéndice 18. Curva para la cuantificación de hexanal mediante el método de adición de estándar en el segundo mes de almacenamiento por GC-MS. Donde B = 500 ppm; (2) = Mes de almacenamiento y (3) = Réplica 80
Apéndice 19. Curva de cuantificación de hexanal mediante el método de adición de estándar en el segundo mes de almacenamiento por GC- MS. Donde D = 0 ppm; (2) = Mes de almacenamiento y (1) = Réplica 80
Apéndice 20. Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados de la prueba de GC-MS. 81
Apéndice 21. Resultados residuales de las concentraciones de eritorbato de sodio durante el segundo mes de almacenamiento.....81
Apéndice 22. Comportamiento lineal de los resultados del segundo mes de almacenamiento obtenidos por GC-MS.....82

1. INTRODUCCIÓN

La preocupación por las grasas, especialmente las saturadas, se debe a la alta correlación entre su consumo y la incidencia de enfermedades cardiovasculares. El pescado es uno de los productos de consumo que aparece como una alternativa importante en el reemplazo de estas grasas en las dietas, debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ácidos grasos omega-3 (ω-3). Entre los omega-3 se encuentran el ácido *α*-linolénico (LNA, por sus siglas en inglés, C18:3) y metabolitos de cadena larga como el ácido eicosapentanoico (EPA C20:5) y ácido docosahexanoico (DHA, por sus siglas en inglés, C22:6), cuyo consumo ha llevado a una reducción en la incidencia de enfermedades coronarias, algunos tipos de cáncer y artritis reumática y en factores importantes en el desarrollo y funciones del cerebro y de la visión (Shahidi y Botta, 1994).

Recientemente se descubrió un nuevo tipo de lípidos antiinflamatorios en los seres humanos, llamados resolvinas E1, los cuales se derivan de los ácidos grasos ω-3 y se encuentran presentes en el aceite de pescado. Las resolvinas son precursores del ácido acetilsalicílico (AAS), principio activo de la aspirina (Serham, 2004; Makoto et al., 2007) y pueden inhibir la migración de las células inflamatorias a los sitios de la inflamación. Sin embargo, estos ácidos grasos poliinsaturados, por tener doble enlace, son susceptibles a la oxidación con oxígeno ó autooxidación. Esta oxidación genera rancidez oxidativa (De Man, 1999; Potter y Hotchkiss, 1995), cuyos productos primarios, tales como: hidroperóxidos y dienos conjugados; productos secundarios que incluye: ácidos carboxílicos, alcanos, alquenos, hidrocarburos y aldehídos (malonaldehído, nonanal, octanal, pentanal y hexanal), los cuales son responsables del mal olor y mal sabor (“off flavors”) de los alimentos (Allen y Hamilton, 1994); y los productos terciarios (radicales libres, cetonas y alcoholes). Además de proporcionales sabor desagradable al pescado, también disminuyen su largo de vida útil.

Para prevenir o reducir la rancidez oxidativa causada por las grasas poliinsaturadas de los alimentos, la industria alimentaria utiliza antioxidantes. Compuestos como el β-caroteno, ácido ascórbico, palmitato de acetato y antioxidantes sintéticos pueden minimizar los efectos de la rancidez en los pescados y son ampliamente utilizados por la industria alimentaria.

El eritorbato de sodio se utiliza como antioxidante en la industria alimentaria principalmente en la carne, el pollo, pescados, bebidas, frutas y vegetales, etc. Químicamente, ésta es una sal de sodio del acido eritórbico, la cual esta reconocida como aditivo seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) por la “Food and Drug Administration” (FDA), de los Estados Unidos. Al igual que la vitamina C, el eritorbato de sodio ayuda a prevenir la formación de nitrosaminas cancerígenas.

En condiciones adecuadas de producción, el pacú puede alcanzar hasta 10% en el contenido de grasa, lo cual convierte a esta especie en una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados y por consiguiente en una matriz idónea para medir el efecto antioxidante del eritorbato de sodio durante el desarrollo de la oxidación. Este estudio se planteó como meta principal la evaluación y determinación del eritorbato de sodio como antioxidante para evitar la rancidez oxidativa de filetes de “pacú” congelados a -8°C.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia del pescado como fuente de grasas poliinsaturadas

La demanda de pescado ha aumentado continuamente desde principios de la década de los 90's debido al incremento en el consumo per cápita a nivel mundial. Este incremento ocurre como consecuencia de los efectos benéficos de las grasa del pescado para prevenir enfermedades cardiovasculares y mejorar el funcionamiento del cerebro y otros órganos vitales del organismo, según la Organización para Alimentos y Agricultura (FAO, por sus siglas en ingles), (FAO, 2004). La producción global de captura de pescado y acuicultura suplió cerca de 133 millones de toneladas de pescado en el 2002, dando un consumo per cápita anual de 16.2 kg de peso vivo de pescado (FAO, 2004). La FAO pronostica que la actual demanda de pescado será duplicada en unos 20 años debido a la necesidad de proveer dietas mas saludables para las personas (con mayor contenido de grasas insaturadas y menos saturadas). Sin embargo, la captura de pescado actual ha superado el máximo de producción sostenible, por lo que la acuicultura ha llegado a ser una de las pocas alternativas para suplir la actual y la futura demanda. Unos de los peces que ha tenido un crecimiento significativo y constante en sistemas de producción de acuicultura, especialmente en Sur América y el Caribe, es el *Colossoma macropomum* (Pacú).

2.2. Rancidez

Las grasas del pescado, al igual que la de otros alimentos, sufren procesos complejos de descomposición llamados de rancidez o enranciamiento por la acción

del aire, el agua o las bacterias. Otros problemas asociados con la oxidación de lípidos incluye deterioro en color y textura (Kanner, 1994).

Existen tres tipos de rancidez: hidrolítica, cetónica y oxidativa. La rancidez hidrolítica es causada por la hidrólisis de triglicéridos en presencia de humedad y conlleva la liberación de ácidos grasos libres, los cuales causan olores desagradables en los productos de consumo. La rancidez cetónica es causada por el ataque de microorganismos al alimento y ocurre en cantidades limitadas de oxígeno y la rancidez oxidativa es causada por el ataque de oxígeno a las grasas insaturadas con el desarrollo de productos oxidados que originan sabores indeseables en los alimentos (Cox, 1962 y Pear et al., 1962). Estos procesos de rancidez afectan negativamente la vida de almacenamiento del producto alimenticio (Frankel, 1993). Por ejemplo, el almacenamiento por 7 días de músculos de lisa en hielo tuvo una mayor producción de ácidos grasos libres que la encontrada en un día de almacenamiento (Deng, 1978). Filetes de salmón se almacenaron en hielo por 1 día (primer grupo) y 7 días (segundo grupo), cada uno de estos grupos se subdividieron en dos y a uno de ellos se sumergió en una solución de antioxidante (0.25% TBHA y Acido ascórbico al 2%), luego fueron congelados a -18°C por 12 meses para estudiar el desarrollo de rancidez oxidativa. En general, Se observó menor nivel de radicales libres y menos desarrollo de rancidez oxidativa en los filetes que contenían la solución de antioxidantes almacenados en hielo por mayor tiempo (7 días) que el grupo sin tratamiento con menor tiempo en hielo (1 día) (Deng, 1978).

Se observó variaciones cinéticas en la oxidación de los lípidos en diversas partes de la Macarela almacenada a -15, -30 y -40°C; fueron analizados por la medición de los compuestos volátiles y de TBA (“thiobarbituric acid”, indicador de rancidez oxidativa) en función del tiempo. El desarrollo oxidativo en las muestras de la piel (grasa subcutánea) resultó ser ocho veces más rápido que la parte interna de la piel (parte oscura) y que el blanco, almacenados a -15°C durante dos meses. Sin

embargo, este rápido desarrollo de rancidez en la piel se inhibe de manera eficaz al reducir la temperatura de almacenamiento a -40 ° C y retrasó la hidrólisis de lípidos en el pescado almacenado a dicha temperatura. Este estudio sugiere que en el desarrollo de rancidez oxidativa toma un papel importante la temperatura de almacenamiento y la cantidad de grasa presente en el pescado, cuyo mayor contenido está presente en la piel (Deng, 1978).

Dado que normalmente el pescado es almacenado en frío, la rancidez hidrolítica y cetónica no ocurren en cantidades significativas. El enfriamiento del pescado hace menos disponible el agua para que ocurra rancidez hidrolítica y además impide la proliferación de microorganismos que causan la rancidez cetónica. Por otro lado, la rancidez por ataque de oxÍgeno (rancidez oxidativa) a las grasas insaturadas del pescado sí puede ocurrir en cantidades apreciables.

2.3. Rancidez oxidativa

La oxidación de ácidos grasos insaturados por oxígeno es conocida como autooxidación (Charalambous, 1993; Allen y Hamilton, 1994), la cual es una reacción de radicales libre que involucra fases de iniciación, propagación (reacción en cadena) y terminación (De Man, 1999). La tasa de oxidación disminuye con la disminución de la temperatura, usualmente por un factor de 2 a 3 por cada disminución de 10°C (Ackman, 1980). La oxidación es llevada a cabo en los ácidos grasos insaturados, de los cuales el oleico, linoleico y linolenico son los ácidos más importantes. Éstos son oxidados a diferentes velocidades. Por ejemplo el ácido linoleico es oxidado 36 veces mas rápido que el ácido linolénico y el ácido oleico. Ésta oxidación puede ocurrir por dos mecanismos: Mecanismo de radicales libres y el mecanismo de fotooxidación (presencia de luz); en ambos casos los productos intermedios son hidroperóxidos. El oxígeno del aire ataca a los dobles enlaces en un proceso progresivo y termina por romper la cadena de carbonos produciendo

compuestos de mal olor. Esta alteración provoca la aparición del “off-flavors” (Ladikos et al., 1998).

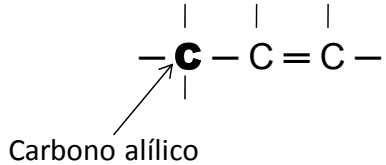
2.3.1. Iniciación

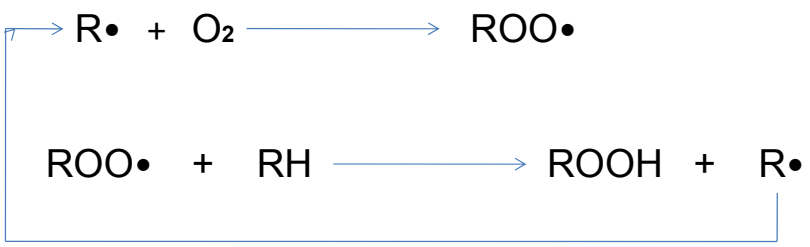
En la etapa de iniciación el hidrogeno es removido de un compuesto olefínico para producir un radical libre, como lo ilustra la reacción de abajo. La remoción del hidrogeno toma lugar en el carbono adyacente a un doble enlace (carbono alílico) y forma un radical libre alílico o algún compuesto radical (De Man, 1999).

2.3.2. Propagación

La formacion de un hidroperóxido depende de la producción de radicales libres (R•) de moléculas lipídicas (RH) por su interacción con el oxígeno en presencia de un catalizador. Su iniciación puede ocurrir por fuentes de energia externa tales como calor, luz, alta enrgía de radiación o por iniciadores químicos que incluyen iones metálicos o metalo-proteínas (Allen y Hamilton, 1994)

Una vez se ha formado el radical, éste se combina con el oxígeno atmosférico para formar un radical peróxido, el cual a su vez puede remover un hidrógeno de un carbono alílico de otra molécula insaturada, dando lugar a la formación de un hidroperóxido y otro radical alílico. Esta reacción se repite y resulta en una reacción en cadena (De Man, 1999).





Los hidroperóxidos formados en la propagación son los productos primarios de la oxidación. Estos compuestos son inestables y se descomponen en productos secundarios de la oxidación, los cuales incluyen una gran variedad de compuestos, dentro de los cuales están los compuestos carbonilos, los más importantes (De Man, 1999). Los productos secundarios incluyen además de ácidos carboxílicos, alcanos, alquenos, hidrocarburos y aldehídos (malonaldehído, nonanal, octanal, pentanal y Hexanal), los cuales son responsables del mal olor y mal sabor (“off flavors”) de los alimentos (Allen y Hamilton, 1994); y los productos terciarios (radicales libres, cetonas y alcoholes).

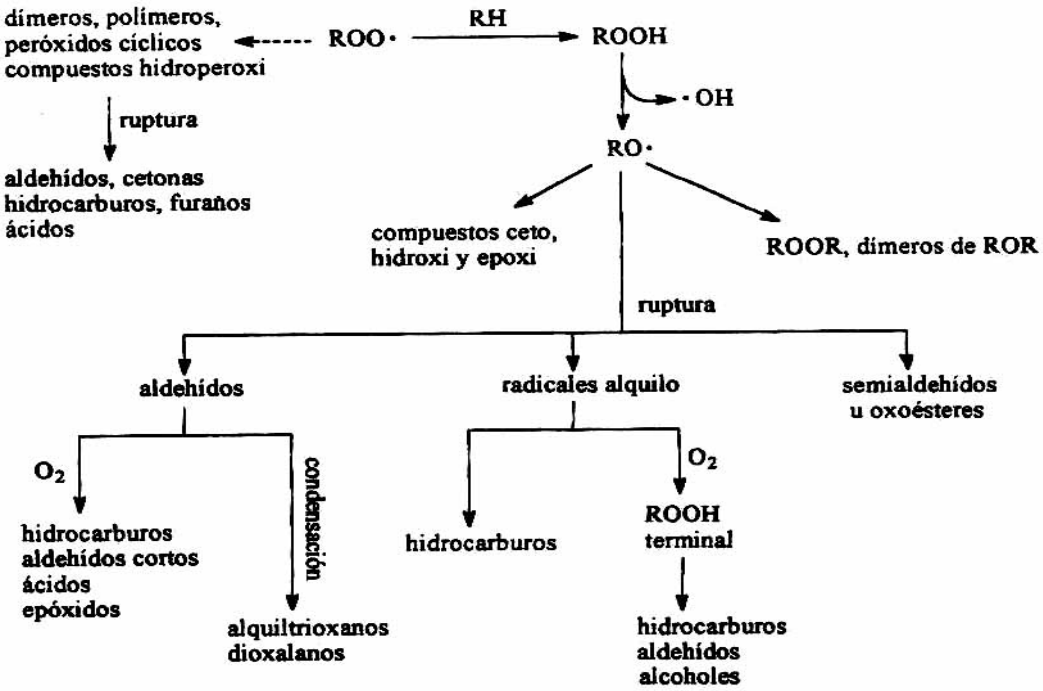
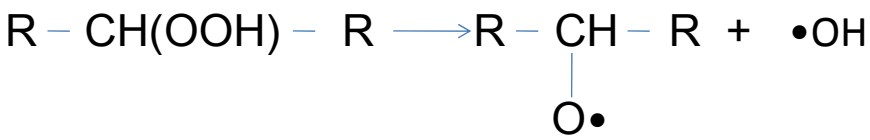


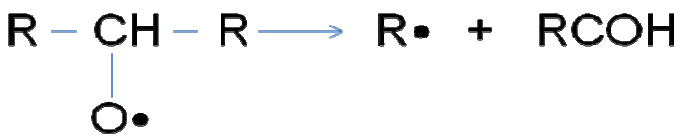
Figura 1. Productos secundarios obtenidos en la autooxidación

Fuente: (Charalambous, 1993).

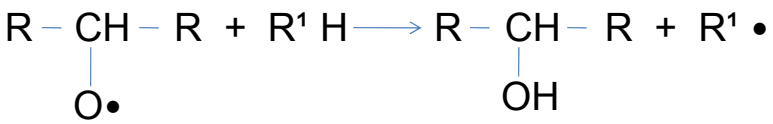
En la etapa inicial de la reacción, la cantidad de hidroperóxidos se incrementa suavemente; esta etapa es llamada periodo de inducción. En el final del periodo de inducción hay un incremento repentino en el contenido de peróxido. Los cambios organoelépticos son más perceptibles en la etapa secundaria de la oxidación. El primer paso en la descomposición de hidroperóxidos envuelve radicales libres hidroxi y alcoxi:



Los radicales libres alcoxi reaccionan para formar aldehídos, así:



Los radicales alcoxi pueden remover átomos de hidrógenos de otra molécula, para producir un alcohol y un nuevo radical:



2.3.3. Terminación

La terminación ocurre cuando radicales libres reaccionan con ellos mismos para generar productos no reactivos y más estables por ejemplo las cetonas. Otra vía que puede concluir la autooxidación es que cualquier clase de radical libre alquílico (R•) reaccione con un radical libre peroxi (RO•) dando lugar a una especie relativamente estable, no-iniciadora y no-propagadora. De forma similar dos radicales libres alquílicos R• pueden unirse también (De Man, 1999), como se exhibe en las siguientes reacciones:

Debido a las características desagradables y al acortamiento de la vida útil del producto, causado por la rancidez oxidativa, la industria de alimentos ha evaluado y utiliza muchos compuestos antioxidantes que ayuden a prevenir la oxidación por oxigeno (Parvin et al.,1996). Los métodos para determinar la oxidación de lípidos han sido divididos en aquellos que miden los productos primarios y los que miden los productos secundarios (Melton 1983; Gray et al. 1992). Entre los productos primarios de la oxidación que se miden se encuentran los hidroperóxidos y los dienos conjugados. La concentración de peróxidos se mide en la oxidación de lípidos; sin embargo, los peróxidos se descomponen fácilmente en productos secundarios y éste valor puede resultar en una sobreestimación del grado de oxidación (Gray y Monohan, 1992) (Figura 1). Cuando ocurre una tasa de oxidación acelerada en alimentos tales como carnes cocidas almacenadas a temperaturas de refrigeración, se lleva a cabo una acumulación de productos secundarios como resultado de la oxidación de lipidos, por lo tanto es mejor evaluar estos productos secundarios (Gray y Monohan, 1992).

La medición de compuestos volátiles ha sido comúnmente empleada para determinar la oxidación de lípidos. Se ha establecido que la presencia de hexanal indica la oxidación de lípidos presentes en la carne más efectivamente que cualquier otro componente volátil (Duppy et al., 1987; Brunton et al., 2000). Éste compuesto se utiliza en estudios de oxidación de lípidos y fue utilizado en éste estudio para tales fines. Por ejemplo, se ha encontrado que en pollo asado almacenado a 4°C, aparecen concentraciones de hexanal desde 0.09 ppm (día 0) hasta 6.9 ppm (día 1), lo cual conlleva a la poca aceptación sensorial del producto debido a la rancidez oxidativa (Duppy et al., 1987).

La importancia del mecanismo de deterioro del pescado congelado es determinada principalmente por el tipo y disposición de lípidos en el pescado. Las grasas de reserva en el músculo están más sujetas a la oxidación, por lo tanto, los mecanismos de descomposición pueden comenzar en estos sitios más rapidamente

cuando hay condiciones inapropiadas de temperatura de almacenamiento. En pescados de alto contenido graso, la oxidación tiene lugar primeramente en los depósitos de grasa, los cuales están compuestos por triglicéridos. Pescados tales como el bacalao, que contiene poca cantidad de grasa en el tejido muscular y contienen lípidos estructurales asociados a las membranas, también están propensos a la oxidación pero más lentamente. El valor de peróxidos reportado para sardinas en aceite con lípidos en la piel, luego de cuatro semanas de almacenamiento a -18ºC, fue cinco veces mayor que el que se determinó en los músculos del pescado; el valor de TBA de la piel fue nueve veces mayor (Fair et al., 1992). Por otra parte, Morris y Dawson (1979) exponen que la carne deshuesada de pescado es más susceptible a la rancidez oxidativa que la carne en forma de filetes, debido a que durante el proceso de deshuesado se arrastra tanto la musculatura roja como la blanca del pescado, lo que facilita el aumento del área superficial y el esparcimiento de agentes prooxidantes.

Los procesos de rancidez oxidativa se ven acelerados luego del proceso de deshuesado mecánico ya que el músculo de pescado se transforma en partículas más pequeñas con lo cual aumenta la superficie efectiva en contacto con el oxígeno del medio. Si la carne presenta mayor cantidad de lípidos, los procesos de rancidez oxidativa se ven altamente acelerados aún con bajas concentraciones de oxígeno en el medio. Por otra parte, la presencia de compuestos hemo altera la estabilidad de la carne deshuesada del pescado en almacenamiento, ya que estos compuestos son agentes prooxidantes de gran importancia (Tappel, 1965).

El contenido de ácidos grasos en alimentos marinos se caracteriza por la presencia de dobles enlaces a lo largo de una cadena de carbonos (ácidos grasos insaturados). La Figura 2 muestra un triglicérido que contiene ácidos grasos insaturados.

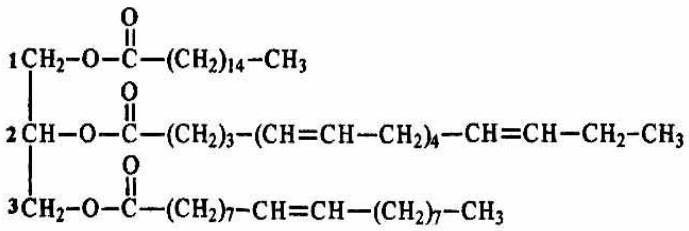


Figura 2. Triglicérido que contiene ácidos grasos insaturados. Ácido palmítico, 16:0 en la posición 1; EPA (eicosapentanoico), 20:5, en la posición 2; ácido oleico, 18:1, en la posición 3.

El término omega-3, desde el punto de vista químico, significa que el primer enlace doble en el carbono de la cadena principal ocurre en el tercer enlace carbono-carbono contando desde la esquina opuesta del grupo acídico, como se observa en la Figura 3. La nomenclatura omega ("ω") es utilizada por los nutricionistas para referirse a los ácidos grasos poliinsaturados que tiene entre 18 y 22 átomos de carbono.

Figura 3. Ácido graso poliinsaturados. EPA: [1]acido eicosa-5:811:14:17-pentanoico ó 20:5 ω^3.

La composición química de los lípidos en el pescado difiere de otras grasas y aceites naturales en lo siguiente: 1) poseen una mayor variedad de compuestos grasos, 2) poseen mayores cantidades de ácidos grasos con cadenas que exceden los 18 carbonos, 3) contienen una mayor porción de ácidos grasos altamente insaturados, 4) sus ácidos grasos poliinsaturados poseen el doble enlace principalmente en la posición ω^3 antes que en la ω^6 (St. Angelo, 1992; Barlow y Stansby, 1982). La cantidad y características de los ácidos grasos varían con el tipo

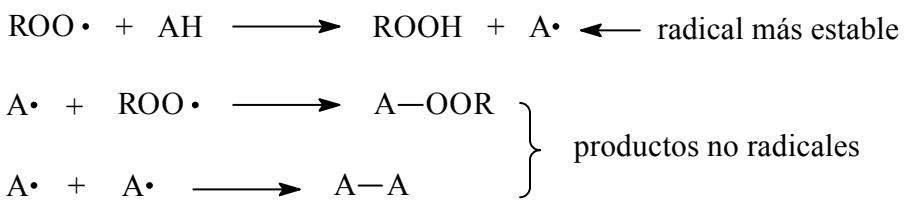
de organismo y de acuerdo a su distribución dentro del mismo (Shahidi y Botta, 1994; St. Angelo, 1992; Allen y Hamilton, 1994; De Man, 1999; Fair et al., 1976).

2.4. Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia capaz de retardar o evitar el desarrollo de rancidez en los alimentos o el deterioro del sabor debido a la oxidación del mismo (Allen y Hamilton, 1994); Cox y Pearson, 1962). Los antioxidantes pueden inhibir la oxidación de lípidos actuando como donantes de hidrógeno o de electrones e interfiriendo con la cadena de reacciones de radicales, formando compuestos no radicales o radicales poco reactivos, evitando o reduciendo la propagación de dichas cadenas (Charalambous, 1993). En ausencia de una adecuada protección por algún agente antioxidante, los lípidos ricos en ácidos grasos poliinsaturados son muy propensos a la autooxidación al quedar expuestos al oxígeno atmosférico. Bajo esas condiciones el beneficio nutricional de los ácidos grasos es disminuido (Cockerell et al., 1972; Chow, 1980). Un antioxidante ideal para uso en alimentos debe ser seguro al utilizarse, no debe impartir olor sabor o color, debe ser efectivo a concentraciones bajas y debe ser fácil de incorporar (Allen y Hamilton, 1994).

2.4.1. Efecto del antioxidante en la autooxidación

La reacción en cadena puede inhibirse o detenerse mediante la incorporación de un antioxidante (AH). El antioxidante actúa como un atrapante de radicales libres; reacciona con el radical y produce un nuevo radical menos reactivo. Los antioxidantes pueden intervenir durante las etapas de propagación, como se ilustra en la figura:



Investigaciones recientes lograron demostrar que tanto ácido ascórbico como eritorbato de sodio inhiben sobre el 65% de la actividad mutagénica de la nitrosodimetilamina (NDMA). Esto sugiere que ambos aditivos, además de inhibir la formación de nitrosaminas, también inhiben la mutagenicidad de los metabolitos generados de las nitrosaminas formadas. Se plantea que el posible mecanismo de inhibición es mediante el "atrapamiento de radicales libres" (Charalambous, 1993).

2.4.2. Eritorbato de sodio

Eritorbato de sodio es un estereoisómero del ácido ascórbico y su nombre sistemático es 5-(1,2-dihidroxietil)-3-hidroxi-4-oxo-furan-2-olato de sodio. Eritorbato de sodio difiere de ácido ascórbico sólo en la posición relativa del hidrógeno y de grupos hidroxilos en el quinto átomo de carbono de la molécula (Figura 4). Se le conoce además como ácido eritórbico, D-ácido araboascórbico, sal de sodio, D-isoascorbato, entre otras. El eritorbato de sodio se obtiene por fermentación de líquidos con azúcar de remolacha y de maíz, tiene un fuerte poder de reducción similar al del acido ascórbico (Walker, 1991). Es un antioxidante usado en la industria de alimentos ya que mejora el color y sabor natural de los alimentos, alarga el periodo de almacenamiento y no tiene efectos tóxicos.

Eritorbato de sodio y ácido ascórbico fueron comparados en un medio para estabilizar el color de la superficie de la carne de ganado vacuno en atmósfera modificada con alto contenido de oxígeno, en diferentes concentraciones (0, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, o 1,5%, peso/peso). El color (L * un * en b *) fue evaluado antes del

tratamiento y 24 horas después de almacenamiento (1 °C). Eritorbato de sodio fue tan eficaz como el ácido ascórbico para inhibir descoloración de la carne y puede ser un sustituto eficaz del ácido ascórbico debido a los mas bajos costos (Mancini et al., 2007).

En el curado de la carne, eritorbato de sodio tiene tres funciones principales: primero; reduce el nitrito a óxido nítrico y de esa manera acelera la formación del color rosado en la carne; segundo, como antioxidante contribuye a la estabilidad de color y sabor y tercero, ayuda a prevenir la formación de nitrosaminas causantes de cáncer (Barringer et al., 2005). Una mezcla de eritorbato y glucano-delta-lactona (3:1) se utilizó para cubrir la superficie de la carne de res y exponerlas electrostáticamente, para aumentar el tiempo de vida útil. El número total de microorganismos después de almacenamiento refrigerado se redujo en promedio 2 tiempos Log, y coliformes, mesófilos y psicrófilos mostraron reducciones equivalentes. El recubrimiento electrostático produjo mejores resultados que el recubrimiento no electrostático (Barringer et al., 2005).

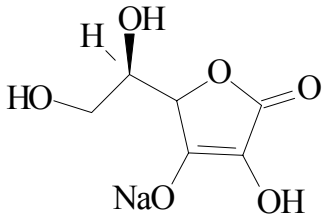


Figura 4. Estructura del eritorbato de sodio.

2.5. Pacú (*Colosomma macropomun*)

El Pacú *(Colosomma macropomun)* es oriundo de Suramérica, especialmente de la región del Orinoco y la Amazonía. Este pez es confundido usualmente con pirañas en su etapa juvenil, puede crecer más de un metro y tiene

varios nombres comunes, dependiendo de la región donde se encuentre: aletas negras, pacú, cachama, gamitana, tambaquí, entre otros. El pacú se alimenta en la naturaleza de zooplancton, insectos, semillas y plantas que caen al agua donde habita. Se utiliza en la acuicultura ya que puede vivir en aguas minerales pobres y es muy resistente a enfermedades. Esta especie se comercializa fresca y congelada (Nelson et al., 2007). Su clasificación taxonómica se presenta abajo:

Orden: Characiformes

Familia: Characidae

Subfamilia: Serrasalminae

Género: *Colossoma*

Especie: *macropomum*

En la Tabla 1 se encuentran representados valores promedios de talla (cm), peso (kg), y altura (cm) de ejemplares estudiados, así como los intervalos y sus desviaciones estándar correspondientes. Existe una relación proporcional entre los parámetros talla, peso y altura a medida que aumenta el tamaño del animal pudiendo relacionarse con el tiempo de cultivo (Bello et al., 1992). El contenido de grasa del pacú en los músculos puede variar significativamente, dependiendo de su tamaño y la dieta que reciba durante su crecimiento. Generalmente, ejemplares más grandes presentan mayor porciento de grasa que organismos más pequeños o juveniles. Observaciones recientes han identificado este pez como una fuente importante de grasas poliinsaturadas debido a su capacidad de almacenar cantidades significativas de grasas en su tejido subcutáneo (Nelson et al., 2007).

Tabla 1. Valores de talla (cm), peso (kg) y altura (cm) de Pacú.

	Talla (cm)			Peso (Kg)			Altura (cm)		
Caracteristicas/Categorias	Intervalo	X	S	Intervalo	X	S	Intervalo	X	S
pequeño	36.5-40.0	38.44	1	1.35	1.47	0.19	16-17	16.38	0.42
Mediano	41.0-46.0	43.5	1.73	1.70-2.55	2.05	0.28	19-22	20.55	1.3
Grande	50.0-53.0	51.6	1.04	3.20-3.75	3.44	0.24	23-24	23.66	0.47

Tres categorías según su tamaño, donde S = desviación estándar y X = Promedio. Fuente: Bello et al., 1992.

2.6. Análisis proximal del pacú

El análisis proximal es también conocido como análisis químico, cuyo principal propósito es determinar en un alimento, el contenido de humedad, grasa, proteína, cenizas, extracto no nitrogenado, fibra cruda y calorías, con la alternativa de fibra dietaria, según la asociación oficial de análisis químicos (AOAC).

Estudios realizados sugieren una relación inversa entre el contenido de grasa y el contenido de humedad. Esta tendencia fue observada con tres tamaños de pescados considerados altos en contenido de grasas, y una humedad relativamente baja. Especies de agua dulce como el coporo (*Prochilodus mariae*) contienen un bajo porcentaje de humedad (74%) y grasa (6.78%) (González, 1980). La trucha de lago, también de agua dulce, contiene una humedad de 70.8% y un contenido de grasa de 9.3% (Thurston y Col, 1959). El contenido de grasa de los peces varia mucho entre especie, así como dentro de la misma especie, dependiendo de: época de captura, edad, sexo, área geográfica (Stansby, 1954) y alimentación (Ramachandran y Gopakumar, 1981).

2.7. Congelación y descongelación del Pacú.

2.7.1. Congelación de un alimento

Las reacciones bioquímicas dependen en gran media del contenido de agua disponible. Por lo tanto, para realizar este estudio era importante definir la temperatura en la cual se cristaliza la mayor parte del agua disponible que tiene el pescado para garantizar que durante el almacenamiento del mismo no hubiese deterioro microbiológico del pescado. No obstante, la temperatura buscada no podía ser tan baja que impidiera las reacciones de oxidación necesarias para medir el efecto antioxidante del eritorbato de sodio. La temperatura de congelación es una alternativa importante para la reducción de la tasa de oxidación de lípidos en el músculo del pescado, ya que reduce la circulación de oxígeno alrededor de los ácidos grasos, inmoviliza el agua necesaria para que ocurran las reacciones bioquímicas y reduce la rapidez de dichas reacciones.

La Figura 5 muestra la curva típica de congelación del agua pura. La temperatura desciende a 0°C para cambiar de estado. Luego, ocurre un incremento en el volumen del recipiente que lo contiene. La temperatura permanece constante hasta que toda el agua es congelada y luego la temperatura de los cristales desciende (Lewis, 1996).

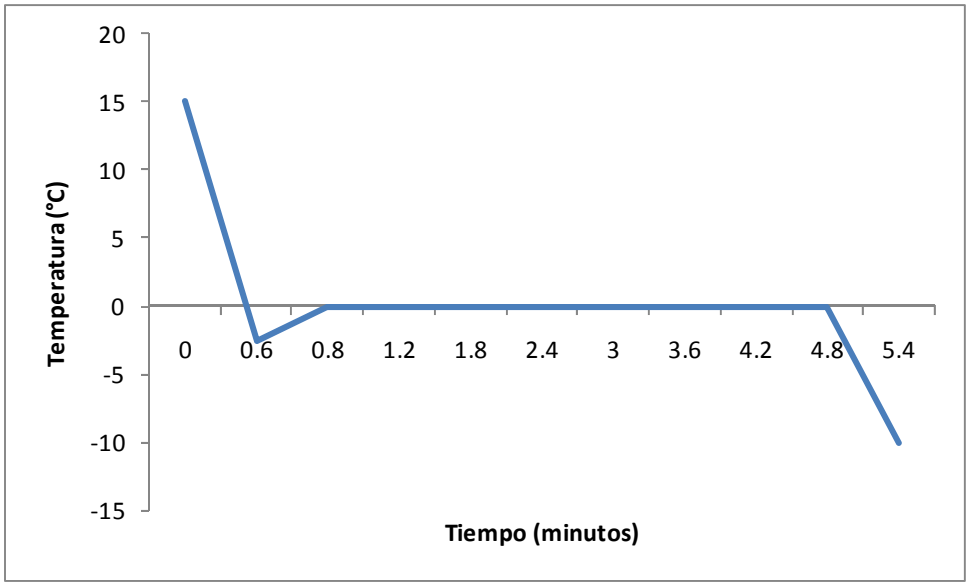


Figura 5. Curva de congelación del agua pura.

La curva de congelación típica de un alimento se muestra en la Figura 6. El proceso de congelación de los alimentos es más complejo que la congelación del agua pura. Los alimentos presentan un comportamiento ante la congelación similar al de las soluciones. La curva de congelación posee las siguientes secciones:

AS: El alimento se enfría por debajo de su punto de congelación, el agua permanece en estado líquido. Este sub-enfriamiento puede llegar hasta 10°C por debajo del punto de congelación.

SB: La temperatura aumenta rápidamente hasta alcanzar el punto de congelación, θf pues al formarse los primeros cristales de hielo se libera el calor latente de congelación a una velocidad superior a la que éste se extrae del alimento.

BC: El calor se elimina a la misma velocidad (entre calor latente de congelación vs calor extraído del alimento). Se elimina el calor latente y se forma el hielo, pero la temperatura permanece casi constante. El incremento de la concentración de soluto en la fracción de agua no congelada provoca una disminución en el

punto de congelación y la temperatura desciende ligeramente. Es en ésta parte que se forma la mayor parte del hielo.

D: Uno de los solutos alcanza la sobresaturación y cristaliza. La liberación del calor latente de cristalización provoca un aumento de la temperatura eutéctica (temperatura donde coexisten en equilibrio las tres fases) del soluto.

E: La cristalización de agua y solutos continúa.

F: La temperatura de la mezcla de agua y hielo desciende hasta alcanzar la del congelador θs (De Man, 1999; Lewis, 1993).

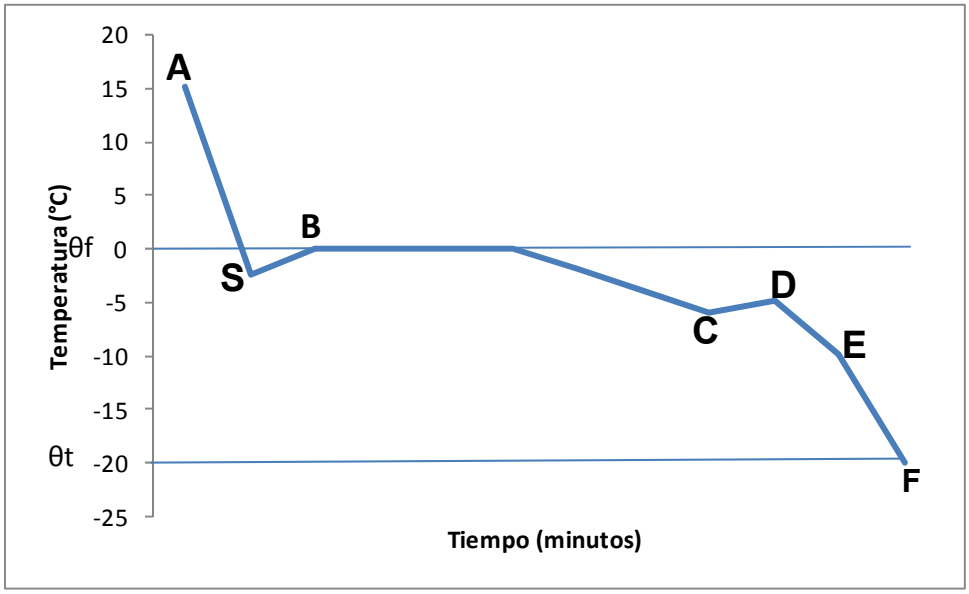


Figura 6. Curva de congelación de un alimento.

2.7.2. Descongelación de un alimento

Cuando un alimento se descongela, la capa superficial de hielo se funde y forman una capa de agua líquida cuyas propiedades térmicas son menores a las del agua en estado sólido. Como consecuencia, la velocidad con la que se transfiere el calor hacia el interior del alimento aumenta el efecto aislante de la capa superficial, a medida que la capa del alimento descongelado se incrementa; es por ello que la descongelación de un alimento es mas lenta que su congelación para igual

gradiente de temperatura (Lewis, 1993). La descongelación suele efectuarse a una temperatura ligeramente superior a la del punto de congelación (Lewis, 1993).

2.8. ANÁLISIS QUÍMICOS

2.8.1. Determinación de eritorbato de sodio por cromatografía líquida de alta eficacia.

El botánico ruso Mikhail Semenovich Tswett fue el primero en usar el término cromatografía, en 1906. Keulemans, ha definido la cromatografía como un método físico para separar, identificar y determinar mezclas de moléculas basadas en la distribución repetitiva de estas en una fase estacionaria, de gran área superficial y una fase móvil que pasa a través de la columna que contiene la fase estacionaria. La distribución de las moléculas entre las dos fases se debe a uno o varios procesos básicos: adsorción, intercambio de iones, partición o filtración por gel (Romero, 2000).

La cromatografía liquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica de separación e identificación que puede ser aplicada para el análisis de muchos compuestos solubles en líquido. En este estudio, esta técnica se utilizó para la determinación de eritorbato de sodio en los filetes del pacú como una forma de determinar su efecto en la rancidez oxidativa a través del periodo de estudio (Rounds y Gregory, 1993).

La Figura 7 muestra los principales componentes de un sistema de HPLC. Una solución que contiene el analito de interés se inyecta en un ciclo que ha sido calibrado para contener un volumen específico. La válvula de rotación permite el flujo de muestra contenida en la fase móvil (eluyente), que arrastra la muestra hasta la columna que contiene la fase estacionaria, donde se produce la separación. El eluyente fluye a través de una bomba a una velocidad constante y una presión lo suficientemente alta para superar la contrapresión de la columna; presiones de

1000 a 2000 psi son necesarias, para facilitar la separación y elución rápida de los componentes de interés.

La eficiencia de separación es inversamente proporcional al tamaño de las partículas de la columna de material de interacción. La disponibilidad de alta presión de los sistemas de distribución del disolvente es responsable directa por el "alto rendimiento" (alta velocidad de flujo del eluyente vs adsorción del analito en la columna). Suponiendo que una columna adecuada ha sido elegida para la separación de interés, todos los componentes deben pasar a través de la columna, y "liberados" en diferentes momentos (diferencial de la migración). Esta diferencia de tiempo se debe a las diferencias en la distribución (adsorcion) de los diversos componentes entre la fase móvil (eluyente) y la fase estacionaria (resina o matriz de la columna). Cada componente pasa por el detector al salir de la columna y se identifica por separado (Brown et al., 1990).

Los picos en el cromatograma en una muestra son identificados basados en el tiempo de retención que es el tiempo que tarda el analito en migrar a través de la fase estacionaria. Las estructuras químicas de compuestos examinados son establecidas usando métodos espectrofotométricos (Chojecka et al., 2006). HPLC es una técnica analítica apropiada para la separación y determinación de analitos orgánicos e inorgánicos en muestras especialmente biológicas farmacéuticas, ambientales e industriales.

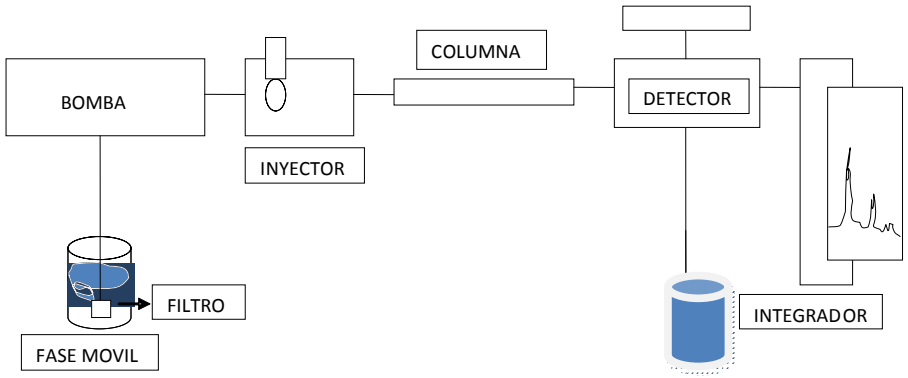


Figura 7. Diagrama del funcionamiento del equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Existen diferentes métodos de detección en HPLC. El más común es un detector basado en la absorbancia de luz visible o ultravioleta, UV/Vis. Estos detectores son UV/Vis espectrofotómetros en miniatura, equipados con diafragma a través de una celda de flujo, lo que permite un seguimiento continuo del eluyente. La longitud de onda seleccionada corresponde a la región del espectro electromagnético donde los analitos de interés y sus asociados cromóforos absorben la luz. El intervalo lineal dinámico de la curva de calibración de la absorbancia es proporcional a la concentración de los compuestos de interés. Los datos se registran y presentan usando un integrador. La absorbancia medida por el detector produce un pico con un tiempo de retención característico, se produce la integración del pico y después de la medición, se usa una curva de calibración para determinar la concentración de los compuestos desconocidos (Brown et al., 1990; DiCesare, 1981; Dorschel, 1989).

Se usó HPLC para determinar la cantidad de eritorbato de sodio absorbido por los filetes de pacú, cuando fueron sumergidos en soluciones que contenían eritorbato de sodio en diferentes concentraciones. El eritorbato de sodio por HPLC

requiere una extracción completa y adecuada del antioxidante de las muestras del pescado. La extracción satisfactoria de antioxidantes de productos alimenticios complejos no es fácil, particularmente cuando el antioxidante se encuentra en bajos niveles de concentración. Estos problemas son normalmente asociados con la extracción incompleta del antioxidante o con la co-extracción de potencial interferencia de sustancias. Para la determinación cuantitativa, se debe tener mucho cuidado durante los procedimientos de concentración o dilución (Vacio y/o evaporación, entre otros), para prevenir las perdidas de antioxidantes. El uso de disolventes puros es crucial para evitar trazas de impurezas y causar perdidas de antioxidantes (Macrae, 1982).

2.8.2. Determinación de hexanal por medio de extracción y caracterización de GC - MS.

A diferencia de los otros tipos de cromatografía, en la cromatografía de gas la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. La cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas es una herramienta analítica muy poderosa para identificar compuestos y cuantificarlos. El espectrómetro puede detectar todos los iones presentes que son característicos de cada molécula y además se puede obtener el ion molecular correspondiente al peso molecular de la especie. Los componentes básicos de un cromatógrafo de gas acoplado a un espectrómetro de masa son: el gas de arrastre, el puerto de inyección, el horno, la columna, el analizador de masas y su detector (Figura 8).

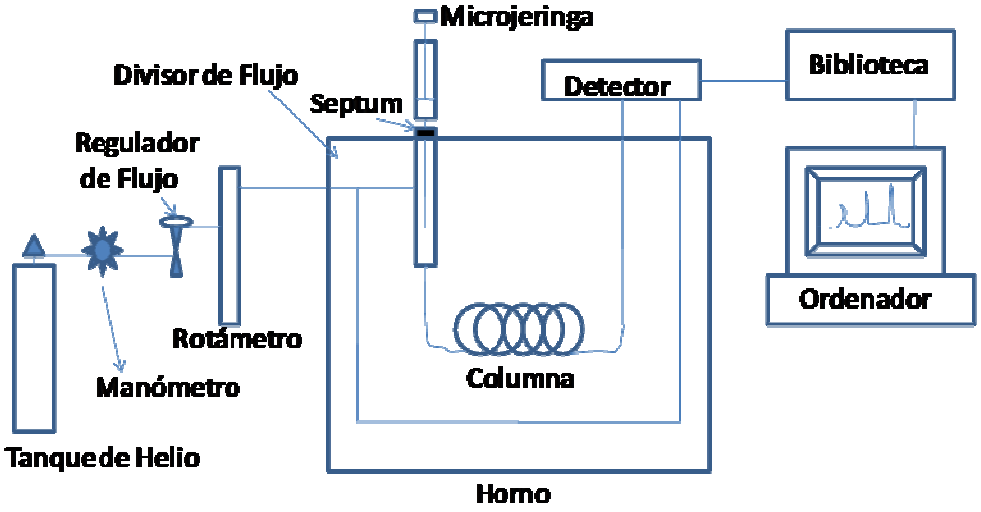


Figura 8. Diagrama del funcionamiento del equipo de cromatografía de gas acoplado a un espectrómetro de masa (GC-MS).

El detector se mantiene bajo vacio. Los compuestos son ionizados con electrones o moléculas de gas y se fragmentan en iones con carga. El filtro de masa permite el paso selectivo de los iones al multiplicador de electrones (detector). Todos los iones de masa especifica son detectados mientras que los otros son excluidos (Romero, 2000). En el proceso de ionización electrónica la muestra de interés es vaporizada en el horno y luego es impactada por un flujo de electrones con energía suficiente (70 eV), para ionizar la molécula. El horno controla la temperatura de la columna donde la separación se lleva a cabo mediante la interacción de los analitos con la fase estacionaria y el punto de ebullición de los compuestos. Los espectros que muestran patrón de fragmentación del analito son comparados con los de una biblioteca, para su identificación.

Los aldehídos son los principales compuestos volátiles producidos durante la oxidación, en particular, octanal, nonanal, pentanal y hexanal. Hexanal es el aldehído predominante durante la oxidación de lípidos (Dupuy et al., 1993) y es producido por la descomposición del ácido linoleico. El hexanal es comúnmente utilizado como indicador de deterioro en el sabor y de oxidación de lípidos (Shahidi

y Pegg, 1994). La presencia de hexanal se utilizó también en este estudio para la determinación de ocurrencia de rancidez oxidativa a través del periodo de almacenamiento del producto (6 meses) y se determinó por la técnica de microextracción de fase sólida y cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas (SPME/GC-MS, por sus siglas en inglés).

2.8.2.1. Extracción de componentes volátiles por microextracción de fase sólida (SPME).

Este método tiene como propósito general la extracción de compuestos orgánicos volátiles que se encuentran en muestras sólidas, liquidas o gaseosas como suelo, sedimentos, carne, etc. para posteriormente ser analizadas por cromatografía de gases (GC) o cromatografía de gases / espectrometría de masas (GC/MS). Durante los procesos de extracción una de las etapas importantes a tener en cuenta es la preparación de la muestra. Existen varios factores que afectan esta preparación, dentro de los cuales se encuentran: la homogeneización de la muestra, especialmente en alimentos, por ser matrices complejas que involucran lípidos, proteínas, carbohidratos, minerales, vitaminas, entre otras; el tiempo de exposición, la temperatura, evitar manipulaciones y contaminantes (Pawliszyn et al., 1999).

Los analitos se extraen usando una fibra de microextracción de fase sólida de (SPME) y son termalmente desorbidos en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gas. Para optimizar la desorción, la profundidad de la fibra en el inyector debe ser ajustada, así que la fibra en el inyector se expone en la parte caliente del puerto de inyección. La desorción depende del punto de ebullición del analito y del grosor de la fase estacionaria de la fibra. La temperatura de desorción debe estar mas arriba del punto de ebullición del analito (Pawliszyn et al., 1999).

El método es aplicable a una amplia gama de compuestos orgánicos que tienen alta volatilidad. Por ejemplo, se ha encontrado presencia de nonanal,

pentanal, octanal y otros compuestos volátiles en carne de cerdo con diferentes contenido de ácidos grasos poliinsaturados y utilizando “SPME” para la extracción y GC–MS para la cuantificación de los mismos. Los resultados sugieren que los indicadores de la oxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados son principalmente heptanal, pentanal y hexanal (Pawliszyn et al).

Se hizo un estudio con la técnica SPME en “headspace” (HS) –para aislar y determinar volátiles formados durante la oxidación del aceite de pescado en las emulsiones de agua. Se utilizó la fibra carboxen / polidimetilsiloxano (CAR – PDMS) y se evaluaron los principales factores que afectan la microextracción de fase solida (cantidad de la muestra, el tiempo y la temperatura de la extracción y de agitación). La incubación de 0.5 g de emulsión a 60 ° C durante 30 minutos conduce a la forma más eficaz de extracción de volátiles asociados con la oxidación lipídica de emulsiones de aceite de pescado. El método HS-SPME junto con la técnica GC-MS permitió determinar los análisis cualitativo y cuantitativo de los volátiles derivados de la oxidación de aceite de pescado enriquecido (Iglesias, 2007).

Se evaluó la calidad de 12 especies de peces (peces de mar, de agua dulce y crustáceos), midiendo el contenido de formaldehido (FA) en los diferentes productos de la pesca, utilizando las técnicas SPME y GC-MS. Se utilizó una fibra de derivatización con pentafluorobencilo - hidroxilo - clorhidrato de amina. Se calcularon niveles variables de formaldehidos (Bianchi et al., 2005).

Los daños producidos por lípidos han sido estudiados en especies de peces (bacaladilla, *Micromesistius poutassou*. La determinación de hexanal por SPME/GC-MS fue parte de los estudios realizados para determinar la rancidez producida por lípidos en especies de peces. Los resultados mostraron una correlación directa entre los productos de la oxidación en los peces y el tiempo de almacenamiento (Aubourg, 1999).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar el efecto antioxidante del eritorbato de sodio para prevenir la rancidez oxidativa en filetes de pacú (C*olossoma macropomum*) almacenados por 6 meses a – 8°C.

Objetivos específicos

- Determinar el contenido del eritorbato de sodio en filetes de pacú (*Colossoma macropomum*), almacenada a -8°C durante seis meses de almacenamiento a través de la técnica de HPLC
- Determinar el grado de rancidez de los filetes de pacú (*Colossoma macropomum*), utilizando pruebas para determinar hexanal por GC-MS
- Establecer si hay diferencias en rancidez a través de un panel sensorial en los filetes de pacú almacenados por seis meses y tratados con diferentes concentraciones eritorbato de sodio

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Determinación de la temperatura de congelación de los filetes de pacú.

En ensayos preliminares se tomaron 10 filetes de pacú suministrados por la Sub-estación Piscícola de la Estación Experimental en Lajas del Centro de Investigación y Desarrollo de la Acuicultura Comercial en Puerto Rico (CIDACPR). Los filetes fueron transportados en neveras que contenían hielo. A los filetes se les instalaron cinco termopares en diferentes partes del filete (Figura 9), conectados a un Midi Logger (Modelo No. GL450-UM-151), como lo muestra la Figura 10. Se colocaron en un ultra-congelador a -80°C, para determinar la temperatura a la cual se congela la mayor parte del agua del pescado (pacú).

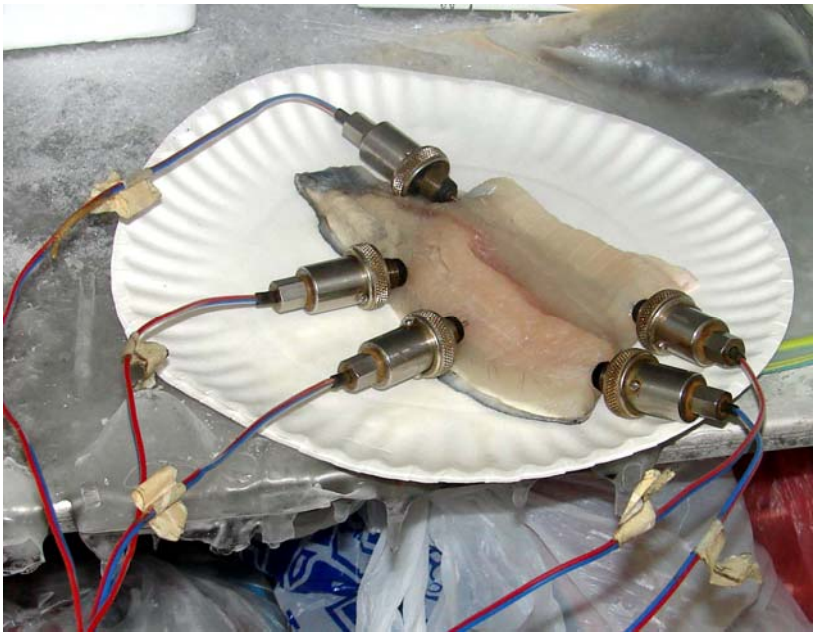


Figura 9. Termopares conectados al filete "de pacú".

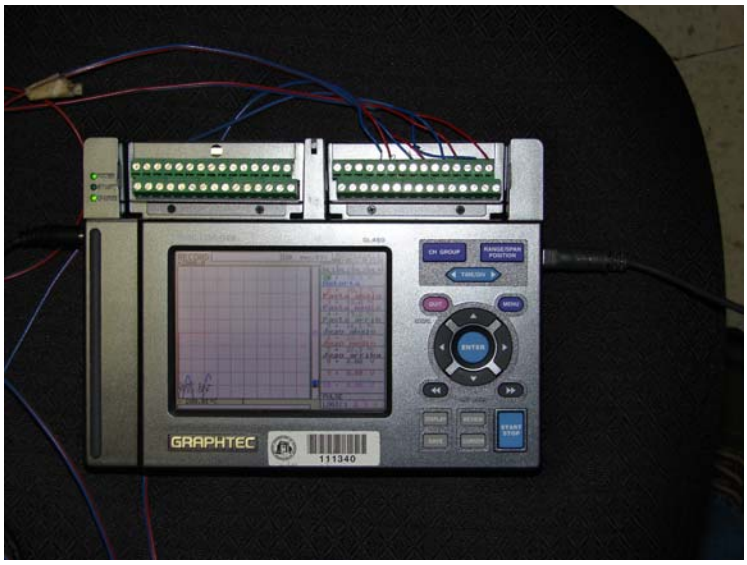


Figura 10. Midi logger (Modelo No. GL450-UM-151).

3.2. Recolección de las muestras

Las muestras de filetes de pacú fueron suministrados por la Sub-Estación Piscícola (CIDACPR). Los peces fueron cultivados en charcas y capturados para ser asfixiados, descamados y fileteados a mano. Posteriormente se transportaron en neveras que contenían hielo hasta el laboratorio. Se utilizaron 204 filetes en total, distribuidos aleatoriamente en cuatro lotes. Cada filete pesaba en promedio 113.9 g y cada lote contenía 51 filetes. Se colocaron los lotes en bandejas con soluciones de eritorbato de sodio en concentraciones de 50,000, 500 y 5 ppm; Los lotes identificados como A, B y C respectivamente. El lote restante se sumergió en agua y se utilizó como control (lote D). El tiempo de inmersión de los cuatro lotes fue de 30 minutos.

3.3. Tratamiento de los filetes y almacenamiento

La mayoría de filetes de cada lote se agruparon aleatoriamente en 12 bolsas para congelador (Ziploc™ Slide-Loc), 4 filetes en cada bolsa. Las 12 bolsas se

agruparon al azar en 4 sub-lotes de 3 bolsas (3 repeticiones). Cada sub-lote representó un tiempo de almacenamiento: 0, 2, 4, y 6 meses, respectivamente. En los seis meses de almacenamiento se realizaron 16 muestreos en total. Los filetes restantes de cada lote (3 filetes) se agruparon en cuatro bolsas (correspondientes a cada tiempo) conteniendo 3 filetes cada una para almacenar por 6 meses y fueron utilizados para la prueba de panel sensorial. Las bolsas fueron almacenadas por el tiempo correspondiente en un refrigerador tipo casero (Henry Duty Commercial, Modelo No. 253.14502101) a -8°C.

3.4. Preparación de las muestras

Durante un período de seis meses se removieron del refrigerador cada dos meses 12 bolsas de cada tratamiento y del control. Los filetes de cada bolsa fueron descongelados para utilizarse en los análisis químicos. Se homogeneizaron los filetes por bolsa y se pesaron las cantidades para los análisis: porcentaje de humedad, porcentaje de grasa, determinación de eritorbato de sodio, análisis de componentes volátiles y determinación de hexanal. Se colocaron las muestras para cada análisis en bolsas Whirlpack™ y se almacenaron en un ultra congelador a -80°C. Las muestras se descongelaron desde el día anterior en una nevera tipo casero a temperaturas de refrigeración entre 0°C y 4°C cuatro horas antes del análisis las muestras se sacaron a temperatura ambiente.

3.5. Análisis químicos

Las técnicas utilizadas para los diferentes análisis de las muestras y separación y cuantificación del eritorbato de sodio son: análisis proximal (humedad y grasa), cromatografía liquida (HPLC, por sus siglas en inglés), micro-extracción de fase solida (SPME, por sus siglas en inglés) y cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés).

3.5.1. Determinación del contenido de humedad

Se utilizó el método oficial de la AOAC (1990) en cada uno de los tiempos de almacenamiento. Se colocaron crisoles en el horno a 100°C por 24 horas hasta que alcanzaron peso constante. Luego se pesaron aproximadamente 5.0000 ±0.0025g de muestra y se colocaron en los crisoles previamente pesados. Las muestras se pesaron a las 24 horas y se mantuvieron en el horno hasta que alcanzaron peso constante. El porciento de humedad se determinó mediante la siguiente fórmula:

[redacted]

3.5.2. Determinación del contenido de grasa

Se utilizó el método recomendado por la Sociedad Oficial de Química Analítica (AOAC, 1990 sección 920.39), conocido como el método de Soxhlet. Se secaron los vasos de aluminio y los dedales en el horno (Napco, modelo 630) a 100ºC por 24 hrs. Luego se enfriaron en el desecador por 10 minutos, se pesaron y se le añadieron aproximadamente 2g de muestra al dedal y se secaron en el horno a 100ºC por 24 h. Luego se les colocaron anillos de metal en los dedales y se colocaron en la máquina Soxhlet (Tecator, Sooxtec System I-IT 1043 Extraction Unit), se añadieron 50 mL de acetona y se colocaron en la plataforma caliente de la máquina. Finalizado el proceso de extracción, los vasos metálicos se removieron de la máquina y se colocaron en el horno a 100°C por 20 minutos, se instalaron en el desecador y se pesaron. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de grasa:

% de grasa = [(peso de vaso + grasa) - peso de vaso)/peso muestra seca] *100

3.5.3. Determinación del contenido de eritorbato de sodio

Se determinó el contenido de eritorbato de sodio en las muestras de pescado mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

3.5.3.1. Identificación del eritorbato de sodio en las fracciones del cromatograma.

Aunque se disponía de estándar aparentemente puro, al correr la muestra el cromatograma observaba tres picos y para identificarlos se preparó una solución de 100 ppm de eritorbato de sodio (estándar) y se hicieron varias corridas en el equipo. Se tomó 1.5 mL de solución residual de cada uno de los picos presentes en el cromatograma y se removió el agua de las fracciones: se congelaron en nitrógeno líquido y se sublimaron utilizando un Liofilizador Labconco, (Freeze Dry System/LYPH Lock 4.5 modelo: 7751-00.), (Figura 11). Luego se disolvieron los solutos en agua deuterada y se analizaron en Resonancia Magnética Nuclear (NMR, por sus siglas en inglés), (Bruker Avance™, 500 MHz instrument), (Figura 12) y (Apéndice 1).

Figura 11. Equipo liofilizador.

Figura 12. Equipo de resonancia magnética nuclear (RMN)

3.5.3.2. Extracción del eritorbato de sodio

Se utilizó el método reportado por Lebrón (2006) con ciertas modificaciones. Aproximadamente 8.000 ± 0.0025 g de pacú se homogeneizaron con diez mililitros de ácido metafosfórico al 2.5%. El homogeneizado se filtró a través de un filtro Whatman™ No. 4 y el filtrado se centrifugó a 3,000 rpm por diez minutos. Del centrifugado se obtuvo una alícuota de un mililitro que se pasó a través de un cartucho de separación catiónica (.SCX,100mg/1.5ml; 100/PK (sigma Aldrich)). El cartucho se lavó con dos mL de agua destilada. El filtrado se recolectó en un tubo de trece mililitros donde se le ajustó el volumen a cuatro mililitros con la fase móvil. Se realizaron las diluciones necesarias para determinar la concentración. La

muestra pasó a través de un filtro de 0.45 µm (membrana de nilón, 47 mm diámetro) antes de ser inyectada al equipo.

3.5.3.3. Cuantificación de eritorbato de sodio mediante cromatografía líquida de alta eficacia ("HPLC")

Se utilizó el método reportados por Lebrón (2006), con ciertas modificaciones. En la detección y cuantificación del eritorbato de sodio se utilizó un cromatógrafo líquido modelo HP 1100 con un detector de espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) (Figura 13). Se inyectaron 15 µL de muestra. Se utilizó una columna de poliestireno sulfonado/divinilbenceno (Supelcogel C-610 H) a una temperatura de 30°C. La elusión fue isocrática con la fase móvil de ácido fosfórico al 0.1% (pH 2.2) y un flujo de 0.5 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 245 nm. Las condiciones utilizadas para el análisis de eritorbato de sodio se encuentran resumidas en la Tabla 2. La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva estándar externa.

Tabla 2. Condiciones utilizadas durante el análisis de eritorbato de sodio por HPLC.

Muestra	8 g de filete
Cartucho de extracción	SCX 100 mg/1.5mL
Volumen inyectado	15µL
Equipo	HP 1100
Detector	Absorbancia (UV)
Columna	Supelcogel C- 610 H
Fase móvil	0.1% H_3PO_4
Flujo	0.5 mL/min.
Temperatura de la columna	30˚C
Presión	38 Bar
Longitud de onda	245 nm

3.5.3.4. Preparación de la curva estándar

Se prepararon soluciones estándar de eritorbato de sodio con las siguientes concentraciones: 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm y 50 ppm. Se inyectaron 15 µL de cada estándar y se obtuvo el área correspondiente a cada concentración. Se preparó una curva de calibración de área vs concentración, de la que se obtuvo la concentración (ppm) de eritorbato de sodio, usando las áreas de los picos del cromatograma.

Figura 13. Equipo de cromatografía liquida (HPLC).

3.5.4. Determinación de hexanal mediante microextracción de fase sólida (SPME) y análisis por cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS)

Se determinó hexanal en los filetes de pacú a través de los diferentes tiempos de almacenamiento (0, 2, 4, y 6 meses) utilizando microextracción de fase sólida (SPME) y análisis y detección mediante cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS).

3.5.4.1. Extracción mediante microextracción de fase sólida (“SPME”)

El método usado para el análisis cualitativo fue el reportado por Lebrón (2006), con algunas modificaciones. Antes de la extracción, la fibra se acondicionó en el puerto de inyección a 250°C del cromatógrafo de gas HP 6980, durante 30 minutos según la recomendación de la Compañía Supelco, Inc (Bellefonte, PA). Luego se ajustaron los parámetros (Tabla 4) a utilizarse en el análisis y se obtuvo un blanco para asegurar la limpieza de la fibra y la columna.

Se pesó aproximadamente 10.0000 ± 0.0025 g de muestra descongelada y se colocó un envase de vidrio de 40 mL. La extracción se llevó a cabo introduciendo la aguja de microextracción de fase sólida por el empaque de silicona en el envase de vidrio (Figura 14). La aguja insertada en el vial se colocó en el “headspace” de la muestra y se expuso la fibra a 30°C en un bloque de calentamiento (Fisher Scientific Dry Bath) por 60 minutos (VWR Timer Stopwatch). Terminado el tiempo, la fibra se extrajo para ser inyectada en el puerto de inyección del cromatógrafo de gas.

Para cuantificar el tiempo dos (mes) de almacenamiento se utilizó el método de adición de estándar (hexanal 98%), para lo cual se preparó una solución estándar 7977 ppm y de ésta se obtuvo una dilución de 319.1 ppm. De la solución diluida se tomó 0, 0.5, 1.0 y 2.0 mL para preparar soluciones de 0, 63.82, 106.37 y 159.55 ppm, respectivamente. La muestra correspondiente a cada repetición se dividió en cuatro y se le adicionaron los volúmenes obtenidos de la solución diluida, los cuales estában contenidos en el envase de vidrio con dos gramos de muestra de pescado que habían sido licuados y macerados previamente. Las muestras se colocaron en “headspace” con agitación de 200 RPM (revoluciones por minutos), durante 30 minutos a 65°C. Las muestras fueron corridas por GC-MS, para obtener una curva en cada repetición de área vs volumen.

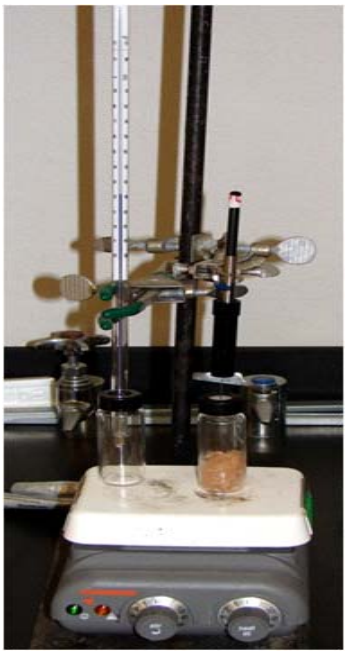


Figura 14. Extracción de volátiles del "headspace" mediante la aguja de microextracción de fase sólida (SPME).

3.5.4.2. Caracterización de hexanal

Para la desorción de los compuestos se utilizó un cromatógrafo de gas HP 6890 acoplado a un detector de masas modelo HP 5973. La aguja se insertó en el puerto de inyección y se expuso la fibra durante 5 minutos a 250°C. La válvula de purga permaneció cerrada por tres minutos. Los parámetros utilizados para el análisis se resumen en la Tabla 3.

Figura 15. Cromatógrafo de gas acoplado a un espectrómetro de masa (GC-MS).

Tabla 3. Condiciones utilizadas por cromatografía líquida en la cuantificación del eritorbato de sodio.

Fibra SPME	65 µm polidimetil siloxano/divinilbenceno
Equipo	HP 6890
Detector	HP 5973 MSD
Intervalo de masa	35-500
Columna	SPB-5
Gas	Helio
Tiempo de purga	3.0 minutos
Temperatura del inyector	250°C
Temperatura del horno inicial	40°C/3 minutos
Rampa	60°C/3 minutos
Temperatura final	230°C/8.33 minutos

3.6. Análisis sensorial

Después de seis meses de almacenamiento se hizo la prueba sensorial para cada una de las muestras que tienen las concentraciones de eritorbato de sodio (50,000, 500, 5 ppm y control).

3.6.1 Adiestramiento de panelistas

Antes de hacer el análisis sensorial se hizo un ensayo preliminar con tres muestras a cada panelista. La primera pertenecía al blanco (no contenía eritorbato de sodio), la segunda tenia un grado de rancidez apreciable (0 ppm de antioxidante) y la tercera contenía la mas alta concentración de eritorbato de sodio en las muestras (50,000 ppm), de tal forma que los panelistas lograran diferenciar los posibles sabores y olores de la prueba.

3.6.2. Preparación de las muestras de pescado

Los filetes destinados a esta prueba se descongelaron 10 horas antes del análisis, se cortaron en trozos de una pulgada cuadrada, se envolvieron en papel de aluminio, se refrigeraron a 3°C hasta una hora antes de empezar la prueba y se hornearon a 350°C por 30 minutos según el procedimiento de Vargas (2001). Se aplicó una prueba de ordenamiento simple. Esta prueba es utilizada para determinar si el panelista tiene la capacidad de ordenar las muestras en cuanto a la intensidad de un atributo. Se usó un panel de 24 personas; a cada panelista se le proveyó un cuestionario (Apéndice 2) para clasificar el atributo de rancidez y ordenar las muestras de mayor a menor. Las combinaciones de los tratamientos asignadas a cada panelista fueron establecidas en una tabla de números al azar en la computadora (Tabla 4), donde A: 50 ppm; B: 500 ppm; C: 5 ppm; D: 0 ppm de eritorbato de sodio. La calificación dada por los panelistas para los filetes tratados con las diferentes concentraciones de eritorbato tenía que ser de 1 a 4, donde: 1= no rancio; 2= poco rancio; 3= rancio; 4: muy rancio. Los números asignados a cada columna corresponden a la identificación de una de las muestras.

Tabla 4. Combinaciones del panel sensorial de la prueba de ordenamiento simple para detectar rancidez oxidativa en filetes "pacú" tratados con diferentes concentraciones de eritorbato de sodio: A-50,000 ppm; B-50 ppm; C-5 ppm y D-0 ppm.

Panelista	Combinacion de tratamientos				N° de las muestras			
1	A	B	C	D	616	714	584	793
2	A	B	D	C	513	201	405	947
3	A	C	B	D	599	537	755	212
4	A	C	D	B	544	94	440	549
5	A	D	B	C	203	201	547	968
6	A	D	C	B	617	198	630	228
7	B	A	C	D	192	621	42	578
8	B	A	D	C	43	735	417	818
9	B	C	A	D	49	20	386	962
10	B	C	D	A	541	191	695	481
11	B	D	A	C	575	511	932	350
12	B	D	C	A	438	831	922	479
13	C	A	B	D	546	257	43	11
14	C	A	D	B	583	684	423	729
15	C	B	A	D	891	528	568	129
16	C	B	D	A	531	26	686	796
17	C	D	A	B	218	457	198	813
18	C	D	B	A	602	843	278	836
19	D	A	B	C	228	510	911	102
20	D	A	C	B	396	673	736	961
21	D	B	A	C	562	263	23	452
22	D	B	C	A	473	492	777	536
23	D	C	A	B	44	940	757	250
24	D	C	B	A	983	162	789	173

3.7 Análisis estadísticos

Para encontrar diferencias significativas ($p<0.05$) entre los diferentes tratamientos para los datos de las pruebas de análisis proximal (grasa y humedad), determinación de compuestos volátiles (hexanal) y determinación de eritorbato de

sodio (HPLC) se utilizó con un análisis de varianza (ANOVA) de 2 factores (concentración de eritorbato y tiempo) y tres réplicas. Se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y la prueba de comparaciones múltiples de todas las parejas (Student-Newman-Keuls Method), para establecer diferencias entre las medias de los tratamientos de cada variable. Los datos de evaluación sensorial fueron tratados usando el análisis de Chi Cuadrado (α=0.05) y la prueba de Tukey. La ecuación para calcular el Chi Cuadrado es la siguiente:

$$X^2 = \left(\frac{12}{nt(t+1)} \sum R_i^2 \right) - 3n(t+1)$$

El diseño experimental fue aleatorio en un modelo factorial 4 x 4 con efectos fijos (4 tratamientos de eritorbato de sodio (concentraciones) y 4 tiempos (meses) de almacenamiento analizados). Las muestras de cada tratamiento se analizaron por triplicado. Los datos obtenidos fueron tratados usando la prueba de análisis de Chi Cuadrado (α=0.05). Los promedios correspondientes se compararon mediante la prueba de Tukey, que es conservadora en sus predicciones y confirmada con Fisher, un poco menos conservadora (Tukey 1953), y finalmente con la prueba de LSD de Fisher (Fisher, 1935) para confirmar, que está basada en una prueba t protegida.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Elaboración de la curva de congelación del pescado

De 55 curvas de congelación de filetes de pescado (pacú) realizadas, se obtuvo una gráfica promedio para establecer la temperatura de almacenamiento (Figura 16). Dado que la curva de congelación depende en gran medida del tamaño del filete, se hizo una curva de congelación promedio de la parte del filete que mas tiene, intermedia y que menos tiene músculos para obtener una curva de congelación representativa de todos los filetes del pacú (Apéndices 3-5). De esta curva se puede observar la disponibilidad de agua que tiene el producto a medida que se van formando los cristales por efecto de la disminución de la temperatura.

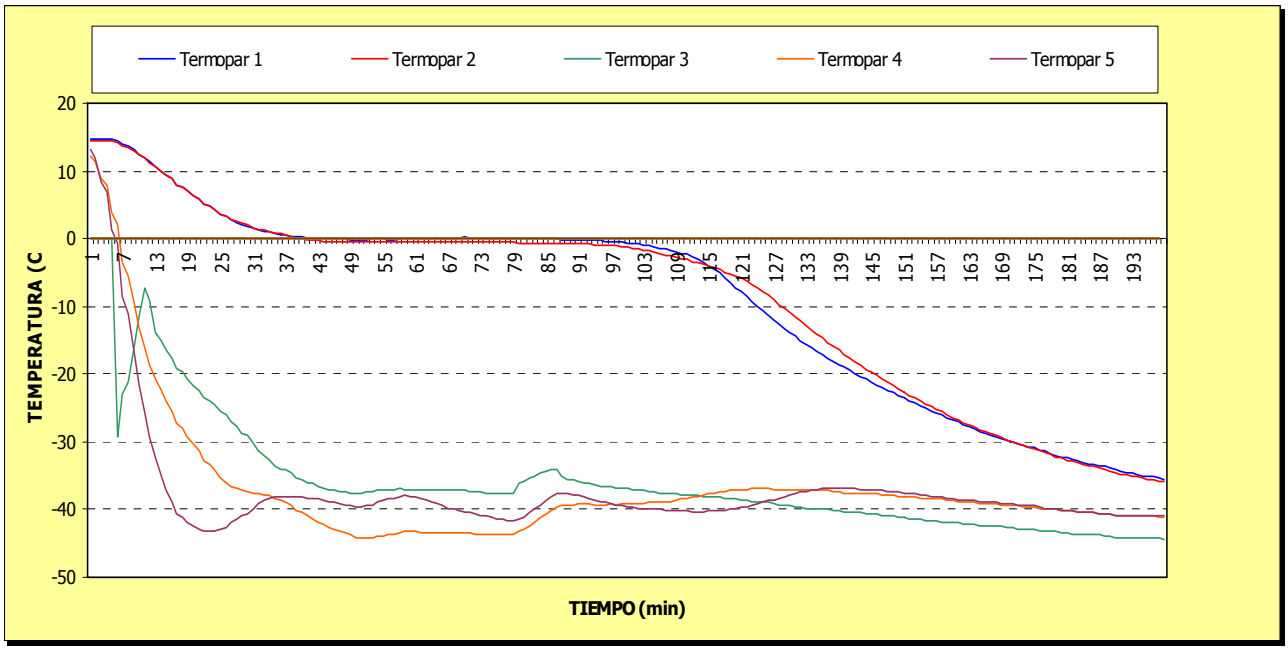


Figura 16. Curva de promedio congelación del "pacú" con los diferentes termopares colocados en diferentes partes de cada filete de pescado (pacú).

En la Figura 17 se puede observar que la temperatura de congelación en tiempo real del pescado es de -0.2°C. La mayor parte del hielo se forma en un intervalo de temperatura comprendida entre -0.2°C y -4.0°C. Por debajo de esta temperatura el producto tiende a tener la temperatura de la cámara de congelación. La temperatura de congelación o punto de congelación es aquella en donde se comienzan a formar los primeros cristales.

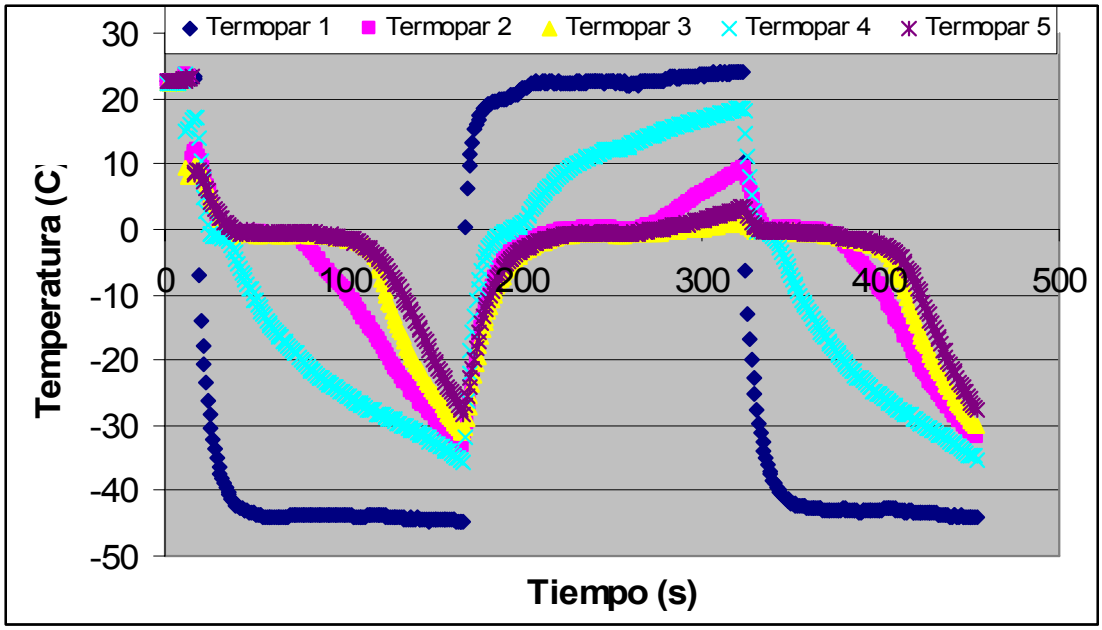


Figura 17. Curvas de congelación y descongelación del "pacú".

El termopar número 1 corresponde al registro de temperatura del ultra-congelador. Éste presenta una caída vertical en la temperatura de congelación y un aumento en el mismo sentido al volver a congelar el pescado. Los otros termopares fueron colocados en diferentes partes del filete (Apéndice 6). Se observó que donde había mayor contenido de músculo el proceso de congelación era relativamente más lento que en donde tenía menor cantidad de músculo; el intervalo, del punto de congelación para este termopar fue entre -0.2°C y -4.0°C (Figura 18).

La temperatura final de almacenamiento seleccionada para los filetes fue de -8°C, dado que a -4°C se congela la mayor parte del agua disponible en el pescado. De esta manera, no ocurre la rancidez cetónica y la rancidez oxidativa se pudo medir sin su interferencia. Grasa de pescado y de cerdo con un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados es propenso a una fácil rancidez oxidativa después de un prolongado almacenamiento (Ranken, 1994). En la curva de congelación (Figura 16), podemos observar el sistema de ultra-congelación alrededor del pescado el cual se evidencia por la caída drástica en la temperatura en un corto tiempo. El Apéndice 6 muestra la ubicación de termopares en los filetes del pescado que estaba dentro del congelador corriendo la curva de congelación.

La Figura 17 muestra que el proceso de descongelación y congelación del producto provoca un leve aumento en el punto de congelación (-0.1). Esto sugiere que la descongelación produce un rompimiento en los tejidos, promoviendo la sinéresis; al iniciar el proceso de congelación nuevamente el agua se encuentra más disponible y dicho proceso se produce más rápido.

La curva de congelación de los pescados y otros alimentos son similares. En la Figura 18 se observa la curva típica de congelación promedio del pacú obtenida en este trabajo. A partir de ella se seleccionó la temperatura de almacenamiento de este estudio, en la cual el intervalo A-S se observó a 6.6°C a los 26 minutos. El punto S (sobrecalentamiento) se observó a -2.5°C alcanzados en 41 minutos. El punto B se obtiene -2.0°C a los 41.5 minutos. El punto C (mayor parte de hielo) se obtuvo a -2.8°C en 102 minutos. El punto D (punto eutéctico). Se obtuvo a 3.0°C a los 102.5 minutos. El punto E (cristalización) se obtuvo a -5.0°C a los 113 minutos. El punto F (temperatura de la nevera) se obtuvo -15.0°C a los 130.5 minutos (Figura 18).

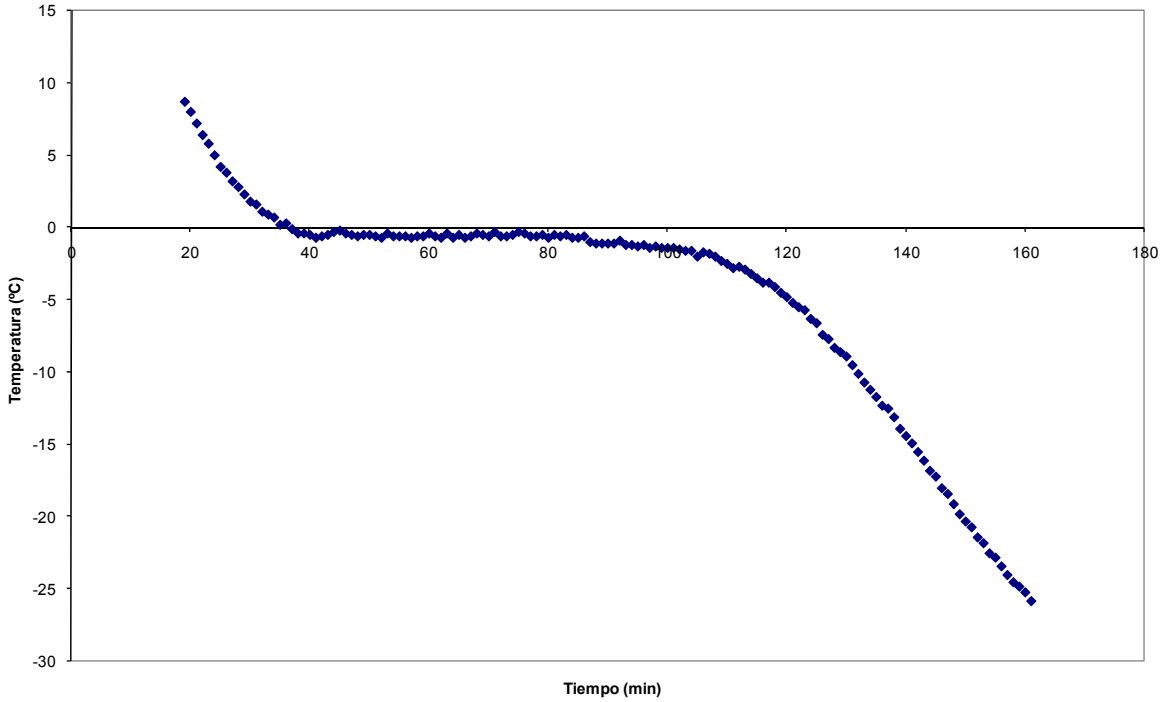


Figura 18. Etapas de la curva promedio de congelación del pescado.

4.2. Análisis proximal

4.2.1. Determinación del contenido de humedad

El análisis se realizó para toda las muestras en los diferentes tiempos y a las diferentes concentraciones. Los resultados de humedad (Tabla 5) se reportaron en base húmeda y el promedio para todos los filetes de pescado fue de 77.02 ± 0.76 %, cuyo valor es similar a los valores reportados por Izquierdo et al. (2000) (Tabla 5 Apéndice 8).

Tabla 5. Composición proximal de los filetes de pescado ("pacú").

[redacted]

En general se observa una ligera perdida de humedad en los filetes almacenados a través del tiempo (Figura 19), presentándose diferencias más palpables entre los tiempos 0 y 4 mes, según la prueba de comparaciones múltiple de Student-Newman-Keuls. Estos resultados sugieren que el mes cero (0) es donde menos pérdida de agua se produce y el mes 4 donde más aumentó la desorción de agua, nutrientes y antioxidante en el pescado.

El análisis de varianza (ANOVA) encontró diferencias significativas entre los meses de almacenamiento. ($p<0.05$) (Figura 19 y Apéndice 9). El mes 0 presentó un porcentaje de humedad más alta que el mes 4.

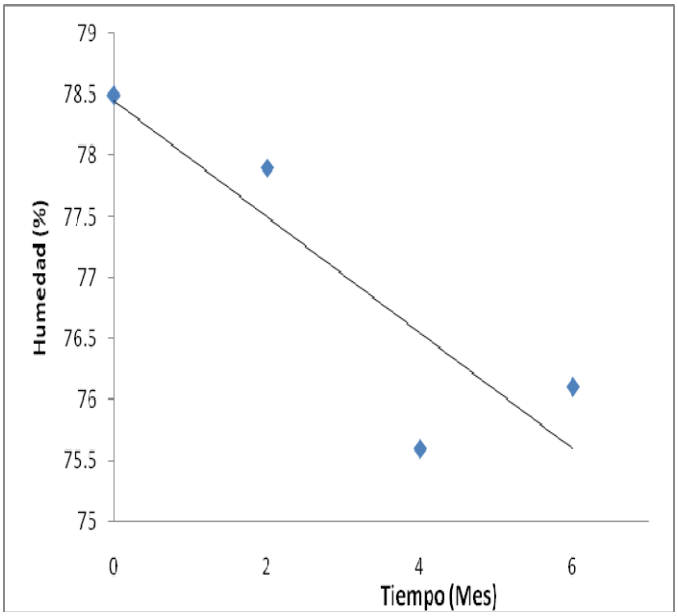


Figura 19. Contenido promedio de humedad en cada uno de los tiempos de almacenamiento del pescado.

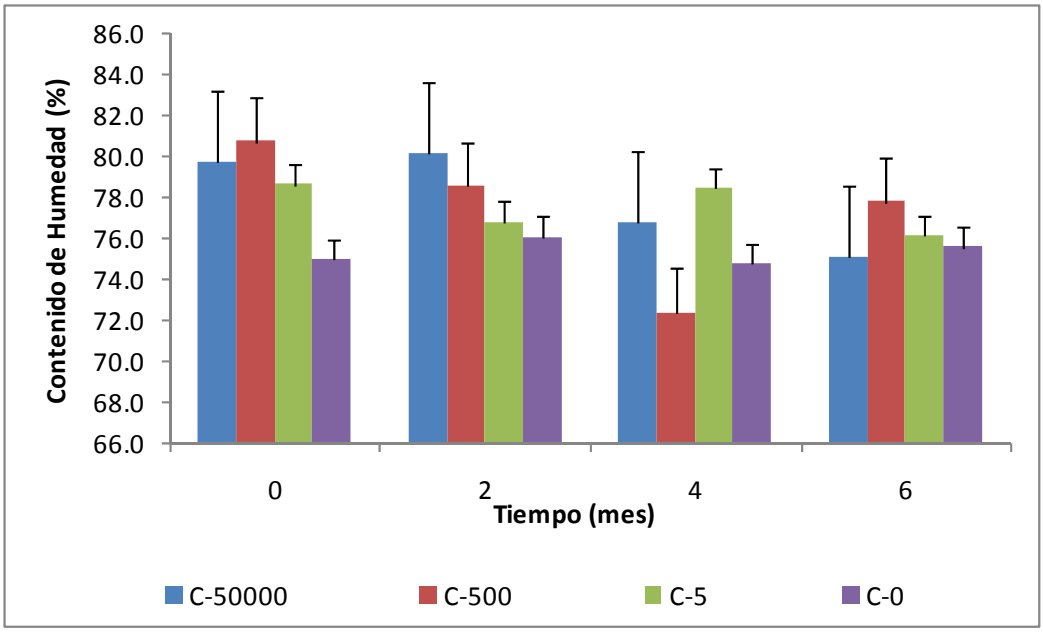


Figura 20. Contenido de la humedad a través de los tiempos de almacenamiento y las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio.

4.2.2. Determinación del contenido de grasa

El análisis se realizó para toda las muestras en los diferentes tiempos. Los resultados de grasa se reportaron en base seca y dieron un promedio general de 2.11%, el cual es un valor significativamente más bajo que los reportados por Izquierdo et al. (2000) con peces. El porcentaje de grasa determinado es este estudio fue inferior al 3.0%, considerándose pescados de bajo contenido graso (Zamil et al., 1992). Si los comparamos con otras especies de pescado que presentan porcentajes elevados, tales como anguila *(Anguila anguila,* 24.5%, merluza de Alaska *(Anoplopoma fimbria),* 15.2%, caballa *(Scomber scombrus),* 11.9%, salmón atlántico *(Salmo salar),* 13.6%, entre otras (Lil et al., 1998; Stansby, 1963), es muy variable; depende de la especie, el ciclo de maduración sexual, la disponibilidad de alimentos, de los hábitos alimenticios del pescado, de la época del año, entre otros, (Stansby, 1963).

El análisis de varianza (ANOVA) no encontró diferencias significativas ($p>0.05$) en el porciento de grasa de los filetes para las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio ($p=0.539$) ni para los diferentes tiempos de almacenamiento ($p = 0.411$). Tampoco hubo interacción entre la concentración y los diferentes tiempos de almacenamiento (Figura 21 y Apéndice 10). La sumatoria del porcentaje de grasa y de humedad fue aproximadamente 80%, es similar a los reportados por los investigadores.

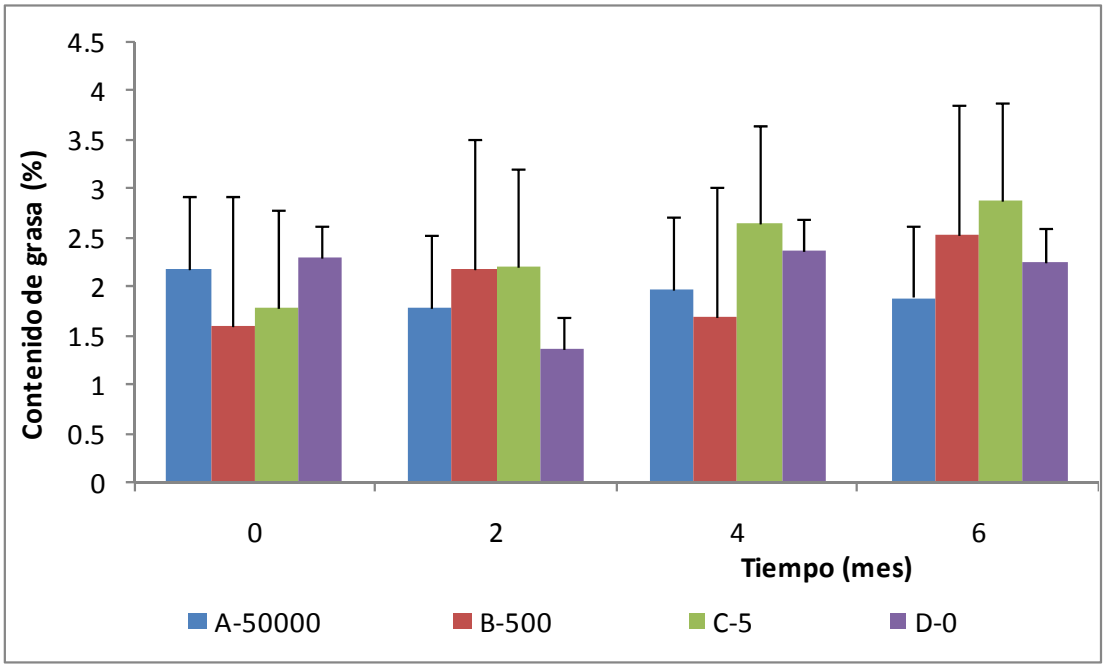


Figura 21. Resultados del contenido de grasa en los filetes de pescado ("pacú") a través de los diferentes tiempos de almacenamiento con las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio.

Por lo tanto, el bajo nivel de rancidez observada en este estudio pudo deberse en parte al bajo porciento de grasa presente en el pacú, muy por debajo de los valores típicos. Puesto que el desarrollo de la rancidez depende directamente del contenido de grasa, una concentración de la grasa favorecerá las reacciones de oxidación lipídica (Lowell, 1978; Hearn, 1987)

4.3. Cuantificación de eritorbato de sodio mediante cromatografía liquida de alta eficacia (HPLC).

Para identificar la fracción correspondiente al eritorbato de sodio entre los picos obtenidos en el cromatograma del estándar primario (100 ppm), por resonancia magnética nuclear (RMN), se compararon los espectros de las fracciones de la elución de eritorbato de sodio en HPLC con el espectro de eritorbato antes de ser analizado en cromatografía. La fracción con las mismas señales que el eritorbato fue la que tuvo tiempo de retención de 15.2 minutos (Figura 22).

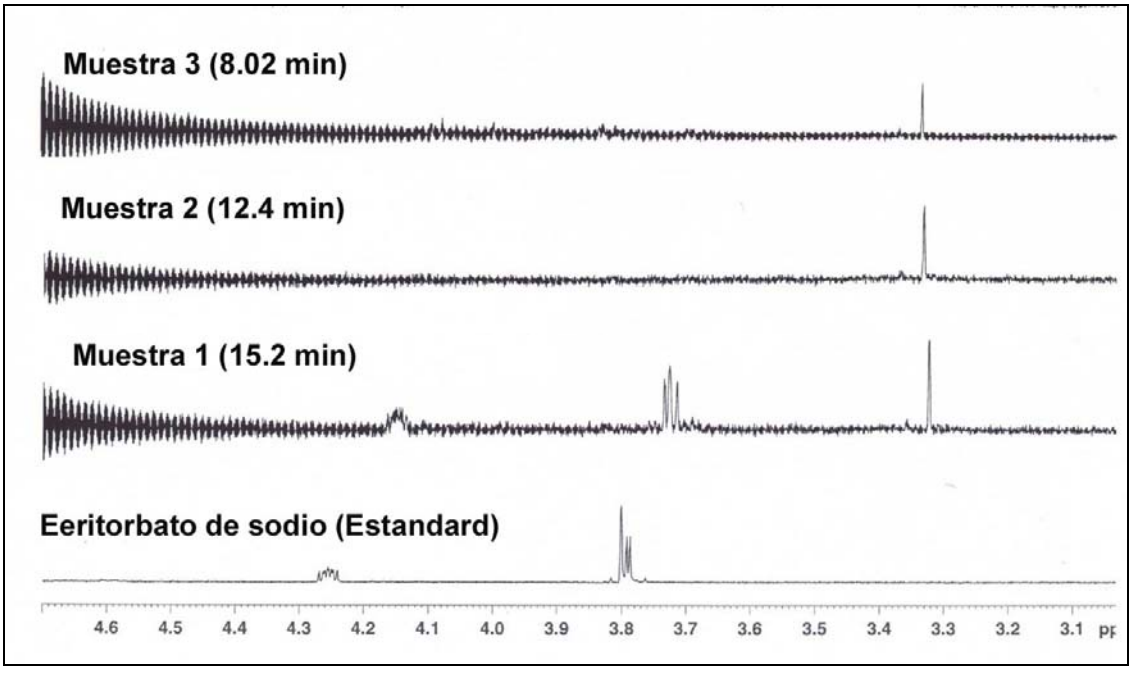


Figura 22. Comparación del espectro del eritorbato de sodio por resonancia magnética nuclear con los respectivos tiempos de retención

El análisis de varianza (ANOVA) no encontró diferencias significativas (p = 0.195) entre los diferentes tiempos de almacenamiento (meses) del experimento, lo cual sugiere que las diferencias encontradas no fueron suficientemente grandes como para excluir la posibilidad de que haya sido debido a la variabilidad del experimento (error aleatorio) (Figura 23). Estos resultados son similares a los resultados reportados (Ben-gigirey et al., 1999), en los cuales atunes blancos frescos (*Thunnus alalunga*) fueron congelados y almacenados a -18 º C y -25 º C durante un año. Los análisis químicos y análisis sensoriales se llevaron a cabo en 1, 3, 6, 9 y 12 meses de almacenamiento y no se encontraron diferencias significativas en la concentración eritorbato con respecto al periodo de almacenamiento a la temperatura de -25 ° C.

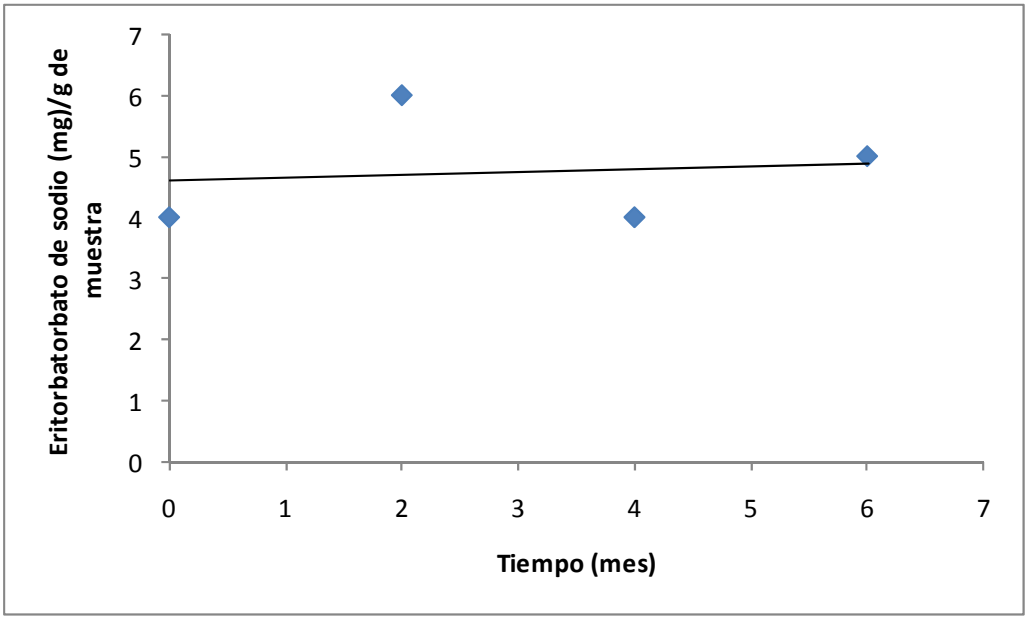


Figura 23. Contenido promedio de eritorbato de sodio en la muestra en los diferentes tiempos de almacenamiento.

Para el análisis por cromatografía liquida (HPLC), el límite óptimo de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés), es 10 ppm y el límite óptimo de detección (LOD, por

sus siglas en inglés), es 3 ppm. La curva de calibración se encuentra en el Apéndice 12. En la Figura 24 se observa que aún en el tiempo 0, las concentraciones de eritorbato detectadas fueron bajas (< 4 mg/g) aún para la concentración de 50,000 ppm, lo cual sugiere que hubo poca absorción del eritorbato de sodio en los filetes de pescado. En el tiempo cero en las concentraciones mas bajas (500 y 5 ppm) se logró detectar eritorbato de sodio, pero no se puedo cuantificar ya que esos valores estaban por debajo por debajo del límite de cuantificación (Tabla 6 y Apéndice 13). Esta baja absorción pudo ser la causa de la falta de diferencias entre los diferentes meses de almacenamiento, y permite inferir que no hubo pérdida en el antioxidante por reacción química con el ambiente (oxígeno y luz).

Tabla 6. Resultados de eritorbato de sodio por HPLC.

Mes 0		Mes 2		Mes 4		Mes 6	
Codigo	ppm	Codigo	ppm	Codigo	ppm	Codigo	ppm
A01	11.83	A21	7.31	A41	10.43	A61	18.77
A02	18.88	A22	26.89	A42	12.26	A62	17.17
A03	14.03	A23	18.78	A43	18.09	A63	19.33

Donde A = 50,000 ppm; (0, 2, 4 y 6) = Meses de almacenamiento; (1, 2, y 3) = Repeticiones

Estos resultados no coinciden con un estudio donde se colocaron canales de bagre (*Airiopsis bonillai*) expuestos a una solución de eritorbato de sodio 0.3% solución a pH = 5. La concentración de eritorbato de sodio en los filetes aumentó de 13 ppm de la etapa inicial (grupo de control) a 51 ppm y 43 ppm para los peces expuestos al antioxidante durante 8 h y 24 h, respectivamente (Thed y Erickson, 1992). Al realizar la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre la concentración 50,000 ppm y las otras concentraciones del experimento (500, 5, y 0 ppm). Estos resultados se pueden observar claramente en la figura 24, donde la mayor concentración (50,000) sobresale notoriamente en relación a las demás concentraciones, alcanzando un nivel máximo promedio de 4.5 mg de eritorbato de

sodio por g de muestra, evidenciando una vez más el nivel bajo de absorción de eritorbato de sodio en los filetes de pescado.

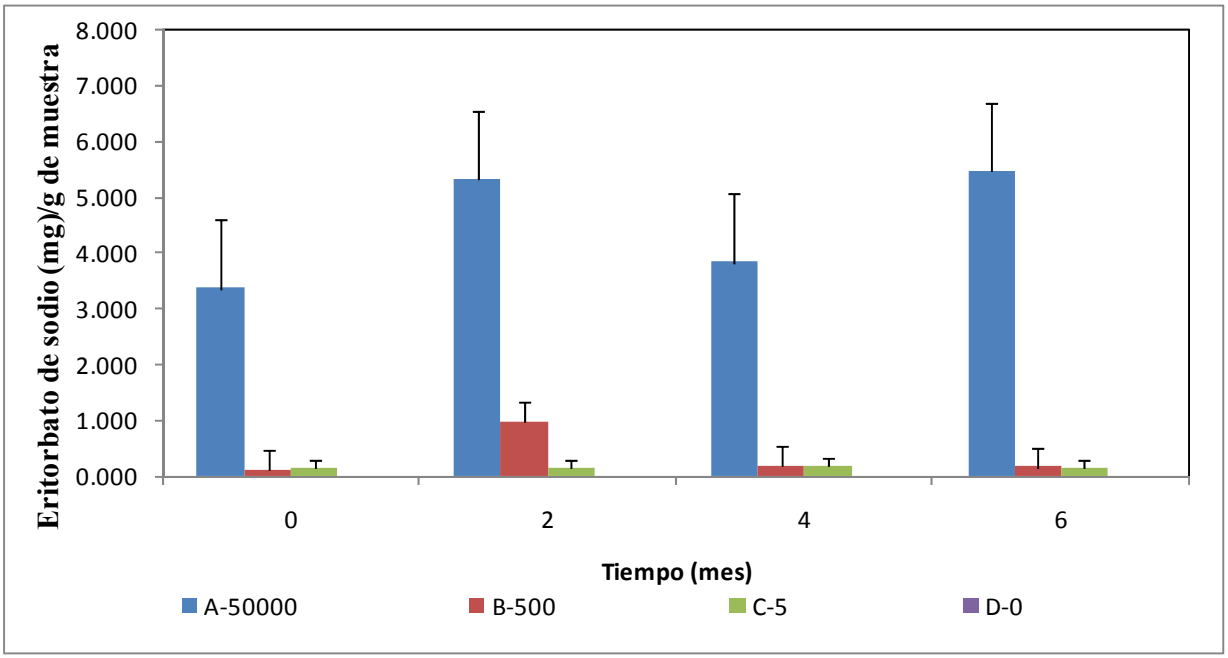


Figura 24. Contenido de eritorbato de sodio en las muestras de pescado (pacú) durante los diferentes tiempos de almacenamiento, por HPLC.

4.4. Cuantificación y caracterización de hexanal mediante SPME/GC-MS

En este estudio se removieron los componentes volátiles del pescado mediante microextracción de fase sólida (SPME) del espacio gaseoso ("headspace") de las muestras y se determinó el hexanal mediante cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Para cuantificar el tiempo dos (mes) de almacenamiento

4.4.1. Cuantificación de hexanal mediante SPME-GC/MS

Cromatogramas de GC-MS del extracto del "headspace" de muestras de pacú, correspondientes a los diferentes tiempos y concentraciones de eritorbato de sodio, se muestran en los Apéndices 15 y 16. La presencia de hexanal en las muestras de pacú a través de los seis meses de almacenamiento aparece en la Figura 25 y Tabla 7. Las menores concentraciones de eritorbato (0 y 5) ppm fueron las de mayor concentración de hexanal, presentes notoriamente en el segundo mes de almacenamiento (Figura 26 y Tabla 8). El tiempo de retención para el hexanal bajo las condiciones de corrida en GC-MS es a los 5 minutos, como se puede observar en el Apéndice 15 y el tiempo total de corrida de 17.67 minutos. No apareció hexanal en el tiempo correspondiente al mes 0, lo cual es consecuente con los resultados esperados ya que no se espera producción de hexanal el primer día de almacenamiento.

Tabla 7. Producción de hexanal en los filetes de pescado (pacú) en las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio, durante seis meses de almacenamiento. Donde (*), representa las áreas (uA).

	Tiempo			
Concentración-repetición	Mes 0 *	Mes 2 *	Mes 4 *	Mes 6 *
A-1	0	10000	0	5000
A-2	0	8000	0	2000
A-3	0	20000	0	0
B-1	0	20000	4200	12000
B-2	0	500	7200	0
B-3	0	4000	3200	0
C-1	0	18000	13000	0
C-2	0	80000	2000	0
C-3	0	80000	2000	0
D-1	0	60000	0	9000
D-2	0	14000	0	2700
D-3	0	100000	0	8000

Los resultados también sugieren que un aumento en concentración de eritorbato de sodio (Figura 25 y Tabla 8), retarda el desarrollo de rancidez oxidativa, es decir, que eritorbato de sodio parece actuar como antioxidante en el desarrollo de rancidez en muestras de pacú almacenadas a -8°C.

En la Figura 26, se observa que en el 2do mes de almacenamiento, el blanco (sumergido en agua) presenta la mayor producción de hexanal, seguido de la concentración 5 ppm de eritorbato de sodio (menor concentración de eritorbato de sodio), sin embargo al cuantificarlo (mes dos), la mayor producción de hexanal se registra en la concentración menor de eritorbato de sodio (5 ppm) (Figura 26). El Apéndice 18 presenta la curva de cuantificación de hexanal para el segundo mes de almacenamiento por el método de Adición de Estándar.

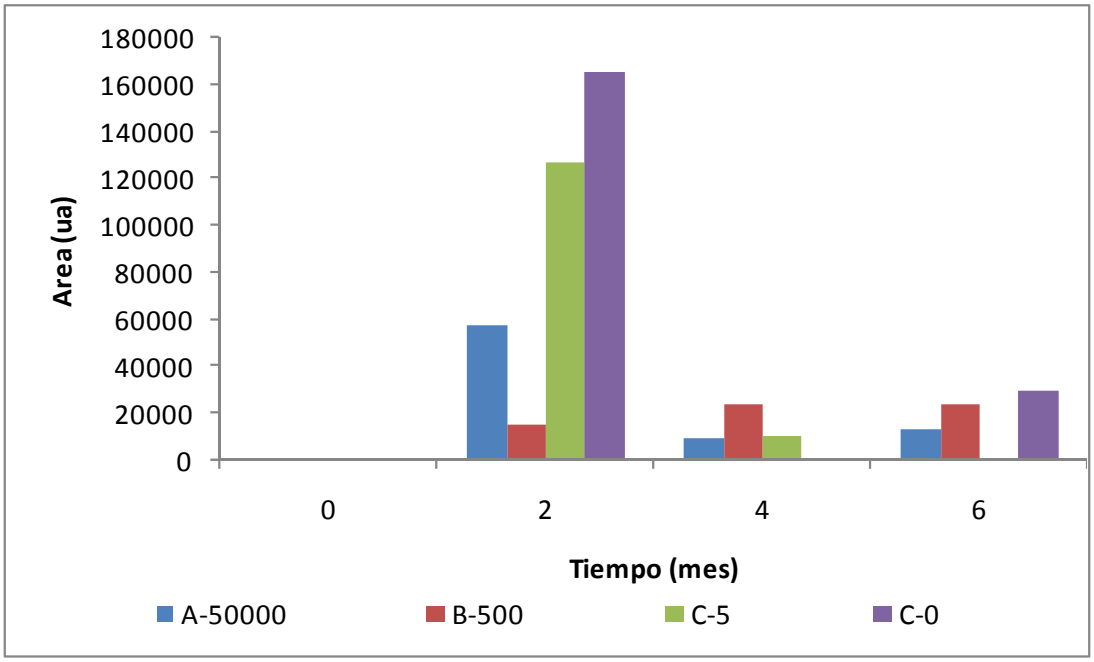


Figura 25. Producción hexanal en los diferentes tiempos de almacenamiento y las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio, detectados a través de GC-MS.

En los resultados obtenidos podemos observar una disminución apreciable en la producción de hexanal después del segundo mes de almacenamiento, lo cual pudo ser ocasionado por la descomposición del mismo en otros compuestos tales como acido hexanoico. Jear et al. (2004) sugieren que hexanal, presumiblemente a través de polidihidrogenasa, se convierte en hydroxyoctan - 3 - 2 - y que éste a su vez, puede reducirse a 2, 3 – octanodiol. Los aldehídos insaturados son a la vez fácilmente oxidables a nuevos compuestos volátiles como el malonaldehído, cuya detección es utilizada como medida de oxidación de los aceites (Navarro et al., 2004).

Los resultados en la producción de hexanal fueron calculados a través de la curva de adición de estándar, cundo esta corta el eje –X, la cual esta determinada por el comportamiento lineal de la curva (Apéndice 18 y se corrobora al graficar los residuales vs. Concentración, como lo ilustra el Apéndice 19. Los resultados presentan un margen de error un poco alto especialmente en las concentraciones más bajas (5 y 0 ppm) de eritorbato de sodio, esto pude deberse a posibles errores aleatorios (variabilidad en el tamaño de la muestra).

Tabla 8. Producción de hexanal en los filetes de pescado (pacú) en las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio, durante el segundo mes de almacenamiento. Donde A = 50,000 ppm; B = 500 ppm; C = 5 ppm y D = 0 ppm

Código	mg de hexanal/g de muestra	Promedio
A21	12,0	12,37
A22	10,8	
A23	14,4	
B21	3,7	7,89
B22	15,8	
B23	4,2	
C21	51,1	34,89
C22	32,2	
C23	21,4	
D21	33,6	60,60
D22	86,5	
D23	61,8	

Los resultados obtenidos coinciden con Nilssen et al. (2004) quien evaluó rancidez oxidativa en paté de carne de cerdo, expuestos a un extracto que contenía vitamina E. Se usó la prueba de TBA y la producción de hexanal medida por la técnica SPME/GC-MS. El estudio concluyó que el extracto que contenía la vitamina E como antioxidante retardaba el deterioro oxidativo de la carne de cerdo transformada en paté y que el hexanal representa un índice de predicción importante para el deterioro causado por rancidez oxidativa.

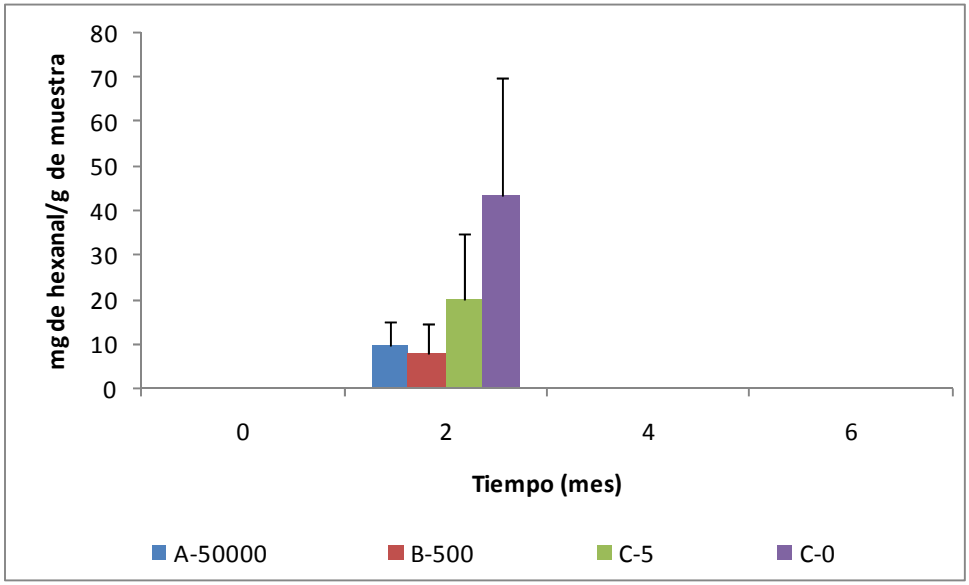


Figura 26. Producción de hexanal en los filetes de pescado (pacú) en diferente concentración de eritorbato de sodio durante seis meses de almacenamiento.

En la figura 27 observamos el comportamiento de la producción de hexanal a través del tiempo (320 minutos) en un estudio donde Navarro-García (2002) reportó la aplicación de las técnicas SPME/GC-MS para el estudio de la oxidación de aceite de hígado de raya. En el estudio se llevó a cabo una oxidación acelerada y en los resultados obtenidos se pudo apreciar un notable incremento en el perfil de volátiles al final de la oxidación del aceite. En la Figura 27 se observa el comportamiento lineal al comienzo de la producción de hexanal (primeros 240 minutos) y luego una

disminución en la concentración de hexanal, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio durante los tiempos (6 meses) de almacenamiento, donde la mayor producción se encontró durante el segundo mes de almacenamiento, como se explicó anteriormente.

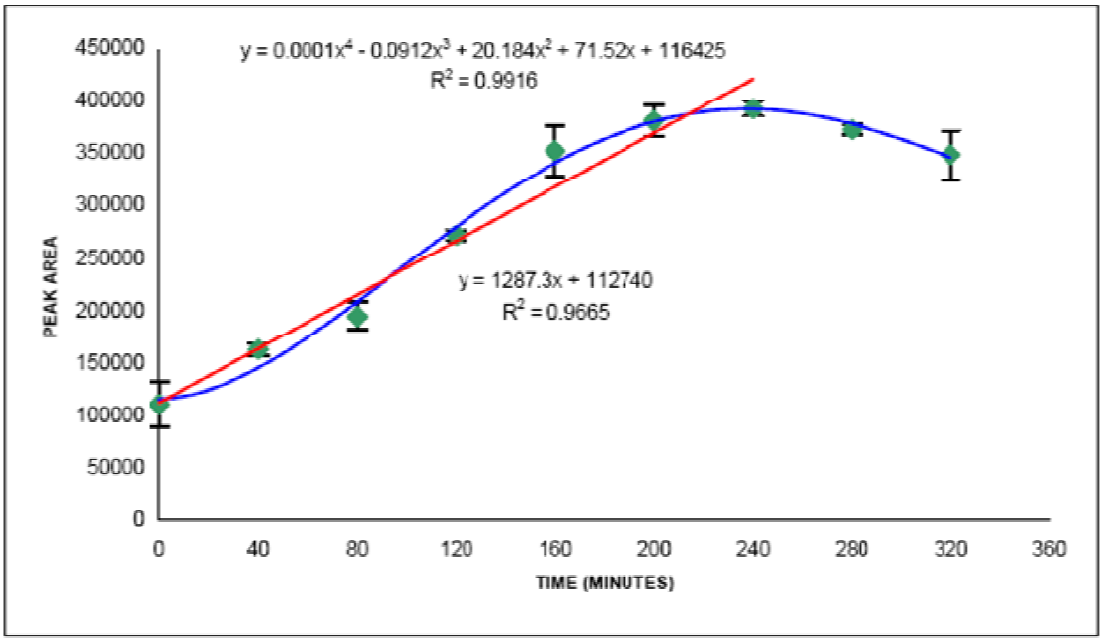


Figura 27. Contenido de hexanal vs tiempo de oxidación (Navarro-García 2002).

Morales et al., (1997) estudiaron los cambios producidos en los compuestos volátiles del aceite de oliva por la aplicación de un proceso de termooxidación acelerada. Ellos observaron la oxidación continua que van sufriendo los productos obtenidos durante la oxidación secundaria de los ácidos grasos y que el hexanal producido se descompone en su ácido correspondiente, acido hexanoico por lo que después de dos meses de almacenamiento la cantidad de hexanal disminuye considerablemente.

4.5. Análisis sensorial

Aunque se hicieron pruebas preliminares algunos panelistas manifestaron dificultad en la clasificación de la muestras, especialmente las de más bajas concentraciones de eritorbato de sodio en el pescado. Según el panel sensorial y la prueba de Chi cuadrado, hubo por lo menos una diferencia significativa en la rancidez de los pescados tratados con las diferentes concentraciones de eritorbato. Los resultados obtenidos no coinciden con lo que se esperaba, ya que el panel sensorial determinó que la muestra de menor rancidez es la que no contenía antioxidante (0 ppm) y la muestra de mayor rancidez es 500 ppm, lo cual podría ser que rechazaron el sabor a químico del eritorbato y lo asociaron con la rancidez. Para establecer qué concentraciones fueron las que marcaron la diferencia, se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre las medias de los tratamientos. Los resultados de dicha prueba mostraron que hay diferencias significativas ($p<0.05$) en rancidez entre los tratamientos de 500 ppm y 0 ppm (Tabla 9). Las comparaciones entre las otras concentraciones no mostraron diferencias significativas en rancidez ($p>0.05$). Las otras muestras que contenían antioxidante (500 y 5 ppm) no son diferenciables para el grupo de panelistas. Se hizo un estudio sobre evaluación sensorial encontró más aceptable en sabor y textura las muestras almacenadas por 5 días que las muestras que contenían polifosfato y eritorbato, almacenadas durante el mismo tiempo (Kelleher, 1982).

Tabla 9. Resultados de la prueba de comparaciones múltiples.

Tratamientos	Diferencia entre medias de tratamientos
50,000 ppm - 500 ppm	9
50,000 ppm - 5 ppm	1
50,000 ppm - 0 ppm	9
500 ppm - 5 ppm	8
500 ppm - 0 ppm	18
5 ppm - 0 ppm	10

La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos de la prueba de ordenamiento simple realizada a los seis meses de almacenados los peces (pacú). Estos resultados sugieren que a pesar del entrenamiento previo, los panelistas confundieron el sabor a rancio con el sabor a químico del eritorbato de sodio, por eso la muestra que no tenía eritorbato de sodio resulto ser la de menor rancidez.

Tabla 10. Resultados de la evaluación sensorial de la prueba de ordenamiento simple.

Muestra	Tratamineto	Suma Ordenada	Grado de Rancidez
B	500 ppm	68	Mayor
C	5ppm	60	↓
A	50000 ppm	59	↓
D	0 ppm	50	Menor

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a la curva de congelación del pescado obtenida en este estudio, la temperatura de -8°C fue la temperatura determinada como adecuada para que ocurriera el proceso de rancidez oxidativa. Se determinó que temperaturas menor o igual que -4°C podrían dar espacio a otras tipos de rancidez debido que por encima de esta temperatura hay mayor cantidad de agua disponible en el músculo del pescado para el desarrollo de rancidez hidrolítica y cetónica.

Se observa una ligera disminución del contenido de humedad del músculo del pescado a través del tiempo, la cual se evidenció mejor en el 4º mes.

No se observaron diferencias significativas en el contenido de grasa entre los diferentes meses de almacenamiento ni entre las diferentes concentraciones de eritorbato. La ligera tendencia a disminuir en el contenido de grasa a través del tiempo observada probablemente se debió a que el producto perdió humedad, por consiguiente el aumento se estima en función de la base seca que va quedando. También una parte mínima de la grasa se pudo transformar químicamente (oxidación registrada a través de la producción de hexanal.).

De los resultados obtenidos en el análisis de cuantificación de eritorbato de sodio (por HPLC), no se puede concluir que hubo una disminución del antioxidante a través de los tiempos de almacenamiento debido a la oxidación promovida por los ácidos grasos poliinsaturados presentes en el pescado. Aparentemente hay una baja absorción del eritorbato por el músculo del pescado. y dado que las concentraciones que se utilizaron pudieron ser relativamente bajas, excepto la concentración de 50,000 ppm.

El eritorbato de sodio tuvo un efecto antioxidante lo cual se reflejó claramente con el análisis de hexanal a través de GC-MS, en particular durante el segundo mes de almacenamiento del pescado. A mayor concentración de eritorbato, menor producción de hexanal fue detectado en los filetes de pescado, lo cual evidencia el efecto del antioxidante (eritorbato de sodio) en la disminución la rancidez oxidativa o formación de compuestos volátiles. La mayor producción de hexanal se observó en el control, tal como se esperaba, ya que este no contenía antioxidantes. Es decir hubo mayor producción de compuestos volátiles (hexanal) debido a la ausencia de antioxidantes.

Los resultados muestran que el hexanal probablemente se descompuso en compuestos terciarios lo cual se refleja por su disminución apreciable después del segundo mes de almacenamiento.

Según el panel sensorial realizado por los panelistas, existe una diferencia significativa en rancidez entre los filetes tratados con concentraciones de eritorbato de sodio de 0 y 500 ppm, encontrándose mayor rancidez en los filetes tratados sin eritorbato de sodio (0 ppm). Estos resultados no coinciden con la prueba de hexanal, la cual indica que a mayor contenido de antioxidante, menor desarrollo de rancidez.

6. RECOMENDACIONES O TRABAJOS FUTUROS

Evaluar el efecto antioxidante del eritorbato de sodio en filetes de pescado que tengan mayor contenido de grasa, tales como: Macarela, Salmon, Jurel, entre otros.

Usar pacú alimentado adecuadamente, de tal manera que el contenido graso aumente y contribuya al desarrollo de rancidez.

Evaluar el efecto antioxidante del eritorbato de sodio aumentando las concentraciones de eritorbato de sodio en los filetes de pescado y el tiempo de inmersión para mejorar su detección y cuantificación por el método de HPLC, permitiendo mayor absorción del mismo en el músculo del pescado.

Realizar la curva de calibración para la determinación y cuantificación de componentes volátiles (hexanal) por la técnica instrumental de micro-extracción de fase sólida (SPME) y no por inyección directa de las los estándares para cuantificar adecuadamente el contenido de hexanal presente en la muestra y establecer mejor si hubo un efecto antioxidante del eritorbato de sodio en el muestras de filete de pescado.

Entrenar a un panel sensorial por un periodo de tiempo mayor, de tal forma que puedan identificar correctamente las muestras.

7. LITERATURA CITADA

Ackman, R. “Fish lipid. Part. I y II. Advances in fish Science and Technology Fishing. New books. LTD. England, pp 86. (1980).

Ajuyah A, Fenton T, Hardin R, Sim J. Measuring lipid oxidation volatiles in meats. J. Food Sci. 58:270-3. (1993).

AOAC. “Official methods of Analysis of Official Analytical Chemist”. 13th ed. Ed. por Morwits, W. Washington. D.C. (1980).

Aubourg S**.** Lipid damage detection during the frozen storage of an underutilized fish species. Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC). Food Research International. Volumen 32, Issue 7. 1999.

Barlow S. y Stansby M. Nutritional evaluation of Long-Chain Fatty Acids in Fish Oil. Academic Press, N.Y. (1982).

Barringer S, Abu-Ali J, y Chung H. Electrostatic powder coating of sodium erythorbate and GDL to improve color and decrease microbial counts on meat. Innovative Food Science & Emerging Technologies. Volume 6, pag. 189-193. 2005.

Bello R, Rivas A. Evaluación y aprovechamiento de la cachama cultivada, como fuente de alimento. Apoyo a las Actividades Regionales de Acuicultura para America Latina y el Caribe (AQUILA). Reporte No. 2. FAO. P 121 pg. (1992).

Ben-gigirey J. Vieites De S, Villa T, Barros T. Chemical Changes and Visual Appearance of Albacore Tuna as Related to Frozen Storage. J. F. Sci.64 (1), 20–24. Volume 64 Pg 20-24. (1999).

Bianchi F, Careri M, Musci M y Mangia A. Fish and food safety: Determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC–MS analysis. Food Chemistry**.** Volume 100, Issue 3, Pages 1049-1053. 2007.

Botta J. Evaluation of Seafood Freshness Quality. VCH Publishers, Inc., N.Y. (1995).

Physiol Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction abd purification. Can J Biochem. 37(8): 911-17. (1959).

Brown P. Analytical Chemistry, Vol. 62, pp. 995-1008. (1990).

Brunton N, Cronin D, Monajan F. Volatiles components associated with freshly cooked and oxidized off-flavours in turkey breast meat. Flav Fragr j. 17:327-34. (2003).

CIDACPR (Centro para la Investigación y Desarrollo de la Acuicultura Comercial en Puerto Rico). Folleto informativo del centro de investigación y desarrollo de la acuicultura Comercial en Puerto Rico. Departamento de Ciencias Marinas. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, PR.

Charalambous G. Shelf Life Studies of Foods and Beverages. Elsevier Science Publisher, New York. 1993.

Dawson L, Uebersax K y Ubersax M.“Stability of fresh-water Sucker (Catostomus spp) flesh during frozen storage”. J. Fish. Res. Board Can 35:253. (1978).

De Man J, Principles of Food Chemistry. Maryland (1999).

Deng, J. “Effect of ice storage in free fatty acid production and lipid oxidation in mullet muscle”. J. Food Sci. 43: 337. (1978).

DiCesare J, Dong M, Vandermark F. Am. Lab., No. 13, p. 52. (1981)

Dorschel C, Ekmanis J, Oberholtzer J, Warren F. y Bidlingmeyer B. Analytical Chemistry, , Vol. 61, pp. 951-968. (1989).

Dupuy H, Bailey M, St. Angelo A, Vercelloti J, Legendre M. Instrumental analysis of volatiles related of warmed-over flavor of cooked meats. In: St Angelo A, Bailey M, editors.

FAO (Food and Agriculture Organization) Repor, 2004. States of World Fisheries and Aquaculture – 2004.http://www.fao.org/docrep/007/y5600e/y5600e00.htm

Fessler J. Erythorbic Acid and Ascorbic Acid as Antioxidants in Bottled wines. Am. J. Enol. Vitic. 12:1:20-24 (1961)

Flavor quality of fresh meats: warmed over flavor. Orlando, Florida: Press. P 165-90. (1987)

Fisher, R.A. The design of experiments. Edinburgh: Oliver & Boyd. (1935)

Frankel E, In search for better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in foods lipids. Trends Foods Sci Technol 4:220-5. (1993).

Food and Drug Administration (FDA), Letter regarding dietary supplement health claim for omega-3 fatty acids and coronary heart disease. [Online]. Available: http://www.fda.gov [8 December (2004)].

Gray J, Gomma E, Buckley D, oxidative quality and shelf life of meats. Meats Sci 43:S111-23. (1996).

Hearn T, Sgoutas S, Sgoutas D, Hearn J. Stability of polyunsaturated fatty acids after microwave cooking of fish. J Food Sci. 52(5): 1430-1. (1987)

Headspace gas chromatography/mass spectrometry characterization of volatiles produced in fish oil enriched mayonnaise during storage. J Agric Food Chem 48:4858–4867. (2000).

Iglesias J, Lois S, Medina I. Development of a solid-phase microextraction method for determination of volatile oxidation compounds in fish oil emulsions. Instituto de Investigaciones Marinas del CSIC. 2007.

Izquierdo P, Torres G, Barboza Y, Márquez E, Allara C. 2000. Análisis proximal, perfil de ácidos grasos, aminoácidos esenciales y contenido de minerales en doce especies de pescado de importancia comercial en Venezuela. Universidad del Zulia. Venezuela. (2000).

Jear V, Ste-Marie L. y Montgomery J. Striatal Metabolism of Hexanal, a Lipid Peroxidation Product, in the Rat. J. Metabolic Brian Disease. Vol. 4, No. 2. (1999).

Kanner J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. Meats Sci 36:169-89. 1994.

Ladikos D, Lougovois V. Oxidation in muscle foods: a review. Food chem. 35:295-314. (2004).

Lewis M. Physical Properties of Foods and Food Processing Systems. Woodhead Publishing. Pg. 230-233. (1996).

Lykkesfeldt, J, Bolbjerg, M, Poulsen H. Effect of smoking on erythorbic acid pharmacokinetics. British Journal of Nutrition. Volume 89, Number 5, pp. 667-671(5). (2003).

Lebron L, Efecto de diferebtes concentraciones de vitamina C (Ácido L-Ascórbico) en el desarrollo de rancidez oxidativaen filetes de tilapia (Oreochromis niloticus) congelados. Tesis (2006), Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico.

Lewis M, Propiedades físicas de los alimentos procesados. (1993)

Lil1elund K, Tercefal F. El Pescado como Alimento. Editorial Everest. S.A. España, (1988).

Lowell R. Biochemical and Biophysical Perspectives in marine biology. New York: Academic Press, (1978).

Makoto A, Masaru Y, Song H, Eric T, Glickman J, Petasis A, Blumberg R, y Serhan Ch. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. J. Immunology.178(6):3912-3917.

Meilgaard M., Civille G. y B. Thomas. 1999. Sensory Evaluation Techniques. CRC Press, New York. (2007).

Meilgaard M, Civille G y Carr B, Sensory Evaluation. Techniques (3rd edn). CRC Press, New York (1999).

Mancini R, Hunt M, Seyfert M, Kropf D, Hachmeister K, Herald T y Johnson D. Comparison of ascorbic acid and sodium erythorbate: Effects on the 24 h display colour of beef lumbar vertebrae and *longissimus lumborum* packaged in high-oxygen modified atmospheres. Met Science, Vol. 75, pag.38-43. 2007.

Morris, D. and Dawson, L. “storage stability of mechanically deboned Sucker (Catastomide) flesh”. J. Food Sci. 44: 1093. 39:11.(1979).

Navarro G, Bringas L. y Pacheco R. Nueva herramienta para el Estudio de la Oxidación de los Ácidos Grasos, una de las Causas Fundamentales de la Perdida de Calidad de los alimentos para la acuicultura. Memorias del Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. México. (2004).

Nissen L, Byrne D, Bertelsen G. y Skibsted L. The antioxidative activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. Meat Science. Volume 68, Issue 3. Pag. 485-495. 2004.

Nelson, Joseph S. "Colossoma macropomum". John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-25031- 7. FishBase. Ed. Ranier Froese and Daniel Pauly. (2007).

Pawliszyn, J. Quantitative Aspects of SPME. En: J. Pawliszyn (ed.). Applications of Solid Phase Microextraction. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. (1999).

Ramachandra Nair, K. and Gopakumar, K. (1981). “Effect of dietary deposition of fat and fatty acid composition of Tilapia (Tilapia mossambica). J. Food Sci. Technol. 18:108.(1981).

Romero N, paz R, Masson L, Luck C, Loreto A. Composición en ácidos grasos y aporte de colesterol de conservas de jurel, sardina, salmón y atún al natural. Arch Latinoamer Nutr; 46(1): 75-77. (1996)

St. Angelo A, Crippen K, Duppuy H, James C. Chemical and sensory studies of antioxidant-treated beef. J. Food Sci.55:1501-5.

Schlichtherle H, Oberholzer D, Sottnikova L, Scheeder M y Hadorn R. Volatiles in Meat Products with Elevated N-3 Fatty Acid Contents , Switzerland 2 Institute of Animal Sciences, Swiss Federal Institute of Technology, 8092 Zurich, Switzerland (2006).

Shahidi, F. y Botta R. Hexanal as an Indicator of the Flavor Deterioration of Meat and Meat Products. En: En: C. T. Ho y T. G. Thomas (eds.). Lipids in Food Flavors. American Chemical Society, Washington, D. C. (1994)

Serhan, C. Resolvin E1. Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02115l. (2004).

Serham C, Gotlinger K, Hong S, y Makoto A.Resolvins, docosatrienes y neuroprotectines, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers:an overview of protective roles in catabasis. (2004). http://www.sciencedirect.com/?_ob=ArticleURL&_aset=V-W-A-AA-WAUUU-MsS.

Stansby M. Industrial Fishery Technology. New York: Ed. Reinhold Publishing Corporation, (1963).

Tappel A. “Hematin Compounds and lipoxidasa as biokatalists”. En “Lipid and their oxidation”. pp. 122. Shults, h. Ed. AVI. Publ. Co., Westport. Conn. 442 p. (1965).

Thed S. y Erickson M. Alteration in lipid oxidation of channel catfish during frozen storage in response to isoascorbate applications. J. of Muscle Foods 5 (1), 37–48. (1994).

Thed S. y Erickson M. Absorption of dissolved isoascorbate by live channel catfish (ICTALURUS PUNCTATUS), J. of Food Processing and Preservation 16 (3), 185–192. (1992).

Thurston C. Stansby M. Karrick N. Miyauchi D. and Clegg W. “Composition of certain species of fresh-Water Fish. II. Comparative data for 21 species of lake and river fish”. Food research. 24:493. (1959).

Tukey, J. The Problem of Multiple Comparisons. Unpublished manuscript. Princeton University. (1953

Tuerner S. The efficacy of using natural antioxidant blends to control oxidative rancidity in headed and gutted, filleted and minced rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) during frozen storage. Tesis de maestria. Virginia Polytechnic Institute and State. (1993).

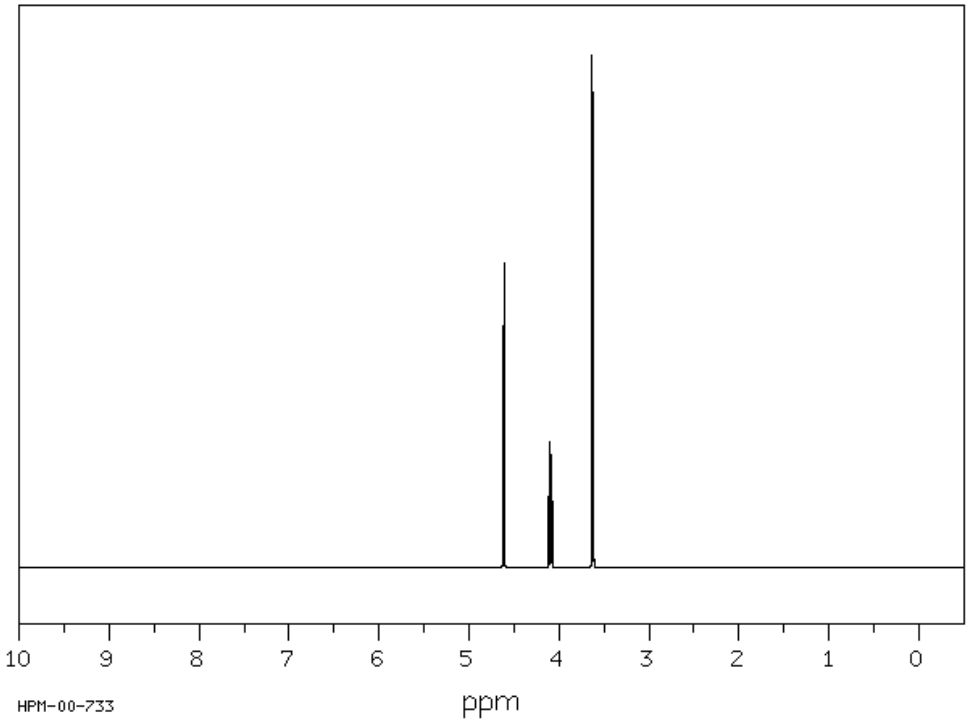
Vargas, K. M. Efecto de la vitamina C (L-ácido ascórbico) en el desarrollo de rancidez oxidativa en filetes de Tilapia (Oreochromis niloticus) congelados. Tesis MS. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R. 2001.

Yasaei P, Yang G, Warner W, Daniels D. y Ku Yuoh. Singlet oxygen oxidation of lipids resulting from photochemical sensitizers in the presence of antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Sosiety. Springer Berlin / Heidelberg. (2006)

Zamil M, Rawdah T, Attar K, Arab M. Mineral and proximate composition of some commercially important fish of the Arabian Gulf. Food Chem; 45: 95-8. 1992

8. APÉNDICES

Apéndice 1. Cromatograma característico del eritorbato de sodio por resonancia magnética nuclear (RMN).



Apéndice 2. Hoja de la evaluación sensorial de los panelistas.

Universidad de Puerto Rico
Recinto Universitario de Mayagüez
Facultad de Ciencias Agrícolas
Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Fecha: 27 de Septiembre de 2007

Tema: Prueba de Consumidor

Producto: Pescado Hexanal

Localidad: Recinto universitario de Mayagüez, Mayagüez, PR

Número de panelista _____

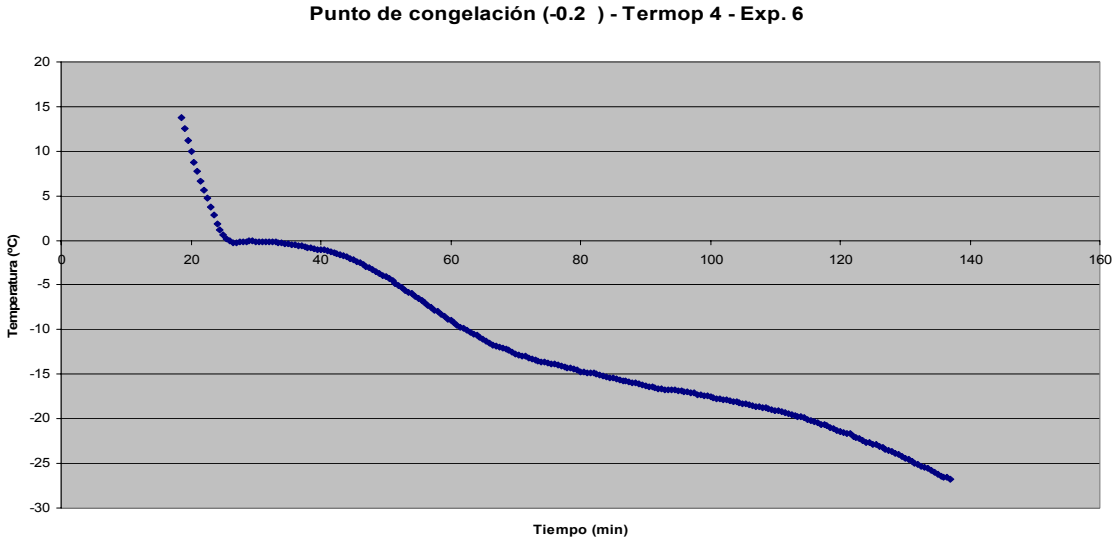
Información General: El Proyecto de investigación "Efecto del eritorbato de sodio en el desarrollo de rancidez oxidativa en filetes de pacú *(Colossoma macropomum) congelados"*, desarrolla esta prueba con el propósito de determinar la preferencia del consumidor por las diferentes muestras de pescado. La información solicitada se utilizará únicamente para proveer resolución al análisis y se mantendrá en confidencialidad. Favor de no incluir su nombre, dirección o teléfono en la hoja. Gracias por su colaboración.

Instrucciones: Se le presentan tres muestras de pescado identificadas con números aleatorios de tres dígitos. Evalúe cada muestra por separado de izquierda a derecha. Utilice los espacios provistos para colocarlas en orden de rancidez escribiendo un número de muestra en cada espacio. No se permiten empates. Si no puede decidirse, adivine. Favor de incluir un comentario sobre las formulaciones en la sección provista.

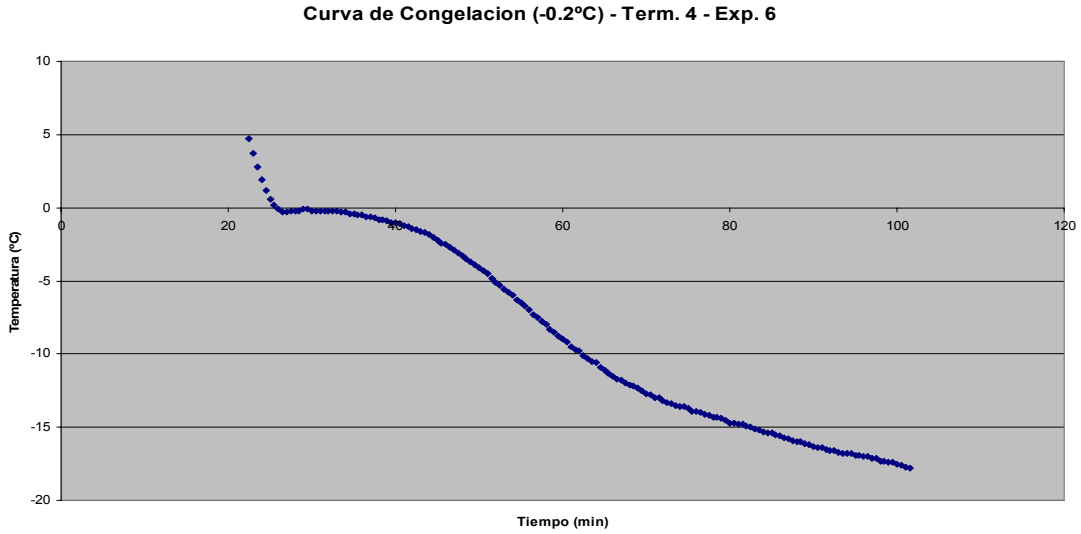
Orden de preferencia	**Muestra**
Mayor rancidez	_____
	_____
	_____
Menor rancidez	_____

Comentarios:_____
_____

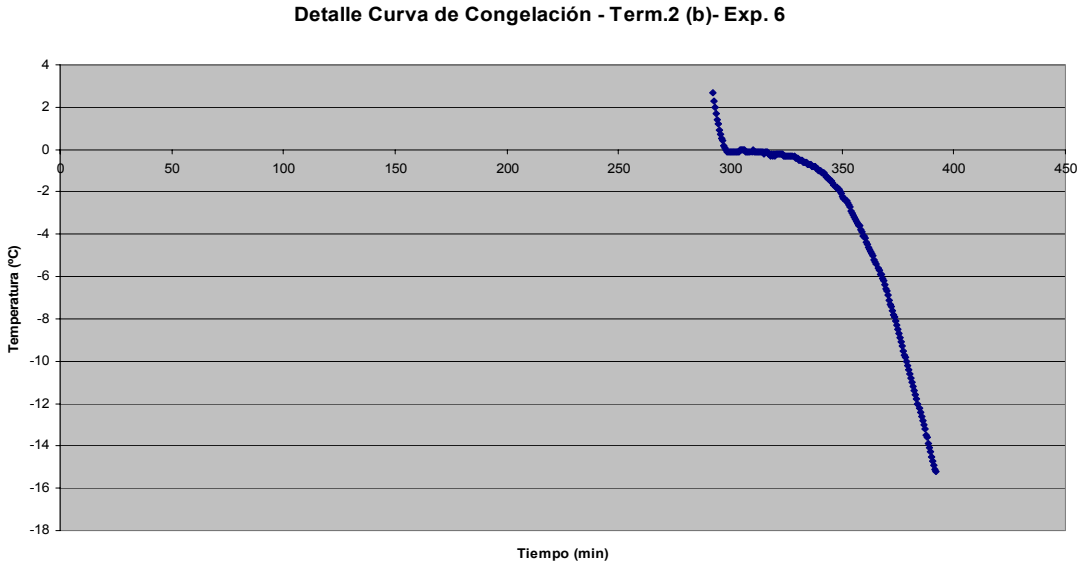
Apéndice 3. Curva de congelación de la parte que más tiene músculo.



Apéndice 4. Curva de congelación de la parte intermedia del musculo.



Apéndice 5. Curva de congelación de la parte que menos tiene musculo



Apéndice 6. Ubicación de los termopares en el filete congelado

Termopares	Registro de temperatura
1	Ultra-congelador (Blanco)
2	3er lugar en grosor de filete
3	2do lugar en grosor de filete
4	Parte mas delgada del filete
5	Parte mas gruesa del filete

Apéndice 7. Composición proximal promedio de los filetes de pescado (pacú).

Tiempo (mes)	Grasa (%)	Humedad (%)
T-0	1.97	57.53
T-2	1.92	55.92
T-4	2.16	54.15
T-6	2.39	52.22

Apéndice 8. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) del contenido de humedad.

Source of Variance	DF	SS	MS
Meses	3	1.65	0.551
Concentracion	3	1.23	0.41
Meses x Concentracion	9	4.61	0.512
Residual	32	17.82	0.557
Total	47	25.31	0.538
Source of Variance	F	P	
Meses	0.989	0.4106	
Concentracion	0.735	0.5386	
Meses x Concentracion	0.919	0.5217	
Residual			
Total			

Apéndice 9. Resultados promedio del contenido de humedad

Concentración de eritorbato de sodio	Meses de almacenamiento			
	0	2	4	6
A-50000	79.7	80.1	76.8	75.1
B-500	80.7	78.5	72.4	77.7
C-5	78.6	76.8	78.5	76.1
D-0	75.0	76.0	74.7	75.5

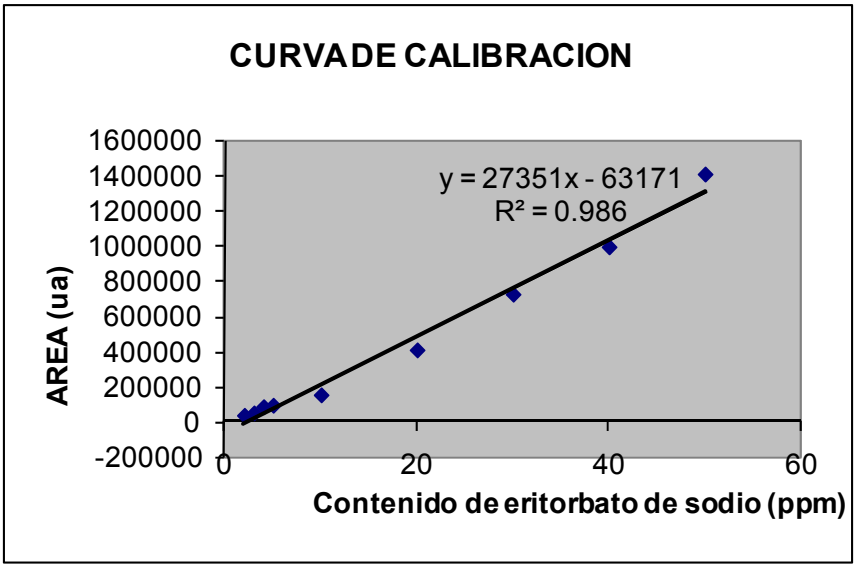
Apéndice 10. Resultados de análisis de varianza (ANOVA) del contenido de grasa.

Source of Variance	**DF**	**SS**	**MS**
Meses	3	67.6	22.52
Concentración	3	62.8	20.94
Meses x Concentración	9	71.5	7.94
Residual	32	245.8	7.68
Total	47	447.6	9.52
Source of Variance	F	P value	
Meses	2.93	0.0484	
Concentración	2.73	0.0604	
Meses x Concentración	1.03	0.4356	
Residual			
Total			

Apéndice 11. Resultados promedios del contenido de grasa.

Concentración de eritorbato	Meses de almacenamiento (%)			
	0	**2**	**4**	**6**
A-50000	2.2	1.8	2.0	1.9
B-500	1.6	2.2	1.7	2.5
C-5	1.8	2.2	2.6	2.9
D-0	2.3	1.4	2.4	2.3

Apéndice 12. Curva de calibración para la cuantificación del eritorbato de sodio por HPLC.



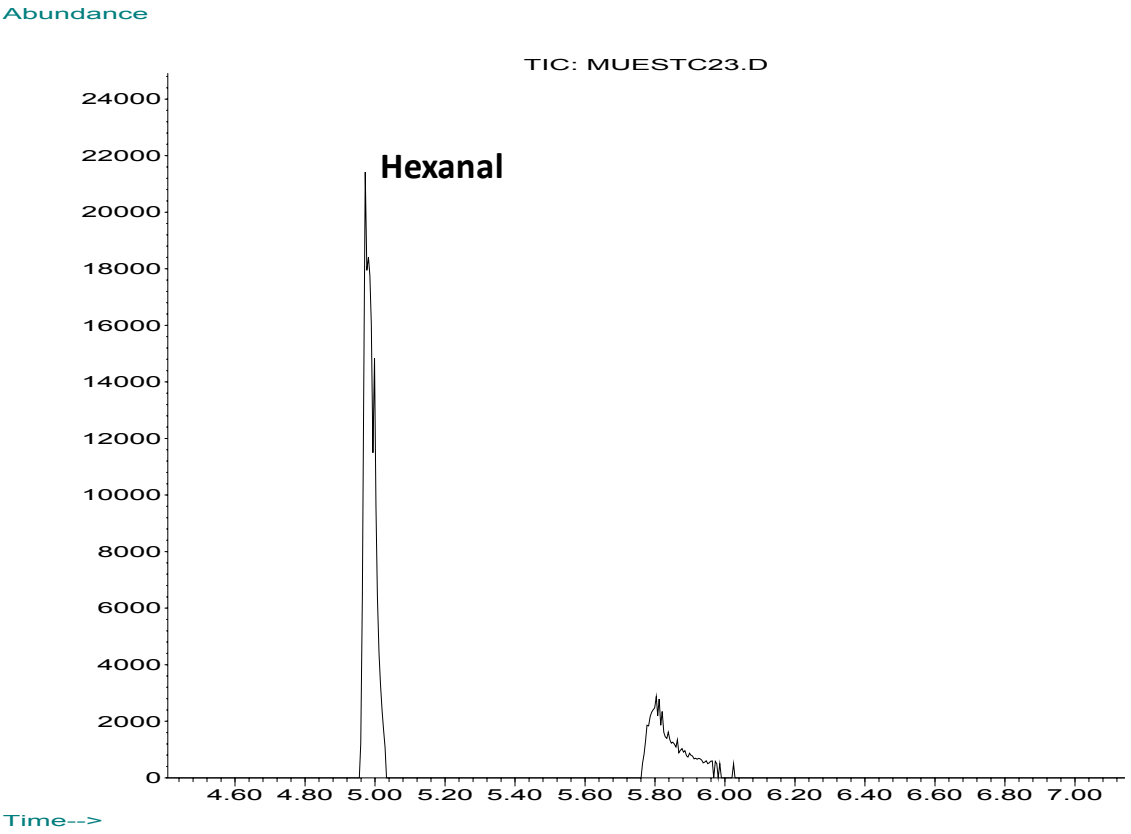
Apéndice 13. Resultados del eritorbato de sodio encontrados por cromatografía liquida (HPLC).

Código	Mes 0		Mes 2		Mes 4		Mes 6	
	mg/g	ppm	mg/g	ppm	mg/g	ppm	mg/g	ppm
A1	$3.10x10^{-4}$	11,8	$2.22x10^{-4}$	7,31	$3.03x10^{-4}$	10,4	$5.57x10^{-4}$	18,8
A2	$4.13x10^{-4}$	18,9	$7.81x10^{-4}$	26,9	$3.07x10^{-4}$	12,3	$5.37x10^{-4}$	17,2
A3	$2.84x10^{-4}$	14,0	$4.99x10^{-4}$	18,8	$5.37x10^{-4}$	18,1	$5.43x10^{-4}$	19,3
B1	$1.20x10^{-5}$	0,553	$2.30x10^{-4}$	0,677	$1.63x10^{-4}$	0,539	$1.61x10^{-1}$	0,644
B2	$1.00x10^{-5}$	0,543	$2.53x10^{-4}$	8,99	$1.69x10^{-5}$	0,540	$1.85x10^{-1}$	0,696
B3	$1.40x10^{-5}$	0,520	$1.60x10^{-5}$	0,746	$2.03x10^{-5}$	0,632	$1.40x10^{-1}$	0,560
C1	$1.50x10^{-5}$	0,520	$1.50x10^{-5}$	0,537	0,00	0,00	0,000	0,000
C2	0,00	0,00	$1.50x10^{-5}$	0,536	0,00	0,00	0,000	0,000
C3	0,00	0,00	$1.30x10^{-5}$	0,603	0,00	0,00	0,000	0,000
D1	0,00	0,00	$1.10x10^{-5}$	0,535	0,00	0,00	0,000	0,000
D2	0,00	0,00	$1.20x10^{-5}$	0,537	0,00	0,00	0,000	0,000
D3	0,00	0,00	0,000	0,000	0,00	0,00	0,000	0,000

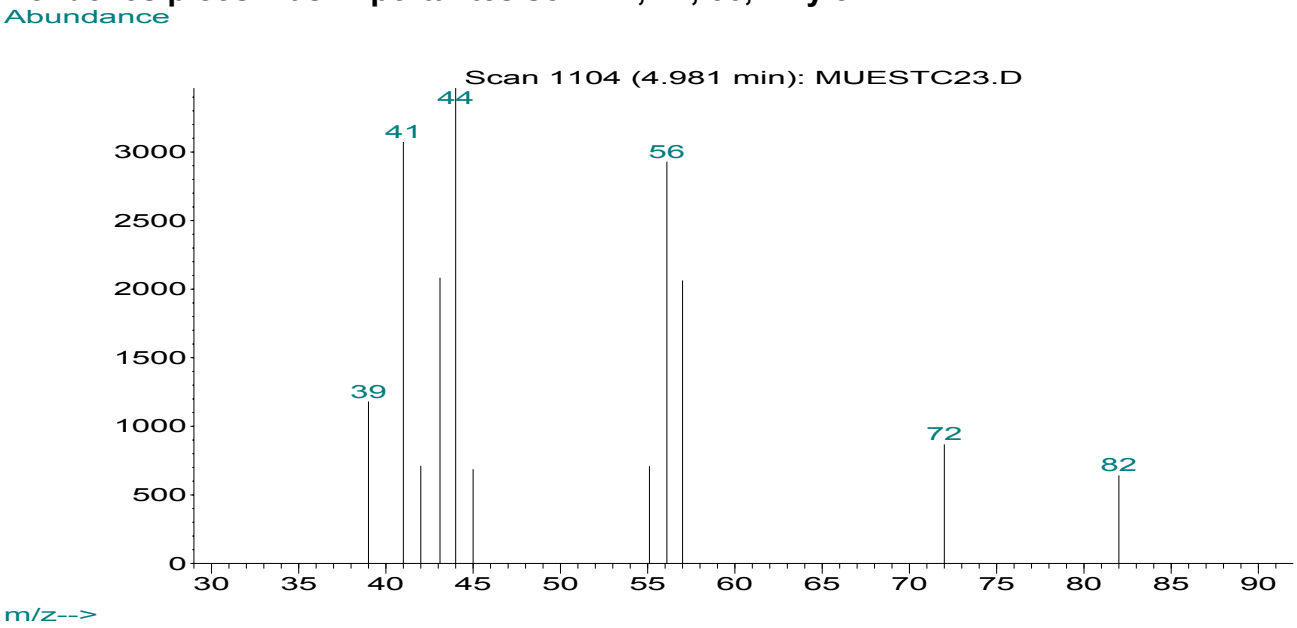
Apéndice 14. Análisis de varianza (ANOVA) de la prueba de cromatografía liquida (HPLC).

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Concentracion	143.232	3	47.7439	49.9844	0.0000	3.0088
Tiempo	1.950	2	0.9749	1.0207	0.3755	3.4028
Interaction	3.678	6	0.6130	0.6418	0.6959	2.5082
Within	22.924	24	0.9552			
Total	171.7841748	35				

Apéndice 15. Cromatograma del hexanal presente en los filetes de pescado con las diferentes concentraciones de eritorbato de sodio por GC-MS.



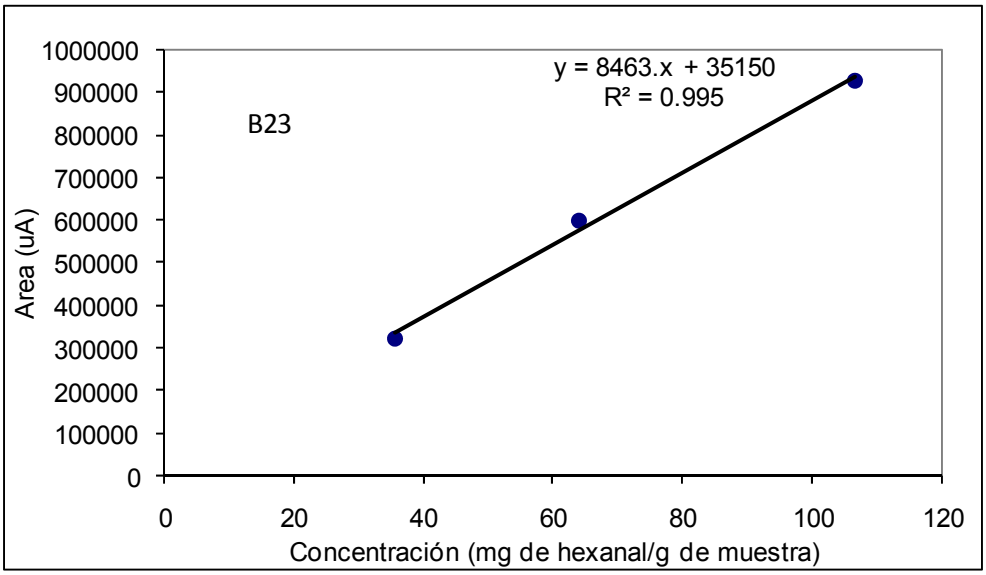
Apéndice 16. Picos característicos del cromatograma de hexanal por GC-MS. Donde los picos más importantes son: 41, 44, 56, 72 y 82.



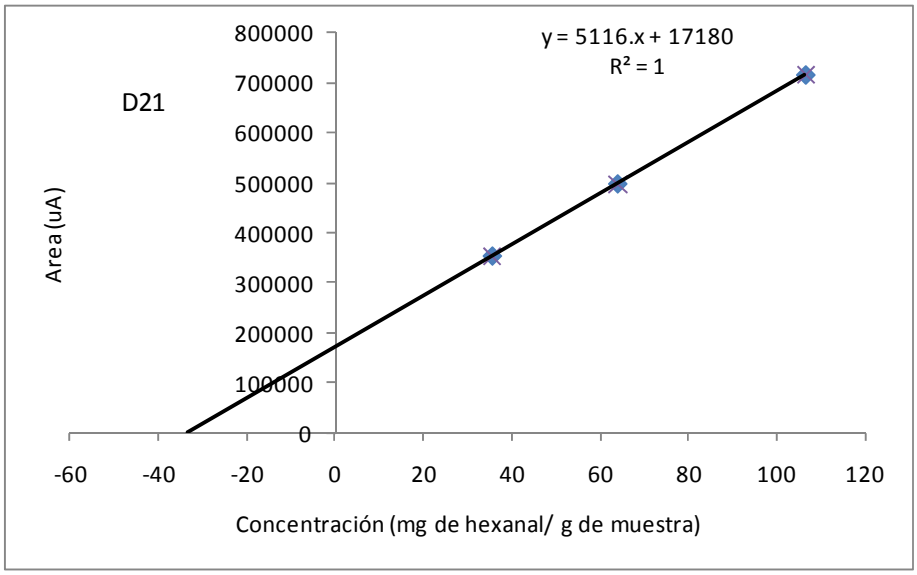
Apéndice 17. Contenido de hexanal (en área (uA)) presente en el pescado (pacú), por GC-MS, durante los seis meses de almacenamiento.

Concentración-Repetición	Tiempo			
	Mes 0	Mes 2	Mes 4	Mes 6
A-1	0	10000	0	5000
A-2	0	8000	0	2000
A-3	0	20000	0	0
B-1	0	20000	4200	12000
B-2	0	2000	7200	0
B-3	0	4000	3200	0
C-1	0	18000	13000	0
C-2	0	80000	2000	0
C-3	0	80000	2000	0
D-1	0	60000	0	9000
D-2	0	14000	0	2700
D-3	0	100000	0	8000

Apéndice 18. Curva para la cuantificación de hexanal mediante el método de adición de estándar en el segundo mes de almacenamiento por GC-MS. Donde B = 500 ppm; (2) = Mes de almacenamiento y (3) = Réplica



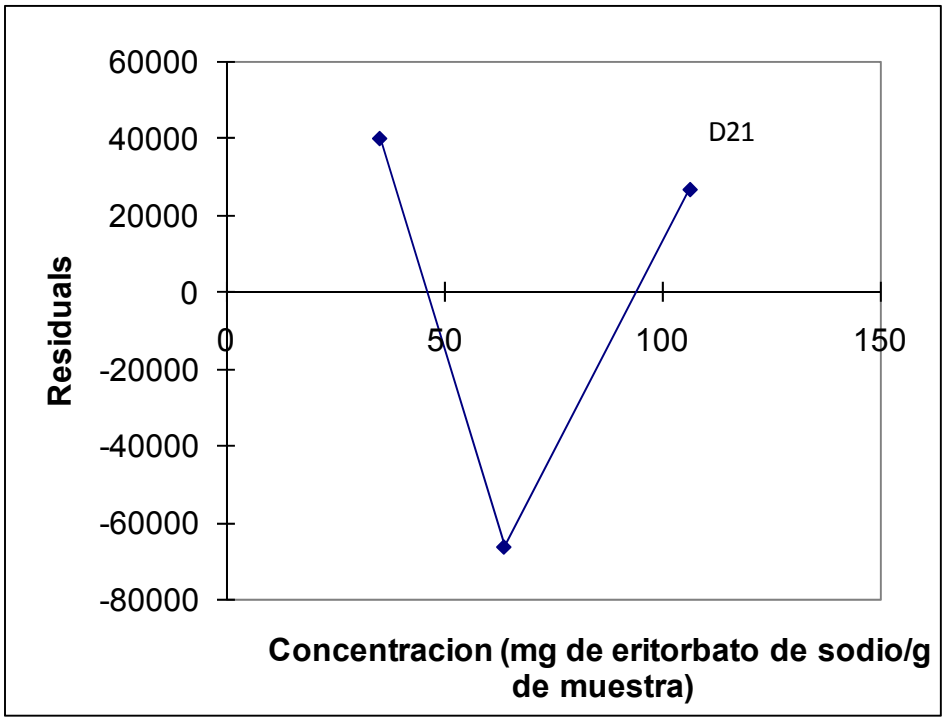
Apéndice 19. Curva de cuantificación de hexanal mediante el método de adición de estándar en el segundo mes de almacenamiento por GC- MS. Donde D = 0 ppm; (2) = Mes de almacenamiento y (1) = Réplica



Apéndice 20. Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados de la prueba de GC-MS.

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Concentración	1.79E+09	3	5.95E+08	2.806011	0.055382	2.90112
Meses de almacenamiento	9.63E+09	3	3.21E+09	15.13462	2.63E-06	2.90112
Interaction	5.39E+09	9	5.98E+08	2.821334	0.014621	2.188766
Within	6.79E+09	32	2.12E+08			
Total	2.36E+10	47				

Apéndice 21. Resultados residuales de las concentraciones de eritorbato de sodio durante el segundo mes de almacenamiento

Codigo	Residual	Codigo	Residual
	52080.3		-9380.8
	-86805.9		15634.7
A21	34725.6	**C21**	-6253.9
	8327.8		362045.0
	-13879.7		479346.0
A22	5551.9	C22	726209.0
	-13667.4		27308.0
	22779.1		-45513.3
A23	-9111.6	C23	18205.3
	-36692.7		213.6
	61154.5		-355.9
B21	-24461.8	D21	142.4
	-39976.7		-259.8
	66627.8		433.0
B22	-26651.1	D22	-173.2
	-13587.9		29446.8
	22646.4		-49078.0
B23	-9058.6	D23	19631.2

Apéndice 22. Comportamiento lineal de los resultados del segundo mes de almacenamiento obtenidos por GC-MS