

**EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VITAMINA C
(ÁCIDO L-ASCÓRBICO) EN EL DESARROLLO DE RANCIDEZ OXIDATIVA EN FILETES
DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) CONGELADOS**

Por

Lizbeth Lebrón Bosques

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
2006

Aprobado por:

John Kubaryk, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Edna Negrón de Bravo, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Emilio Díaz Morales, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Miguel A. Muñoz, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón de Bravo, Ph.D.
Coordinadora Programa Ciencia y Tecnología
de Alimentos

Fecha

Copyright © by

Lizbeth Lebrón Bosques and/or Emilio Díaz Morales

ABSTRACT

The presence of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids in tilapia is of great nutritional benefit for people eating it, but double bonds present in fatty acids make them very susceptible to deterioration caused by lipid oxidation, which can cause the development of off-flavors. The objective of this research was to evaluate the effect of different concentrations of ascorbic acid in the development of oxidative rancidity in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets stored at -18° C for a 6 month period. The ascorbic acid was added in the following concentrations: 0 ppm (control), 5 ppm, 500 ppm and 50,000 ppm (5%). The samples were taken monthly and the development of oxidative rancidity was evaluated by: 1) thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) determination, 2) fatty acid composition determination by GC-MS, 3) quantification of hexanal and identification of volatiles by SPME/GC-MS and 4) sensory evaluation. The vitamin C content did not change through the storage period in any of the treatments. TBARS values showed that the highest concentration of vitamin C (50,000 ppm) had a protection effect against rancidity. The fatty acid composition remained constant throughout the research therefore this analysis did not show any effect of the treatments of vitamin C used in fatty acid oxidation. The average of hexanal content between treatments suggested that 5 ppm and 50,000 ppm of vitamin C treatments had antioxidant effects in the fillets. There was a lower development of volatiles through the storage time in the treatment with the highest concentration of vitamin C (50,000 ppm), which suggests an antioxidant effect. Panelists in the sensory analysis found a less rancid taste in those samples containing 5 ppm and 50,000 ppm ascorbic acid, compared to a more rancid taste found in the control and 500 ppm. The results suggested that 50,000 ppm of ascorbic acid concentration was more effective than other treatments inhibiting lipid oxidation in frozen tilapia fillets. The study of oxidative rancidity in tilapia is

difficult due to the low fat content of this fish and the high reactivity of the oxidation products. The rancidity developed in tilapia during the 6 months of frozen storage was minimal, non detectable, and did not affect the quality of the product. This suggests the use of antioxidant in tilapia is not necessary to extend the shelf life of tilapia fillets as long as frozen storage is less than the 6 months used in this study.

RESUMEN

La presencia de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en pescado es de gran beneficio nutricional para las personas que lo consumen, pero los enlaces dobles que contienen estos ácidos grasos los hacen susceptibles al deterioro a causa de la oxidación de lípidos que pueden resultar en el desarrollo de “off-flavors”. El objetivo de esta investigación es evaluar el efecto de diferentes concentraciones de ácido ascórbico (vitamina C) en el desarrollo de rancidez oxidativa en filetes de tilapia (*Oreochromis niloticus*) almacenados a -18 °C por un período de 6 meses. El ácido ascórbico fue añadido en las siguientes concentraciones: 0 ppm (control) 5 ppm, 500 ppm y 50,000 ppm (5%). El desarrollo de rancidez oxidativa fue evaluado mediante: 1) determinación de ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), 2) determinación de composición de ácidos grasos por GC-MS, 3) cuantificación de hexanal e identificación de volátiles mediante SPME/GC-MS y 4) análisis sensorial. El contenido de ácido ascórbico en cada tratamiento no varió a través del tiempo de almacenamiento. Los valores de TBARS mostraron que la mayor concentración de ácido ascórbico (50,000 ppm) tuvo un efecto de protección contra la rancidez oxidativa. La composición de ácidos grasos se mantuvo constante durante todo el período de la investigación, por lo tanto en este análisis no se observó algún efecto de los tratamientos de ácido ascórbico en la oxidación de ácidos grasos. El promedio obtenido en el contenido de hexanal en los tratamientos sugiere que tanto el tratamiento con 5 ppm como 50,000 ppm de ácido ascórbico tienen efectos antioxidantes en la tilapia. Hubo menor producción de agentes volátiles durante el tiempo de almacenaje en la mayor concentración de ácido ascórbico (50,000 ppm), lo que sugiere un efecto antioxidante. En el análisis sensorial, los panelistas encontraron un sabor menos rancio en las muestras de filetes que contenían 5 ppm y 50,000 ppm de ácido ascórbico en comparación con un sabor más rancio de las muestras con 500 ppm de ácido ascórbico. Estos

resultados sugieren que el tratamiento de 50,000 ppm de ácido ascórbico fue un poco más efectivo en comparación con los otros tratamientos en inhibir la oxidación de lípidos en filetes de tilapia congelados. El estudio de rancidez oxidativa en tilapia es difícil debido al bajo contenido de grasa y a la alta reactividad de los productos de oxidación. La rancidez desarrollada en tilapia durante 6 meses de almacenamiento congelado es mínima, no detectable y no afecta la calidad del producto. Esto sugiere que el uso de antioxidantes en tilapia no es necesario para extender el largo de vida de los filetes siempre y cuando el almacenamiento congelado sea menos de 6 meses.

DEDICATORIA

De niña fuiste mi alegría y esperanza de un mundo mejor. Porque aprendí de ti que todo lo que nos rodea es hermoso y siempre hay que sonreír. Porque aprendí que lo importante de un ser humano no es la inteligencia, lo verdaderamente importante es lo que hagas con ella para el bien de los demás.

A mi canita blanca que hoy es parte del bordado del manto de Dios.

A Mamá Concha. Siempre te amaré...

AGRADECIMIENTOS

Si he llegado hasta aquí es gracias al aliento de vida, inspiración y fortaleza de un Ser Supremo, a ti mi Dios, gracias. Porque nunca me fallarás y en mis nuevos caminos me cuidarás.

Deseo agradecer a todos los que tienen una parte especial en esta investigación. Al Dr. Emilio Díaz, por creer en mi y darme la oportunidad de hacer este proyecto. Gracias por regalarme de su tiempo, ser mi consejero y guiarme a través de este largo proceso. De igual manera quiero agradecer a los miembros de mi comité graduado. A la Dra. Edna Negrón de Bravo, por no dejarme ir en las dificultades y por enseñarme que la universidad no es solo un promedio sino que es donde se forjan los líderes y se desarrolla un profesional completo. Al Dr. John Kubaryk, por su colaboración en la obtención de las muestras, su apoyo, su disponibilidad y sugerencias durante la investigación.

Al Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos, el Departamento de Química y sus empleados, por prestarme sus instalaciones, equipos y ayuda. La Sub-Estación Piscícola de la Estación Experimental en Lajas del Centro de Investigación y Desarrollo de la Acuicultura Comercial en Puerto Rico (CIDACPR) y sus empleados por proveerme los filetes de tilapia utilizados en esta investigación.

Quisiera agradecer al Dr. Raúl Machiavelli por su ayuda en el análisis estadístico, al Dr. Félix Román por su ayuda en el análisis de Microextracción de Fase Sólida (SPME), al Dr. Fernando Pérez Muñoz por su ayuda con el análisis sensorial, a la Dra. Doris Ramírez por prestarme su laboratorio de investigación. A Keyla por ayudarme en los comienzos de la tesis y a Yolanda por adiestrarme en el funcionamiento del cromatógrafo de gas.

En especial gracias a mis grandes amigos de CITA. A la Prof. María de L. Plaza gracias por su ayuda en los análisis químicos y por ser una gran amiga. A Bessie y Don Ruper, gracias por su siempre estar disponibles para mi.

Gracias a todos mis amigos y amigas: Beatriz, Samara, Sharon, Lisandy, Diana, Marilú, Katherine, Víctor, Luis, Jorge, Arnaldo, Javier y Jessica. Por su apoyo y ayuda directa o indirectamente con esta investigación. Sin ustedes la vida no tendría esa magia especial.

Finalmente e igual de importante, a toda mi familia porque siempre han creído en mi. A mis padres por sus oraciones y apoyo incondicional, la persona que soy se lo debo a ustedes. A mi madre Olga Lilliam, porque me entregaste tu vida para hacer mejor la mía. A mi padre Rubén, porque tú lucha incansable de ser mejor día a día hoy se refleja en mi. A mi hermano Rubén, por ser mi alegría, estar siempre para mi y regalarme dos hermosos sobrinos, Alanis y Abdel, que iluminaron mi vida. A mi hermano José Rubén, por hacerme pensar que la vida es un reto y que tengo mucho que ofrecer a los demás. Los amo.

A todos infinitas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	ii
RESUMEN.....	v
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
TABLA DE CONTENIDO.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABLAS.....	xiii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	3
2.2 Rancidez.....	4
2.3 Rancidez oxidativa.....	5
2.4 Antioxidantes	9
2.5 Vitamina C (ácido L-ascórbico).....	10
2.6 Análisis químicos.....	13
2.6.1 Determinación de vitamina C (ácido L-ascórbico)	13
2.6.1.1 Cromatografía líquida de alta eficacia (“HPLC”).....	13
2.6.2 Determinación de la composición de ácidos grasos.....	15
2.6.2.1 Cromatografía de gas - espectrometría de masas (GC-MS)	15
2.6.3 Prueba de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).....	16
2.6.4 Determinación de hexanal y compuestos volátiles	16
2.6.4.1 Microextracción en fase sólida (SPME)	18
3 MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Recolección de las muestras.....	20
3.2 Tratamiento a filetes y almacenamiento.....	21
3.3 Preparación de la muestra	21
3.4 Análisis químicos.....	22
3.4.1 Determinación del porcentaje de humedad (AOAC, 1990 sección 950.02).....	22
3.4.2 Determinación del contenido de ácido L-ascórbico (vitamina C).....	22
3.4.2.1 Extracción de ácido L-ascórbico.....	23
3.4.2.2 Cuantificación de ácido L-ascórbico mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (“HPLC”)	24
3.4.2.3 Preparación de la curva estándar.....	24
3.4.3 Prueba de ácido 2-tiobarbitúrico (“TBA Test”).....	25
3.4.3.1 Curva estándar	25
3.4.3.2 Preparación de la muestra	26
3.4.4 Determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gas acoplada a un detector de masa (GC-MS)	27

3.4.4.1	Preparación de los estándares	27
3.4.4.2	Extracción y purificación de lípidos	27
3.4.4.3	Saponificación y esterificación	27
3.4.4.4	Extracción a hexano	28
3.4.4.5	Caracterización de ácidos grasos mediante cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS)	28
3.4.5	Cuantificación de hexanal y compuestos volátiles mediante Microextracción de Fase Sólida (SPME) y análisis por cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas	30
3.4.5.1	Extracción mediante Microextracción de fase sólida (“SPME”).....	30
3.4.5.2	Caracterización compuestos volátiles	31
3.5	Análisis sensorial.....	32
3.5.1	Adiestramiento de los panelistas	32
3.5.2	Análisis sensorial luego de seis meses de almacenamiento	32
3.6	Diseño estadístico experimental.....	33
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1	Porcentaje de humedad	34
4.2	Cuantificación de ácido L-ascórbico (vitamina C) mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (“HPLC”)	36
4.3	Prueba de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).....	38
4.4	Determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gas acoplada a un detector de masa (GC-MS).....	40
4.5	Cuantificación de hexanal y caracterización compuestos volátiles mediante Microextracción de Fase Sólida (SPME) y análisis por cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas	43
4.5.1	Cuantificación de hexanal mediante SPME-GC/MS	43
4.5.2	Caracterización de compuestos volátiles mediante SPME-GC/MS.....	46
4.6	Análisis sensorial.....	55
5	CONCLUSIÓN	58
6	RECOMENDACIONES	60
7	BIBLIOGRAFÍA.....	61
8	APÉNDICE	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Oxidación de ácido L-ascórbico a ácido dehidroascórbico.....	10
Figura 2.	Componentes básicos del sistema de cromatografía de alta eficacia (HPLC)	14
Figura 3.	Proceso de extracción de “headspace” de analitos mediante la fibra de Microextracción de fase sólida (SPME). (Tomado de Supelco, Bellefonte, PA.)	19
Figura 4.	Fotos de Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>), recolección y preparación de las muestras.....	20
Figura 5.	Cromatógrafo líquido modelo HP 1100 con un detector de espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) utilizado para la cuantificación de ácido ascórbico.....	23
Figura 6.	Cromatógrafo de gas Hewlett-Packard HP 6980 series acoplado a un detector HP 5973 MS (espectrómetro de masas)	29
Figura 7.	Extracción de volátiles del “headspace” mediante la aguja de micoextracción de fase sólida (SPME).....	30
Figura 8.	Porcentaje de humedad en filetes de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) a través del tiempo de almacenamiento.....	36
Figura 9.	Contenido de malonaldehído (TBARS) en filetes de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) a través del tiempo de almacenamiento	38
Figura 10.	Interacción no ordenada entre el factor de tratamiento de ácido ascórbico y el factor de tiempo de almacenamiento a través del tiempo de almacenamiento	45

Figura 11. Porcentaje relativo de compuestos volátiles identificados mediante SPME-GC/MS por tratamiento de ácido ascórbico a través del tiempo de almacenamiento.....	47
Figura 12. Compuestos volátiles identificados por SPME-GC/MS en el “headspace” del filete de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) a través del tiempo de almacenamiento.....	48
Figura 13. Compuestos volátiles identificados por SPME-GC/MS en el “headspace” del filete de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) por tratamiento de ácido ascórbico (vitamina C).....	49
Figura 14. Hoja de panelistas para adiestramiento del panel sensorial.	68
Figura 15. Hoja de panelistas para la evaluación de rancidez en filetes de tilapia por panel sensorial.	69
Figura 16. Cromatogramas obtenidos del análisis de hexanal y compuestos volátiles mediante SPME/GC-MS.....	70
Figura 17. Cromatogramas obtenidos del análisis de composición de ácidos grasos mediante GC-MS.....	71
Figura 18. Cromatograma típico obtenido del análisis de contenido de ácido ascórbico (vitamina C) mediante HPLC.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Aldehídos formados de la descomposición de hidroperóxidos en la autooxidación de ácidos grasos poliinsaturados	18
Tabla 2.	Condiciones utilizadas durante el análisis de L-ácido ascórbico mediante cromatografía líquida de alta eficacia (“HPLC”).....	24
Tabla 3.	Volumen necesario de malonaldehído, agua y TBA para los estándares de la curva.	25
Tabla 4.	Condiciones cromatográficas utilizadas durante el análisis de hexanal y compuestos volátiles mediante cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masa	31
Tabla 5.	Distribución de las muestras al azar para cada panelistas.....	33
Tabla 6.	Efecto de la ácido ascórbico en el porcentaje de humedad en filetes de tilapia congelados.....	34
Tabla 7.	Efecto del tiempo de almacenamiento en el porcentaje de humedad en filetes de tilapia congelados	35
Tabla 8.	Medias de ácido ascórbico en filetes de tilapia según los factores de tratamiento y tiempo de almacenamiento.....	37
Tabla 9.	Medias de valor de TBA en filetes de tilapia según los factores de tratamiento y tiempo de almacenamiento.....	40
Tabla 10.	Tiempos de retención de ácidos grasos en filete de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) caracterizados mediante GC/MS.....	41
Tabla 11.	Porcentaje de ácidos grasos caracterizados en tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) al sexto mes de almacenamiento en tratamientos con ácido ascórbico (vitamina C) y control mediante GC/MS	42

Tabla 12. Contenido de hexanal en filetes de tilapia según los factores de tratamiento de ácido ascórbico y tiempo de almacenamiento.....	44
Tabla 13. Compuestos volátiles identificados en tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) mediante SPME-GC/MS.....	51
Tabla 14. Resultados de la prueba sensorial de ordenamiento simple	56
Tabla 15. Porcentaje de ácidos grasos caracterizados en tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) en tratamientos con ácido ascórbico (vitamina C) y control mediante GC/MS.....	66

1 INTRODUCCIÓN

Actualmente se promueve el consumo de ácidos grasos poliinsaturados conocidos como omega-3, ya que se les atribuye beneficios a la salud. Se ha asociado el consumo de estos ácidos grasos con efectos contra diabetes, enfermedades del corazón y cáncer (Lupton y Cross, 1994; Sizer y Witney, 2000). Las compañías de alimentos recurren al valor añadido para proveer al consumidor productos con ácidos grasos omega-3. El pescado es una buena fuente natural de ácidos poliinsaturados omega-3, entre los que se encuentran el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA). La tilapia (*Oreochromis niloticus*) es un pescado bajo en grasa pero con alto contenido de los ácidos grasos: EPA y DHA (Arveláiz y Kodaira, 1996; Vargas, 2001).

El alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados hace que el pescado sea muy susceptible a rancidez, aún cuando se almacene a temperaturas de congelación. El pescado congelado sufre de rancidez oxidativa o autooxidación de lípidos, causante del deterioro de la calidad y contribuyente al sabor rancio del pescado. El ácido L-ascórbico (vitamina C) es utilizado como antioxidante en alimentos. Sin embargo, el ácido ascórbico puede actuar como prooxidante porque puede reducir el ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}) (Hultin, 1992). El ion ferroso cataliza las reacciones de autooxidación de lípidos por su habilidad de formar radicales libres.

No se ha determinado si el efecto del ácido ascórbico como antioxidante o prooxidante en la oxidación de lípidos es dependiente de la concentración en la que se le añada a la tilapia. Una investigación de rancidez oxidativa realizada en tilapia congelada sugirió que el ácido ascórbico en altas concentraciones actuó como prooxidante, ya que hubo mayor producción de aldehídos (producto secundario de autooxidación) en filetes que contenían 5% de ácido ascórbico (Vargas, 2001). Por otra parte, algunos estudios sugieren que el ácido ascórbico puede ser antioxidante en

altas concentraciones y prooxidante en bajas concentraciones (Fennema, 1996; Hultin, 1992; Decker y Hultin, 1992). La determinación de la concentración adecuada para lograr un efecto antioxidante es beneficiosa ya que podría extender el largo de vida del producto y reducir pérdidas por el uso inadecuado del antioxidante.

Entre los análisis químicos para evaluar la rancidez en el pescado están: la prueba de ácido tiobarbitúrico (TBA), la composición de lípidos por cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas (GC/MS) y cuantificación de hexanal y caracterización de compuestos volátiles por microextracción de fase sólida SPME-GC/MS. La prueba de TBA mide la cantidad de malonaldehído, un compuesto secundario de oxidación. Mediante la cuantificación de hexanal se mide la producción de este aldehído el cual es un producto de oxidación. Este análisis es utilizado comúnmente para la determinación del deterioro del sabor en carnes. También se puede evaluar la aceptabilidad del consumidor y el nivel de rancidez en el pescado mediante un panel sensorial.

El propósito de esta investigación fue el estudiar el efecto de diferentes niveles de ácido L-ascórbico (vitamina C) en el desarrollo de rancidez oxidativa en filetes de tilapia (*Oreochromis niloticus*) almacenados a -18°C por un período de seis meses. Se realizaron pruebas químicas para evaluar el desarrollo de rancidez entre los cuatro tratamientos utilizados. Se evaluó la calidad y grado de rancidez en la tilapia luego de completado los seis meses de almacenamiento.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

La tilapia (*Oreochromis niloticus*) es una de las especies más difundidas en el mundo como un pez tropical de charcas y ha sido una fuente importante de alimento a través de la historia. Desde la década del setenta se comenzó un proyecto comercial para su cultivo en Puerto Rico. El cultivo de la Tilapia es favorecido porque su biología es conocida, tiene excelente tasas de crecimiento, tolera parámetros ambientales que podrían afectar el desarrollo de otros peces, muestra poca susceptibilidad a enfermedades y goza de amplia aceptabilidad como alimento (Pullin y Lowe, 1982). Además Puerto Rico posee un clima cálido que provee aguas con la temperatura adecuada para el cultivo de la Tilapia. La acuicultura o cultivo de organismos acuáticos es beneficiosa porque promueve la economía local y un aumento en el consumo de esta especie y otras.

La composición del pescado se caracteriza por ácidos grasos de alto grado de insaturación, particularmente ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (ω 3 20:5) (EPA) y ácido 4,7,10,13,16,19-docohexaenoico (ω 3 22:6) (DHA), conocidos como omega-3. El 90% de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que componen los lípidos en el pescado está constituido por EPA y DHA (Ackman y Ratnayake, 1992). El nivel de ácidos grasos en el pescado depende de la especie, de la distribución de grasa en el pescado y la temporada del año (Flick et. al., 1992; Harris y Tall, 1999). Se ha asociado el consumo de ácidos grasos omega-3 a una disminución en la concentración de lípidos en la sangre; además éstos son precursores de acciones bioquímicas y fisiológicas (Gordon y Ratliff, 1992; Sizer y Whitney, 2000).

El pescado puede categorizarse por su contenido de grasa, donde en países del hemisferio norte se clasifican en cuatro grupos: *lean* (<2% de grasa), *low* (2-4% de grasa), *medium* (4-8% de grasa) y *high* (8-20% de grasa). Otra manera de clasificarlos es en dos grupos: por un alto contenido de grasa (>5%) o bajo contenido de grasa (<2%) (Harris y Tall, 1994). La tilapia se clasifica como pescado con bajo contenido de grasa cuya composición puede oscilar entre un 0.5% a 2% (Santana, 1989; Vargas, 2001). Esta grasa (<1% del peso del pez) se compone mayormente de fosfolípidos y el resto es acumulado como triacilgliceroles. Esta acumulación depende de la época y se produce en ciertas partes del cuerpo; por esta razón es más útil el estudio de un homogeneizado del pescado (Ackman, 1994).

2.2 RANCIDEZ

Rancidez es el término derivado del latín *rancidus* que significa “mal oliente” y es utilizado para describir los olores y sabores objetables de las grasas (Hamilton, 1999). Estos sabores y olores son el resultado del proceso de lipólisis u oxidación de lípidos (Pike, 2003). La rancidez es considerada mediante una apreciación organoléptica subjetiva de la producción de “off-flavors”, que constituyen el deterioro primario de calidad durante la oxidación de lípidos (Hultin, 1992).

La rancidez se clasifica mediante la causa de su origen. De esta manera se reconocen tres tipos de rancidez: rancidez hidrolítica, rancidez cetónica y rancidez oxidativa. La rancidez hidrolítica es causada por la hidrólisis de triglicéridos mediada por enzimas y debida a la presencia de humedad (Hamilton, 1999; Botta, 1995). La rancidez cetónica es causada por microorganismos y la presencia limitada de oxígeno y agua en el alimento. El ataque de oxígeno

a las grasas del alimento desarrolla la producción de agentes oxidantes que a su vez causan la rancidez oxidativa.

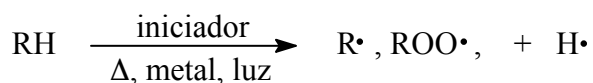
La rancidez oxidativa o autooxidación es causante del deterioro en la textura, color, olor y sabor del pescado congelado. Congelación es un excelente proceso para extender el largo de vida útil del pescado ya que baja la temperatura (-15°C a -18°C) y, como consecuencia, no hay agua disponible para el crecimiento microbiano y se reduce la actividad enzimática (Fennema, 1996; Flick, et. al., 1992). La temperatura de congelación reduce pero no detiene la autooxidación, debido a que ésta es una reacción con baja energía de activación. Por lo tanto, se desarrolla rancidez oxidativa a través del tiempo de almacenamiento del pescado.

2.3 RANCIDEZ OXIDATIVA

La oxidación de lípidos ocurre por un mecanismo de radicales libres y reacciones con oxígeno molecular llamado autooxidación (Fennema, 1996; Hamilton, 1999). Este mecanismo ocurre en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Eskin y Przybylski, 2000; Fennema, 1996; Vercellotti et. al., 1992).

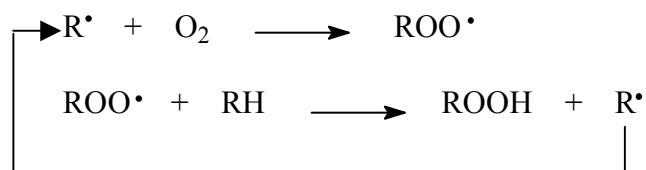
INICIACIÓN: La reacción de iniciación es la extracción de un hidrógeno del carbono adyacente al enlace doble del ácido graso insaturado (RH) formando un radical libre o radical lípido. Esto se logra por iniciadores como calor, luz, radiación o la presencia de iones metálicos.

Iniciación:



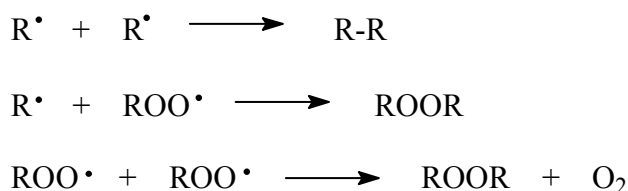
PROPAGACIÓN: En esta segunda etapa el radical libre formado puede reaccionar con oxígeno y formar un radical peróxido ($\text{ROO}\cdot$). Este radical puede sustraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso insaturado para formar un hidroperóxido (ROOH) y un radical lípido.

Propagación:



TERMINACIÓN: Durante esta etapa dos radicales libres interaccionan formando un producto no radical.

Terminación:



Los productos primarios de la autooxidación son los hidroperóxidos. Éstos se caracterizan por no poseer olor ni sabor y ser compuestos inestables que se descomponen en radicales alcoxi formando productos secundarios (Hamilton, 1999; Ho y Chen, 1994). Los productos secundarios como los aldehídos, cetonas, alcoholes y ésteres son los causantes de la rancidez oxidativa (Hamilton, 1999). Según Karahadian y Lindsay (1989) citado de Lindsay (1994), los productos volátiles de la descomposición de hidroperóxidos son parte de la producción de olores característicos “fishy” u olores rancios en pescado como el “cod”. Según

dicha investigación los productos derivados de la descomposición de n-3 ácidos grasos poliinsaturados como 2,4,7-decatrienales, son los más importantes contribuyentes del olor rancio.

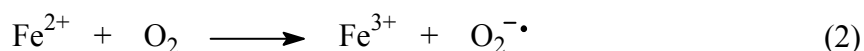
Existen varios factores que promueven o retardan la autooxidación y el grado de rancidez oxidativa. Éstos pueden ser factores intrínsecos, propios del tejido, o factores extrínsecos, provenientes del ambiente y condiciones que rodean al alimento. Entre los factores extrínsecos está la temperatura de almacenamiento. La rapidez de las reacciones de oxidación aumenta con aumento en temperatura. Por el contrario, al bajar la temperatura al alimento se reducen las reacciones de oxidación de lípidos mediante la inmovilización de agentes catalíticos y retardación de los cambios de post-matanza (Hultin, 1994).

La naturaleza del ácido graso y su grado de insaturación afectan la oxidación de lípidos en el pescado. El sustrato primario para la reacción de autooxidación es el ácido graso insaturado. A mayor la insaturación, mayor la probabilidad de llevar a cabo autooxidación (Harris y Tall, 1999).

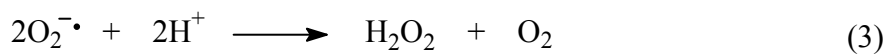
La presencia de metales como hierro y cobre, ya sean de la composición del pescado, provenientes del agua o equipos de proceso, pueden acelerar las reacciones de oxidación. Los metales de transición son los activadores primarios de uno de los sustratos de la oxidación de lípidos en pescado, el oxígeno molecular. Cuantitativamente, el principal metal de transición en el pescado es el hierro que puede encontrarse asociado a pigmentos, proteínas y metabolitos de bajo peso molecular (Hultin, 1994). El ion ferroso (Fe^{2+}) puede estimular la oxidación de lípidos reaccionando con hidroperóxidos ya formados, cuando el hierro se oxida y rompe el hidroperóxido generando un radical alcoxi ($\text{LO}\cdot$) (ecuación 1) (Kanner et. al., 1986).



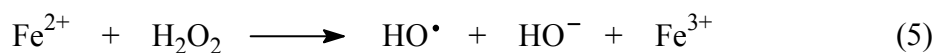
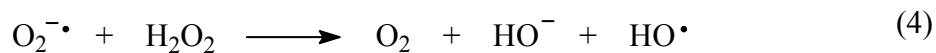
El ion de hierro (II) también puede formar especies reactivas de oxígeno, que participan en las reacciones de oxidación como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos ($\text{OH}^\cdot$). Los electrones no apareados de los metales de transición, en el caso de hierro es el ion ferroso, reaccionan rápidamente con oxígeno molecular produciendo un anión superóxido (ecuación 2).



A pesar de que el anión superóxido es poco reactivo para reaccionar con lípidos, este anión puede ser protonado y luego reaccionar con un radical hidroperóxido para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (reacción 3):



Los radicales hidroxilo se forman a partir del anión superóxido en la reacción Haber-Weiss (4) o de peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton (5). Ambas reacciones requieren la presencia del ion ferroso (Fe^{2+}) (Acworth y Bailey, 1995).



Al producir radicales hidroxilo se estimula la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (LH) (ecuaciones 6).



2.4 ANTIOXIDANTES

Para controlar la rancidez oxidativa se pueden usar diferentes aditivos y/o procesos como mantener el pescado a baja temperatura o congelarlo, control de oxígeno mediante empaques de atmósfera modificada, glaseado, empaques al vacío o el uso de antioxidantes. Ejemplos de antioxidantes utilizados en alimentos son: BHT (“butylated hydroxytoluene”), BHA (“butylated hydroxyanisole”), vitamina E (tocoferoles), citrato y vitamina C (ácido ascórbico). Un antioxidante se puede definir como “cualquier sustancia que, cuando esté presente a baja concentración comparada con el sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación del sustrato” (Halliwell et. al., 1995 citado de Eskin y Przybylski, 2000).

Los antioxidantes son considerados aditivos y están regulados bajo el Acta Federal de Drogas, Alimentos y Cosméticos. Este código los define como sustancias para preservar el alimento del deterioro, rancidez o decoloración debido a la oxidación (21 CFR 170.3). No deben exceder el 0.2% por peso basado en el contenido de grasa del alimento. Los antioxidantes se pueden dividir en dos grupos: aquellos que inhiben la formación de radicales libres como donantes de hidrógeno y los que interfirieren en la cadena de radicales libres al formar compuestos más estables. Los antioxidantes pueden actuar en diferentes etapas de las reacciones de oxidación y se diferencian en el modo de acción. Se pueden clasificar de acuerdo al modo de acción en antioxidantes primarios o antioxidantes secundarios. Los antioxidantes primarios son aquellos que reaccionan con los radicales y forman productos más estables. Los antioxidantes secundarios o preventivos reducen la velocidad de la reacción de iniciación mediante varios mecanismos que incluyen inactivación de iones metálicos, descomponedores de hidroperóxidos, secuestradores de oxígeno y sinergistas (Eskin y Przybylski, 2000).

2.5 VITAMINA C (ÁCIDO L-ASCÓRBICO)

Entre los antioxidantes naturales se encuentra el ácido ascórbico o vitamina C. Este antioxidante es un agente reductor debido a los grupos hidroxilo adyacentes que pueden perder hidrógeno formar un radical semideshidroascorbato y oxidarse a ácido deshidroascórbico (figura 1).

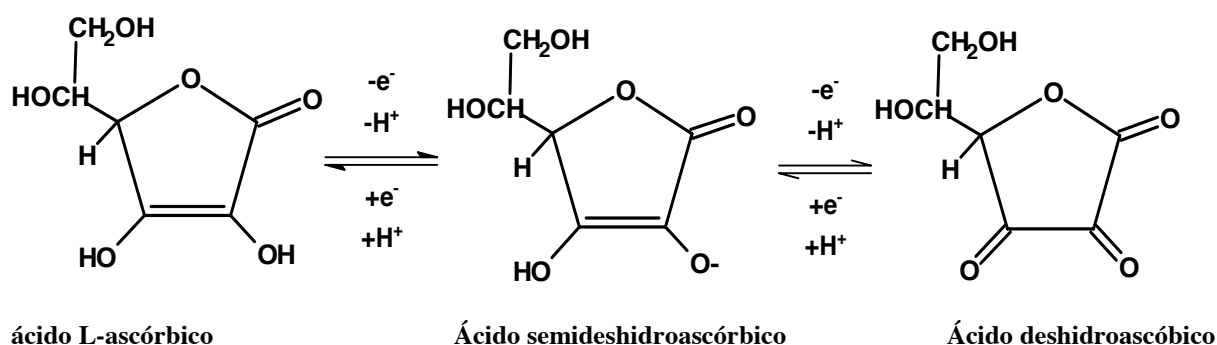


Figura 1. Oxidación de ácido L-ascórbico a ácido deshidroascórbico

El ácido ascórbico tiene también la habilidad de secuestrar oxígeno. Se necesitan aproximadamente 3.5 mg de ácido ascórbico para secuestrar el oxígeno en un cm³ de “headspace” de un envase (Cort, 1982). Actualmente el ácido ascórbico posee un estatus de GRAS (“Generally Recognized As Safe”) como preservativo químico y no tiene restricciones en cuanto a su uso en diferentes niveles de concentración (21 CFR 182.3013). El ácido ascórbico se ha utilizado contra la oxidación en vinos, cerveza, frutas, vegetales, bebidas, carnes curadas y productos de pescado.

El contenido de ácido ascórbico en el tejido del pescado es generalmente bajo. Nettleton y Exler (1992) determinaron el contenido de ácido ascórbico en “catfish”, “coho salmon”, “rainbow trout”, “red swamp crayfish” y “white river crayfish”. Según esta investigación el contenido de ácido ascórbico en estas especies fue generalmente menor de 1mg/100g. La

concentración de ácido ascórbico puede ser afectada por el tiempo de almacenamiento. El almacenamiento de la macarela a 4°C por siete días resultó en una disminución de la concentración de ascorbato de 7.8 a 0.2 μ moles por 100 gramos de músculo (Decker y Hultin, 1992). Brannan y Erickson (1996) encontraron que la concentración inicial en el homogeneizado de “channel catfish” (1.47 mg/100g) se redujo rápidamente durante los primeros cuatro meses, hasta que alcanzó 0.63 mg/100g a los seis meses de almacenamiento a -6°C. También encontraron que la pérdida de ácido ascórbico de los filetes fue menor que la del homogeneizado y sugieren que los niveles existentes de ácido ascórbico en los tejidos del pescado son insuficientes para tener algún efecto detectable contra la oxidación de lípidos.

En muchas investigaciones se aumentan los niveles de ácido ascórbico en el pescado ya sea a través de suplementación en la dieta o la incorporación directa al tejido para obtener un control en la rancidez oxidativa. El ácido ascórbico ha sido efectivo ya sea para proteger el color del pescado (Dyer et. al., 1956, citado de Schultz, 1962), para mantener la palatabilidad del pescado durante once meses (Anderson y Danielson, 1961, citado de Schultz, 1962) o retardar el desarrollo de rancidez (Deng et. al., 1978).

El ácido ascórbico puede actuar como prooxidante o promover la autooxidación a causa de su grupo orto dihidroxi (Harris y Tall, 1999). Se sugiere que puede promover la oxidación de lípidos, dependiendo de su concentración, ya que puede reducir metales catalíticos como Fe^{3+} y Cu^{2+} , regenerando Fe^{2+} y Cu^{+} que intervienen en la oxidación (Decker y Hultin, 1992). Las condiciones antioxidantes o prooxidantes del ácido ascórbico dependen de la concentración a la que esté presente. En un estudio realizado por Deng et. al. (1978), 1000 ppm de ácido ascórbico demostró un efecto antioxidante en “Mullet” durante nueve días de almacenamiento pero actuó como prooxidante con concentraciones iniciales de 50 ppm, 100 ppm y 500 ppm de ácido

ascórbico. Alguna literatura reporta que altas concentraciones de ácido ascórbico en alimentos sugieren un efecto antioxidante, por el contrario bajas concentraciones sugieren un efecto prooxidante (Hultin, 1992; Fennema, 1996; Decker y Hultin, 1992). Se ha observado que bajas concentraciones de ácido ascórbico específicamente en pescado promueven la reducción de los iones metálicos, como Fe^{+3} y Cu^{+2} , y esto aumenta la oxidación de lípidos (Kanner et. al., 1986). Decker y Hultin (1990a) encontraron que un aumento en la concentración de hierro en macarela, manteniendo la concentración de ascorbato constante, produjo un aumento en las medidas de TBARS (“Thiobarbituric Reactives Substances”). Igualmente, la adicción de 15 μmoles de FeCl_3 y 100 μmoles de ascorbato a filetes de macarela aumentó la oxidación y la remoción de ácido ascórbico con ascorbato oxidasa redujo la oxidación de lípidos en las muestras (Decker y Hultin, 1990b).

Por otra parte, otros estudios sugieren que el efecto prooxidante en pescado se obtiene a altas concentraciones de ácido ascórbico. En un estudio del pescado *Mugil cephalus* el ácido ascórbico actuó como antioxidante a concentraciones menores de 500 ppm mientras que concentraciones mayores tuvo un efecto prooxidante en el pescado (Deng et. al., 1977). Este mismo efecto se observa en un estudio realizado con tilapia (*Oreochromis niloticus*) en el cual los filetes fueron sumergidos en una solución al 5% de ácido ascórbico donde luego de seis meses de almacenamiento a -18°C hubo una reducción de ácidos grasos insaturados, mayor producción de aldehídos y rechazo del análisis sensorial (Vargas, 2001).

2.6 ANÁLISIS QUÍMICOS

2.6.1 Determinación de vitamina C (ácido L-ascórbico)

Para la determinación de la concentración de ácido ascórbico que se incorpora como antioxidante se utiliza con frecuencia el método de la AOAC (967.21) de titulación con 2,6-dicloroindofenol. Este método depende de la percepción visual de la persona que realiza el análisis lo cual puede ser una causa de error en la medida (Vargas, 2001). La cromatografía líquida de alta eficacia, HPLC por sus siglas en inglés, ha sido ampliamente utilizada para el análisis de ácido ascórbico debido a su alta sensibilidad y selectividad (Pachala y Reynolds, 1985.)

2.6.1.1 Cromatografía líquida de alta eficacia (“HPLC”)

Los componentes básicos del sistema de “HPLC” son: la bomba, el inyector, la columna de separación, el detector y el integrador (figura 2). La bomba sirve para mover la fase móvil en forma controlada y precisa a través del sistema. La muestra es introducida a la fase móvil a través del inyector donde el volumen a ser inyectado depende del tamaño del *bucle loop*. La columna es la herramienta de separación que se conecta entre el inyector y el detector. El material de empaque de la columna analítica depende del tipo de analito y las condiciones de separación. Hay rellenos basados en sílica y otros basados en polímeros orgánicos. Para la separación de ácidos orgánicos en alimentos se han utilizado resinas sintéticas orgánicas formadas de estireno y divinilbenceno emulsionados. El detector convierte los cambios en concentración del eluyente de la columna en señales eléctricas. Los más utilizados son detectores que se basan en espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) y fluorescencia, determinación del índice de refracción y análisis electroquímico (Rounds y Gregory, 2003). El detector de

absorción de rayos ultravioleta-visible mide la absorción de la radiación por compuestos que contengan cromóforos donde la magnitud de la señal es directamente proporcional a la concentración del analito. La señal electrónica provista por el detector pasa al integrador donde permite la cuantificación de los picos en un cromatograma.

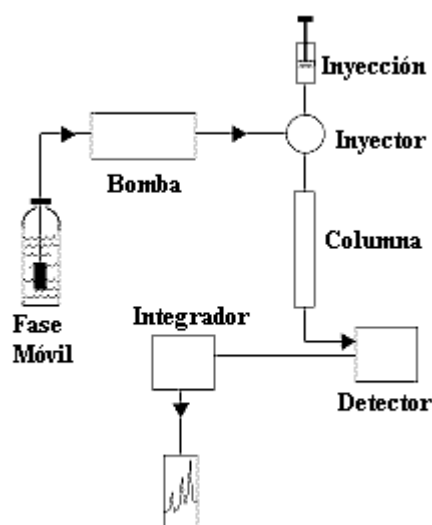


Figura 2. Componentes básicos del sistema de cromatografía de alta eficacia (HPLC)

Hay diferentes modos de separación en la cromatografía líquida de alta eficacia. Entre los modos se encuentran: separación de fase normal, fase reversa, exclusión por tamaño, afinidad e intercambio iónico. La separación por intercambio iónico ha sido usada para la determinación de iones orgánicos e inorgánicos en leche; ácidos orgánicos en extracto de café y vinos; cloruro en fórmula para infantes y fosfatos y sulfitos en alimentos (Rounds y Gregory, 2003). En la cromatografía de intercambio iónico las interacciones entre el soluto y la fase estacionaria son de naturaleza electrostática. La fase estacionaria contiene grupos funcionales con carga positiva o negativa y un ion intercambiador que mantiene la neutralidad. Los iones de la muestra pueden intercambiarse con el ion intercambiador hasta llegar a un equilibrio iónico. En el intercambio

catiónico grupos funcionales con carga negativa se enlazan covalentemente a la fase estacionaria. Por el contrario, en el intercambio aniónico los grupos funcionales poseen carga positiva.

2.6.2 Determinación de la composición de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos en alimentos usualmente se determina mediante la extracción de los lípidos y su análisis mediante cromatografía de gas. Para volatilizar los triacilglicerolos y fosfolípidos se saponifican y los ácidos grasos que quedan libres son esterificados en forma de metil ésteres. Estos ácidos grasos son analizados mediante cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas (“GC-MS”).

2.6.2.1 Cromatografía de gas - espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía de gas es ideal para el análisis de sustancias volátiles y estables en calor. Los componentes básicos son: el gas de arrastre, el puerto de inyección, el horno, la columna y el espectrómetro de masas.

La elusión se realiza por el flujo del gas de arrastre, el cual es inerte y actúa como la fase móvil. En el puerto de inyección la muestra se volatiliza y pasa a la cabeza de la columna capilar cromatográfica para la separación de los componentes de la muestra. 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. La columna puede ser empacada o capilar. En el caso de la columna capilar la fase estacionaria puede estar compuesta de polisiloxano, que es una de las fases más eficientes. Para lograr separaciones de compuestos no polares, como ácidos grasos se utiliza comúnmente una fase de 5% fenil y 95% de dimetilpolisiloxano (Reineccius, 2003).

Un espectrómetro de masas es acoplado al cromatógrafo de gas para identificar los picos con la ayuda de una biblioteca de espectros de masas. El espectrómetro de masas tiene tres funciones básicas: ionizar las moléculas, separarlas de acuerdo a la razón masa/carga y rastrear los fragmentos con el detector. Los compuestos separados por el cromatógrafo de gas pasan por las líneas de transferencia capilar al espectrómetro de masas que luego se ionizan mediante impacto de electrones. En este proceso las moléculas son ionizadas cuando son expuestas a un bombardeo de electrones. Los fragmentos positivos producidos pasan al analizador de masas para ser separados en base a su razón masa/carga.

2.6.3 Prueba de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)

La rancidez oxidativa es comúnmente medida por la prueba de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Este análisis se basa en medir la intensidad del color rosado por espectrofotómetro, que es producido por la reacción de malonaldehído en la muestra con ácido 2-tiobarbitúrico. El valor de TBA mide productos secundarios de oxidación aunque puede haber otras sustancias que reaccionen como sales de hierro, por esta razón se reporta como TBA “reactive substances” (TBARS) (Botta, 1995).

2.6.4 Determinación de hexanal y compuestos volátiles

Los productos secundarios de la oxidación de lípidos son responsables de las características organolépticas que describen la rancidez del pescado. Durante el almacenamiento del pescado, la acumulación de compuestos volátiles que incluyen aldehídos, cetonas, alcoholes y otros productos causan cambios en sabor, color, olor y textura del alimento. Un estudio de Miler et. al. (1983), citado de Zang y Lee, 1997, reportó que hexanal y trimetilamina contribuyen a los “off-odors” durante la descomposición del pescado. Hexanal es un producto de

la oxidación de ácido linoleico, aunque también se produce a partir de la descomposición del ácido araquidónico (EPA) (Shultz, 1962). En carnes, los niveles de hexanal aumentan con mayor rapidez comparado con otros aldehídos y por esta razón se utiliza como índice de desarrollo de rancidez (Gray et. al., 1994; Shahidi y Pegg, 1994). Compuestos como hexanal, *trans*-2-hexanal y *cis*-3-hexanal, se encuentran principalmente en peces de agua dulce y no se encuentran generalmente en peces de agua salada (Lindsay, 1994). Heptanal, octanal, 1-octanol, y nonanona son productos volátiles que pudieran ser derivados de la descomposición de hidroperóxidos de oleato e identificados en macarela (Zang y Lee, 1997). También se identificaron: penteno, pentanal, hexanal, 2-pentil furano y octanol posiblemente producidos de la descomposición de hidroperóxidos de linoleato. La tabla 1 muestra aldehídos formados a partir de la oxidación de algunos ácidos grasos poliinsaturados.

Tabla 1. Aldehídos formados de la descomposición de hidroperóxidos en la autooxidación de ácidos grasos poliinsaturados

Ácido Graso	Grupo metileno	Aldehídos formados
Oleico	11	Octanal
		2-decenal
	8	2-undecanal
Linoleico		Nonanal
	11	Hexanal
		2-octenal
Linolenico		2,4-decadial
	14	Propanal
		2-pentanal
		2,4-heptadienal
	11	3-hexenal
		2,5-octadienal
Araquidónico		2,4,7-decatrienal
	13	Hexanal
		2-octenal
		2,4-decadial
	10	3-nonenal
		2,5-undecadienal
		2,4,7-tridecatrienal
	7	3,6-dodecadial
		2,5,8-tetradecatrienal
		2,4,7,10-hexadecatetraenal

Modificada de Schultz, 1962.

2.6.4.1 Microextracción en fase sólida (SPME)

La microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) es una técnica de preparación de muestras que no requiere el uso de disolventes. La técnica consiste en el uso de una fibra de sílice fundida cubierta de un polímero que es introducida en un envase con la muestra. Los analitos son absorbidos por la fibra hasta que alcance el equilibrio (Pawliszyn, 1999). Luego de la absorción de los analitos se procede a la desorción en un instrumento analítico como el cromatógrafo de gas. Los analitos absorbidos dependen de la cubierta de la fibra que se utilice. El sistema de manual de SPME, posee fibras con diferentes revestimientos:

polares y no polares, las cuales extraerán analitos volátiles polares y no polares respectivamente (Pawliszyn, 1999). Entre las cubiertas de las fibras se encuentran: polidimetilsiloxano (PDMS) (polar), polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB) (semi-polar), Poliacrilato y “Carbowax” (no polar). La extracción de los analitos puede realizarse por inmersión o extracción directa, *head space* o la extracción con protección por membrana. En la extracción de *head space* los analitos se extraen de la fase gaseosa de la muestra (figura 3). Este tipo de extracción es recomendada para analitos volátiles y semivolátiles (aumentando la temperatura de extracción) porque el tiempo de equilibrio es menor comparado con la extracción directa (Pawliszyn, 1999). La técnica se ha utilizado para varias aplicaciones desde ambientales, clínicas, farmacéuticas y en alimentos.

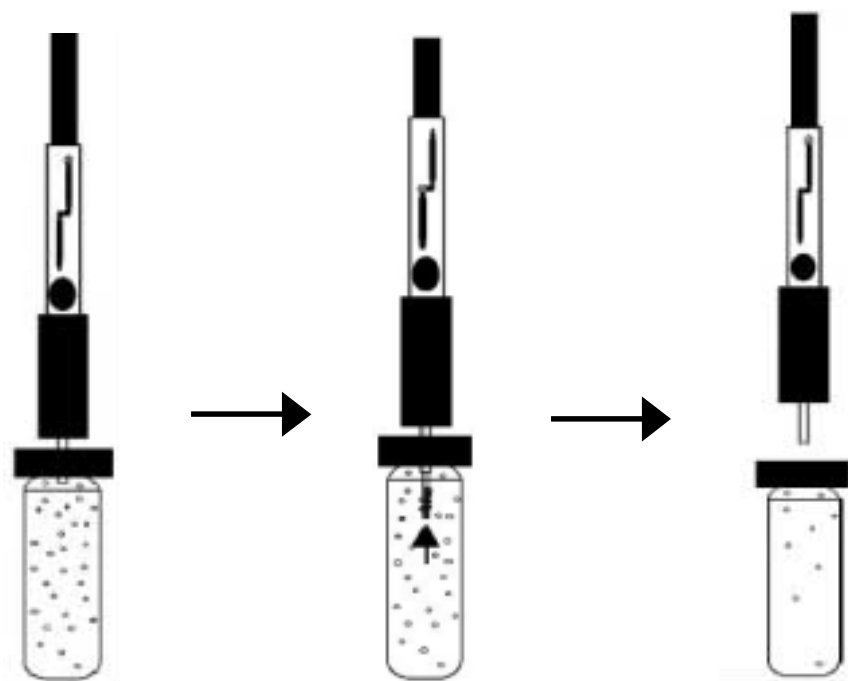


Figura 3. Proceso de extracción de “headspace” de analitos mediante la fibra de microextracción de fase sólida (SPME). (Tomado de Supelco, Bellefonte, PA.)

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de filete de tilapia fueron recolectadas en la Sub-Estación Piscícola de la Estación Experimental en Lajas del Centro de Investigación y Desarrollo de la Acuicultura Comercial en Puerto Rico (CIDACPR). Las tilapias fueron cultivadas en charcas y capturadas para ser asfixiadas, descamadas y fileteadas a mano (figura 4). Una vez preparados los filetes, se transportaron en neveras con hielo hasta el laboratorio.



Figura 4. Fotos de Tilapia (*Oreochromis niloticus*), recolección y preparación de las muestras.

3.2 TRATAMIENTO A FILETES Y ALMACENAMIENTO

Se utilizaron un total de 332 filetes frescos distribuidos en forma aleatoria en cuatro lotes. El peso promedio de los filetes fue de 65g y cada lote contenía 83 filetes. Tres de los lotes fueron tratados con ácido ascórbico (lotes A, B y C) y el lote restante se utilizó como control (lote D). Se utilizó el procedimiento utilizado por Vargas (2001) para tratar los filetes con ácido ascórbico. El lote A se sumergió en una solución de 50,000 ppm de ácido ascórbico (vitamina C de grado alimenticio – “Food Grade”). Los lotes B y C se sumergieron en soluciones de 500 ppm y 5 ppm de ácido ascórbico, respectivamente. El lote D o control no se sumergió en agua ni recibió tratamiento con ácido ascórbico.

Los filetes de cada lote se agruparon aleatoriamente en 21 bolsas para congelador (“Ziploc Slide-Loc Heavy Duty Freezer Bag”) conteniendo 3 filetes cada una. Las 21 bolsas se agruparon al azar en 7 sub-lotes de 3 bolsas (3 repeticiones). Cada sub-lote representó un tiempo de almacenamiento: 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 meses. En los seis meses de almacenamiento se realizaron 7 muestreos en total. Los filetes restantes de cada lote se agruparon en dos bolsas conteniendo 10 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 a -18°C.

3.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Durante un período de seis meses se removieron del refrigerador mensualmente 3 bolsas de cada tratamiento y del control. Los filetes de cada bolsa fueron descongelados para utilizarse en los análisis químicos.

Se homogenizaron los filetes por bolsa, se pesaron las cantidades para los análisis: porcentaje de humedad, porcentaje de ácido ascórbico, contenido de malonaldehído (TBA), composición de ácidos grasos, análisis de componentes volátiles y cuantificación de hexanal. Se colocaron las muestras para cada análisis en bolsas “Whirlpack” y se almacenaron en un ultracongelador a -80°C hasta el día anterior del análisis. Las muestras se descongelaron en la nevera el día anterior del análisis.

3.4 ANÁLISIS QUÍMICOS

3.4.1 Determinación del porcentaje de humedad (AOAC, 1990 sección 950.02)

La prueba se realizó en cada período de almacenamiento según el método oficial de la AOAC (1990). Se colocaron crisoles en el horno a 100°C por 24 horas hasta que alcanzaron peso constante. Luego se pesaron aproximadamente 5.0000 ± 0.0025 g gramos 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 porcentaje de humedad se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$[(\text{peso muestra húmeda} - \text{peso muestra seca}) / \text{peso muestra húmeda}] * 100$$

3.4.2 Determinación del contenido de ácido L-ascórbico (vitamina C)

Se determinó el contenido de ácido ascórbico en las muestras mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

3.4.2.1 Extracción de ácido L-ascórbico

Aproximadamente 8.000 ± 0.0025 g de tilapia 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”). El cartucho se lavó con dos mililitros 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 se filtró por un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ antes de ser inyectada al equipo (figura 5).



Figura 5. Cromatógrafo líquido modelo HP 1100 con un detector de espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) utilizado para la cuantificación de ácido ascórbico

3.4.2.2 Cuantificación de ácido L-ascórbico mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (“HPLC”)

Para detectar y cuantificar el ácido ascórbico se utilizó un cromatógrafo líquido modelo HP 1100 con un detector de espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) (figura 5). Se inyectaron 20 μL de muestra. Se utilizó una columna de poliestireno sulfonado/ divinilbenceno (Supelcogel C-610 H) a una temperatura de 30°C. La elución 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. La tabla 2 resume las condiciones utilizadas para el análisis de ácido ascórbico. La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva estándar externa.

3.4.2.3 Preparación de la curva estándar

Se prepararon soluciones estándar de ácido ascórbico con las siguientes concentraciones: 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm y 50 ppm. Se inyectaron 20 μL de cada estándar y se obtuvo el área correspondiente a cada concentración.

Tabla 2. Condiciones utilizadas durante el análisis de ácido L-ascórbico mediante cromatografía líquida de alta eficacia (“HPLC”)

Muestra	8 g de filete de tilapia
Cartucho de extracción	SCX
Volumen inyectado	20 μL
Equipo	HP 1100
Detector	Absorbancia (UV)
Columna	Supelogel C-610 H
Fase móvil	0.1% H_3PO_4 (pH 2.2)
Flujo	0.5 mL/min
Temperatura de la columna	30°C
Presión	38 bar
Longitud de onda	245 nm

3.4.3 Prueba de ácido 2-tiobarbitúrico (“TBA Test”)

Se utilizó el método de Piccini et al. (1985) y citado por Vargas (2001).

3.4.3.1 Curva estándar

Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de malonaldehído como se muestra en la tabla 3. Se añadieron a once tubos de ensayo los siguientes reactivos en las siguientes cantidades (tabla 3):

Tabla 3. Volumen necesario de malonaldehído, agua y TBA para los estándares de la curva.

Estándar	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	μg de malonaldehído (10 $\mu\text{g/mL}$)	mL agua	mL solución de TBA 0.02 M
1	0.000	0	5.000	5
2	0.025	25	4.975	5
3	0.050	50	4.950	5
4	0.075	75	4.925	5
5	0.100	100	4.900	5
6	0.125	125	4.875	5
7	0.150	150	4.850	5
8	0.175	175	4.825	5
9	0.200	200	4.800	5
10	0.225	225	4.775	5
11	0.250	250	4.750	5

Se completó el volumen final de 10 mL en cada tubo de ensayo y se calentaron por 40 minutos en un bloque de calentamiento (Fisher Scientific Dry Bath) a 100°C. Los tubos se

colocaron con 1 minuto de diferencia entre sí, para que el tiempo de calentamiento y enfriamiento fuera el mismo en todos los tubos. Una vez completado el tiempo de calentamiento, los tubos se enfriaron durante 10 minutos. Las soluciones de cada tubo se colocaron en celdas plásticas de 1 mL y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 535 nm para obtener la curva estándar.

3.4.3.2 Preparación de la muestra

Se pesaron aproximadamente 30 g del homogeneizado de los filetes de tilapia y se procesaron por 30 segundos en una licuadora (Waring Commercial Blender) con 70 mL de una solución de ácido tricloroacético 10%. La muestra se transfirió a un matraz de destilación y la licuadora se enjuagó con 30 mL adicionales de ácido tricloroacético 10% para añadirse al matraz de destilación.

La muestra se destiló por 15 minutos y el destilado obtenido se añadió a cinco tubos de ensayo en 0, 2, 3, 4 y 5 mL en cada tubo. Cada tubo de ensayo se llevó a un volumen de 5 mL con agua destilada y se añadió 5 mL de ácido 2-tiobarbitúrico. Los tubos de ensayo se calentaron en un bloque de calentamiento por 40 minutos a 100°C. Los tubos de ensayo se colocaron con una diferencia de 30 segundos entre cada uno. Una vez se completó el tiempo de calentamiento los tubos fueron retirados y enfriados por 10 minutos. Una muestra de 1 mL de cada tubo fue colocada en celdas de plástico para leer su absorbancia en un espectrofotómetro Cary 50, a un largo de onda de 535 nm. El valor de TBA se calculó con la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{g de malonaldehído}}{\text{mL de muestra}} = (\text{CM} - \text{CB}) * \text{factor de dilución}$$

CM = concentración de la muestra

CB = concentración del blanco

3.4.4 Determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gas acoplada a un detector de masa (GC-MS)

3.4.4.1 Preparación de los estándares

Se preparó una solución de 100 ppm de estándar mixto de los siguientes ácidos grasos saturados e insaturados: ácido tetraenoico (14:0), ácido hexadecanoico (16:0), ácido 9,12-octadecadienoico (18:2), ácido 9-octadecenoico (18:1), ácido octadecanoico (18:0), ácido eicosanoico (20:0) y ácido docosanoico (22:0). Se inyectó en el GC-MS para obtener los tiempos de retención e identificar los ácidos grasos según el método utilizado.

3.4.4.2 Extracción y purificación de lípidos

Se pesaron aproximadamente 10 g del homogeneizado de filetes de tilapia y se colocaron en una licuadora (Waring Commercial Blender) donde fueron mezclados con 10 mL de cloroformo y 20 mL de metanol por 2 minutos. Luego se homogeneizó por 30 segundos con 10 mL de cloroformo y 10 mL de agua destilada adicionales. El homogeneizado se filtró con papel de filtro Whatman no. 1 a través de un embudo Büchner. El filtrado se transfirió a un tubo de ensayo y se dejó reposar hasta que se separó en dos fases. La fase superior se aspiró con una pipeta pasteur y la fase inferior se transfirió a un matraz de destilación. El matraz se conectó a un evaporador rotativo a una temperatura de 60°C y 60% de rotación hasta que el disolvente fue removido.

3.4.4.3 Saponificación y esterificación

Al matraz de destilación se le añadió 7 mL de KOH 0.5 N en metanol. El contenido del matraz se transfirió a un tubo de ensayo de 18 x 150 mm, se cubrió con una canica y se calentó a

75°C durante 10 minutos. Al tubo de ensayo se le añadieron 10 mL de BF_3 5% en metanol y se calentó por cinco minutos adicionales.

3.4.4.4 Extracción a hexano

Luego del período de calentamiento se le añadieron 10 mL de hexano, se agitó el contenido del tubo con un agitador de vidrio y se dejó reposar hasta que las dos fases se separaron. La fase superior o fase orgánica se removió con una pipeta. A la fase inferior se le añadieron 10 mL de hexano para llevar a cabo la segunda extracción repitiendo el mismo procedimiento. Ambas fases orgánicas se mezclaron en un matraz Erlenmeyer y se secó la fase con sulfato de sodio anhidro (NaSO_4).

3.4.4.5 Caracterización de ácidos grasos mediante cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS)

Se utilizó un cromatógrafo de gas Hewlett-Packard HP 6980 series acoplado a un detector HP 5973 MS (figura 6). Se inyectó 1 μL de la muestra en la cámara de inyección a 280°C. Los componentes de la muestra fueron separados con una columna “5% diphenyl / 95% dimethylsiloxane (SPB-5)” bajo 10 libras de presión y un flujo de helio de 1.2 mL/min. La temperatura inicial del horno fue de 160°C. La temperatura aumentó a 10°C por minuto hasta alcanzar 240°C, luego aumentó a 280°C a razón de 5°C por minuto. Una vez alcanzada la temperatura final se sostuvo por 5 minutos para una corrida total de 44 minutos.



Figura 6. Cromatógrafo de gas Hewlett-Packard HP 6980 series acoplado a un detector HP 5973 MS (espectrómetro de masas)

3.4.5 Cuantificación de hexanal y compuestos volátiles mediante Microextracción de Fase Sólida (SPME) y análisis por cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas

Se caracterizaron los compuestos volátiles en los filetes de tilapia a través del tiempo de almacenamiento utilizando microextracción de fase sólida (SPME) y análisis y detección mediante cromatografía de gas acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS).

3.4.5.1 Extracción mediante Microextracción de fase sólida (“SPME”)

Antes de la extracción, la fibra de 65 μm polidimetilsiloxano/divinilbenceno se acondicionó en el puerto de inyección a 250°C del cromatógrafo de gas HP 6980, durante una hora según la recomendación de la Compañía Supelco, Inc (Bellefonte, PA). La temperatura del horno se llevó a 260°C y se dejó a esta temperatura por 30 minutos. Luego se ajustaron los parámetros a utilizarse en el análisis y se obtuvo un blanco para asegurar la limpieza de la fibra y la columna.



Figura 7. Extracción de volátiles del “headspace” mediante la aguja de micoextracción de fase sólida (SPME)

Se pesó aproximadamente 10.0000 ± 0.0025 g de muestra y se colocó en un “vial” de 40 mL. La extracción se llevó a cabo introduciendo la aguja de microextracción de fase sólida por el septo de silicona en el “vial”. 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 30 minutos (VWR Timer Stopwatch) (Figura 6). Concluido el tiempo, la fibra se retrajo para ser inyectada en el puerto de inyección del cromatógrafo de gas.

3.4.5.2 Caracterización compuestos volátiles

Para la desorción de los compuestos se utilizó un cromatógrafo de gas HP 6890 acoplado a un espectrómetro 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 4.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas utilizadas durante el análisis de hexanal y compuestos volátiles mediante cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masa

Fibra SPME	65µm polidimetilsiloxano/divinilbenceno
Equipo	HP 6890
Detector	HP 5973MSD
Rango de masa	35-500
Columna	SBP-5
Gas	Helio
Tiempo de purga	3.0 minutos
Temperatura del inyector	250°C
Temperatura del horno inicial	40°C
Rampa	5.0°C/minuto
Temperatura final	230°C

3.5 ANÁLISIS SENSORIAL

Luego de completado los seis meses de almacenamiento de los filetes de tilapia se realizó un análisis sensorial. Se utilizó un panel de 11 personas adiestradas para reconocer el atributo rancidez.

3.5.1 Adiestramiento de los panelistas

En el adiestramiento los panelistas se familiarizaron con el atributo rancidez en filetes de tilapia. Se utilizó la prueba A no-A para identificar aquellos panelistas que lograron detectar correctamente diferencias significativas en rancidez. A doce panelistas se les presentaron tres muestras donde debían decidir si cada muestra era rancia o no rancia (figura 14). Se escogieron 11 personas que contestaron correctamente y formaron parte del análisis sensorial.

3.5.2 Análisis sensorial luego de seis meses de almacenamiento

Se realizó una prueba de ordenamiento simple con un panel de 11 personas. Los panelistas previamente adiestrados ordenaron cuatro muestras correspondientes a cada tratamiento en orden de menor a mayor rancidez (figura 15). Los filetes fueron cortados a un tamaño de 1 x 1 pulgada y horneados a 350°C por 30 minutos según el procedimiento de Vargas, 2001. Las combinaciones de los tratamientos asignadas a cada panelista fueron establecidas una tabla de números al azar (Meilgaard et al, 1999) (tabla 5).

Tabla 5. Distribución de las muestras al azar para cada panelistas.

Panelista	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4	
1	A	127 ¹	C	397 ¹	B	547 ¹	D	994 ¹
2	D	554	A	841	B	933	C	157
3	B	891	A	223	C	921	D	233
4	C	916	B	585	D	282	A	349
5	B	379	C	774	A	818	D	565
6	A	232	B	119	C	216	D	826
7	D	337	C	426	B	967	A	914
8	D	843	B	537	A	532	C	226
9	C	562	D	784	A	859	B	488
10	A	924	D	692	B	728	C	732
11	C	259	A	863	D	191	B	999

¹Los números en cada columna representan la identificación utilizada para las muestras.

Se utilizó la prueba de Friedman para determinar si había diferencias significativas entre los cuatro tratamientos. Para ordenar los tratamientos de menor a mayor rancidez se utilizó la prueba de comparaciones múltiples “tukey”.

3.6 DISEÑO ESTADÍSTICO EXPERIMENTAL

El diseño experimental fue completamente aleatorizado en un modelo factorial 4 x 4 con efectos fijos (4 tratamientos de ácido ascórbico y 4 tiempos de almacenamiento analizados). El experimento se realizó en triplicado. Los datos obtenidos fueron analizados usando el programa estadístico SAS (Sistema de Análisis Estadístico) para el análisis de varianza ($\alpha=0.05$). Los promedios correspondientes se compararon mediante la prueba de Tukey.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PORCIENTO DE HUMEDAD

El por ciento de humedad es utilizado como índice de estabilidad y calidad (Joslyn, 1970). La cantidad de humedad en el pescado durante los seis meses de congelación nos puede indicar si hubo cambios en el proceso de almacenamiento congelado por cambios drásticos en temperatura, en caso de fallas con el refrigerador y si se perdió agua que pudiera causar pérdidas significativas en ácido ascórbico, ya que el ácido ascórbico es soluble en agua.

Durante los seis meses de almacenamiento no hubo diferencias significativas en el porcentaje de humedad entre los tratamientos (tabla 6). El por ciento de humedad en cada tratamiento con ácido ascórbico y el control fue similar, que es indicativo de que el proceso de adición de ácido ascórbico a las muestras por inmersión no afectó el contenido de humedad de las mismas (figura 8).

Tabla 6. Efecto del ácido ascórbico en el porcentaje de humedad en filetes de tilapia congelados

	Tratamiento de ácido ascórbico			
	0 ppm (control)	5 ppm	500 ppm	50,000 ppm
Humedad (%)	82.79 _a	81.63 _a	82.35 _a	81.71 _a

Medias con distintos subíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$) según la prueba de *Tukey*.

Tabla 7. Efecto del tiempo de almacenamiento en el porcentaje de humedad en filetes de tilapia congelados

	Tiempo de Almacenamiento (meses)			
	0	2	4	6
Humedad (%)	83.16 _a	81.14 _b	81.92 _{ab}	82.25 _{ab}

Medias con distintos subíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$) según la prueba de *Tukey*.

Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre el tiempo de almacenamiento (tabla 7). El mes 0 (día cero) fue significativamente diferente al segundo mes mientras que no hay diferencias significativas al comparar los meses 2, 4 y 6. La pérdida de humedad significativa entre el mes 0 y el mes 2 puede deberse al proceso de congelación que pasaron las muestras luego de la recolección y preparación de las muestras. Durante el proceso de congelación, las muestras sufren de una deshidratación interna o inmovilización del agua debido a la formación de cristales de hielo y bajas temperaturas (Foegeding, et. al., 1996). Las muestras del segundo, cuarto y sexto mes de almacenamiento sufrieron de congelación lenta a -18°C que pudiera causar pérdida del agua libre y una mayor pérdida de humedad. Sin embargo, la muestra del mes cero que sufrió de congelación rápida a -80°C , pudo causar una menor pérdida del contenido de humedad (tabla 7). Luego del segundo mes, en las muestras que se congelaron lentamente, no se detecta una pérdida significativa de humedad lo que indica que las muestras no sufrieron de cambios drásticos de temperatura y por consiguiente de pérdida de agua. Estos resultados comparan con la investigación en filetes de tilapia congelados de Vargas (2001) donde no hubo cambios en el contenido de humedad entre los tratamientos de ácido ascórbico en filetes de tilapia congelados durante seis meses.

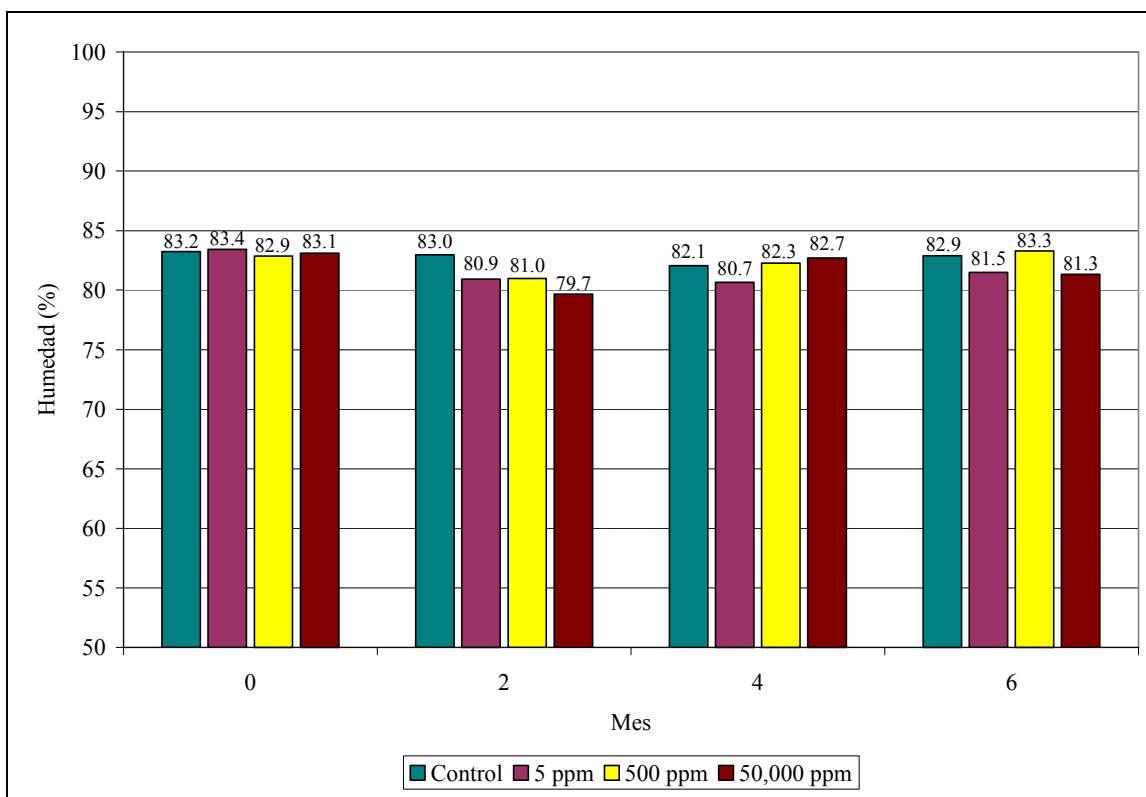


Figura 8. Porciento de humedad en filetes de tilapia (*Oreochromis niloticus*) a través del tiempo de almacenamiento

4.2 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO (VITAMINA C) MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (“HPLC”)

Se determinó la cantidad de ácido ascórbico a través del tiempo de almacenamiento para detectar una posible pérdida por descongelación de la muestra u oxidación de ácido ascórbico. En el tiempo cero, se determinó la cantidad de ácido ascórbico (vitamina C) que fue absorbida por los filetes de tilapia luego de sumergidos en las concentraciones de ácido ascórbico correspondientes a cada tratamiento.

No se detectaron diferencias significativas en el contenido de ácido ascórbico entre los meses de almacenamiento (tabla 8). Este resultado sugiere que no hubo pérdidas significativas de ácido ascórbico durante el proceso de congelación, el almacenamiento ni debido a oxidación.

Thompson y Fennema (1971) encontraron que cuando el alimento se congela se reduce la oxidación del ácido ascórbico.

A pesar de que el control no recibió tratamiento de ácido ascórbico los análisis detectaron un contenido promedio de 200 ppm (2.0 mg en 100 g de muestra) en las muestras del control (tabla 8). Este contenido de ácido ascórbico en tilapia es considerado insignificante y no se reporta en el contenido nutricional ya que no llega al requerimiento nutricional diario de un 2% de 60 mg de ácido ascórbico o sea al menos 12 mg de ácido ascórbico (21 CFR 101.9 (c) (8) (iii), 2005).

Hay una tendencia de menor cantidad de ácido ascórbico en las muestras del tratamiento de 5 ppm de ácido ascórbico comparada con el tratamiento control (tabla 8). Esto pudo deberse a que la cantidad de 5 ppm de vitamina C es mínima comparada con la encontrada en los filetes control y la solución de 5 ppm de ácido ascórbico es hipotónica lo que pudo causar que los filetes perdieran vitamina C al sumergirse en esta solución. Esto resultaría en un control con mayor concentración de vitamina C que el pescado sumergido en solución de ácido ascórbico de 5 ppm, consistente con los resultados obtenidos.

Tabla 8. Medias de ácido ascórbico en filetes de tilapia según los factores de tratamiento y tiempo de almacenamiento

	Porciento de ácido ascórbico
Tratamiento	
0 ppm	0.0200 (200 ppm) _a
5 ppm	0.0108 (108 ppm) _a
500 ppm	0.0355 (355 ppm) _a
50,000 ppm ¹	4.9496 (49,496 ppm) _b
Tiempo de almacenamiento (meses)	
0	1.409 _a
2	1.383 _a
4	1.122 _a
6	1.103 _a

Medias de cada factor con distintos subíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$) según la prueba de Tukey.

¹El tratamiento de 50,000 ppm de ácido ascórbico es igual a 5 %.

4.3 PRUEBA DE ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO (TBA)

La prueba de TBA mide la cantidad de malonaldehído, un producto secundario de la oxidación de lípidos. No se encontraron diferencias significativas en el valor de TBA a través del tiempo de congelación (tabla 9). Debido a que el contenido de grasa en tilapia es tan bajo (0.5 a 2%) el desarrollo de rancidez fue mínimo y no fue detectable mediante esta prueba.

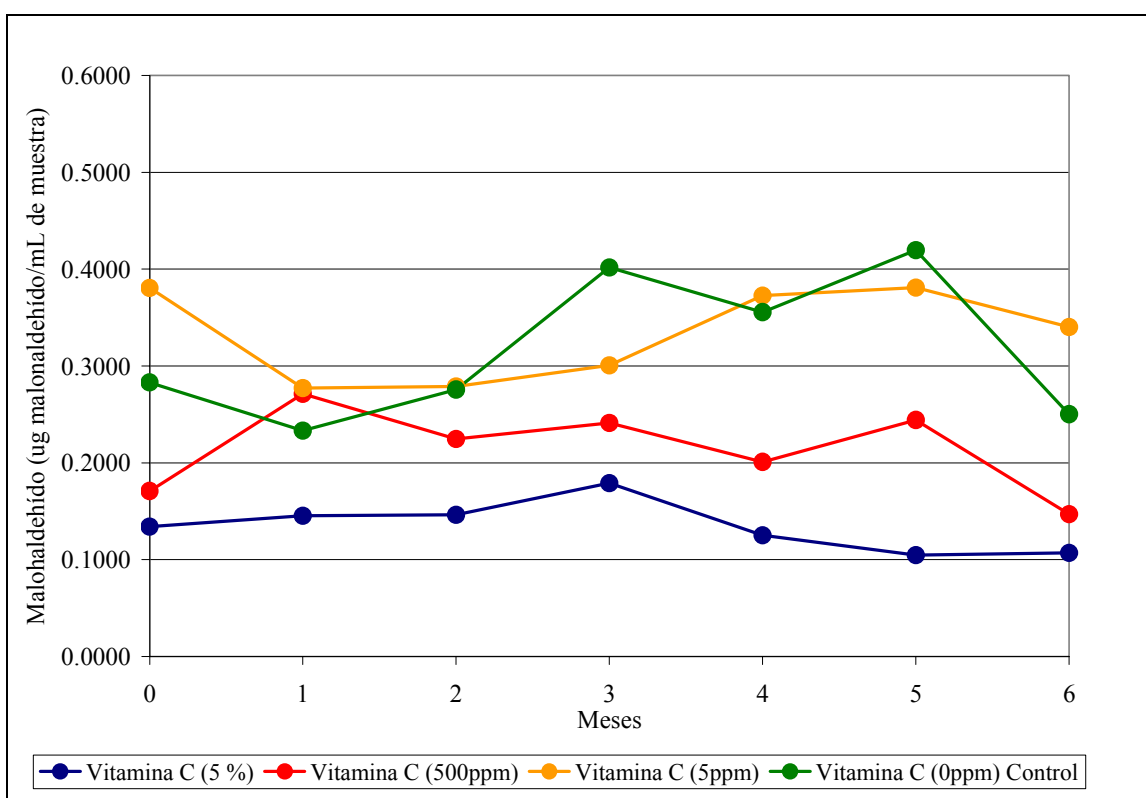


Figura 9. Contenido de malonaldehído (TBARS) en filetes de tilapia (*Oreochromis niloticus*) a través del tiempo de almacenamiento

Al comparar el valor de TBA entre los cuatro tratamientos mediante el análisis estadístico, se detectan diferencias significativas. Los valores de TBA para las muestras con 5 ppm de ácido ascórbico y las muestras del control no fueron significativamente diferentes y

fueron los tratamientos con mayor contenido de malonaldehído. El tratamiento con menor contenido de malonaldehído fue el tratamiento con 50,000 ppm o 5% de ácido ascórbico (figura 9). Esto sugiere que la mayor concentración de ácido ascórbico utilizada en esta investigación tuvo un efecto antioxidante protegiendo contra la oxidación de lípidos mejor que los tratamientos con menor o ninguna concentración añadida de ácido ascórbico. El ácido ascórbico posee un efecto de antioxidante natural y ha sido utilizado con este propósito en contra de la rancidez en pescado. Erickson (1993) estudió la degradación y efecto del ácido ascórbico en dos cepas (AQUA y LSU) de Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) congelado durante nueve meses. La cepa LSU que contenía mayor cantidad de ácido ascórbico obtuvo niveles menores de TBA comparados con la cepa AQUA y la oxidación de lípidos fue más pronunciada en la cepa AQUA que contenía menor cantidad de ácido ascórbico. En un estudio del efecto de ácido ascórbico en el pescado *Mugil cephalus* se encontró que la oxidación de lípidos, determinada por el valor de TBA, fue mayor en filetes con 500 ppm o más de ácido ascórbico añadido (Deng, et. al., 1978). En ese estudio también se observó aumento en el valor de TBA en los filetes con 100 ppm de ácido ascórbico añadida sugiriendo un efecto prooxidante de parte del ácido ascórbico.

Santana (1989) reporta un valor de TBA de 579.5 μg de malonaldehído/kg de muestra (0.5975 μg de malonaldehído/g de muestra) para tilapia en salmuera (1 día de almacenamiento a 2°C). Los valores de TBA reportados por Vargas (2001) para tilapia con 5% de ácido ascórbico y controles durante seis meses de almacenamiento a -18°C muestran un efecto antioxidante del ácido ascórbico. Vargas (2001) reporta en dicha investigación un valor de TBA promedio de 0.1864 μg de malonaldehído/mL de muestra para las muestras con 5% de ácido ascórbico y un valor promedio de 0.3632 μg de malonaldehído/mL de muestra para el control. Ambos valores

de TBA son similares a los valores obtenidos durante esta investigación en los tratamientos correspondientes.

Tabla 9. Medias de valor de TBA en filetes de tilapia según los factores de tratamiento y tiempo de almacenamiento

	μg de malonaldehído / mL de muestra
Tratamiento	
0 ppm	0.3373 _a
5 ppm	0.3331 _a
500 ppm	0.2144 _b
50,000 ppm ¹	0.1346 _c
Tiempo de almacenamiento (meses)	
0	0.2778 _a
1	0.2318 _a
2	0.2314 _a
3	0.2807 _a
4	0.2637 _a
5	0.2874 _a
6	0.2112 _a

Medias de cada factor con distintos subíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$) según la prueba de *Tukey*.

¹El tratamiento de 50,000 ppm de ácido ascórbico es igual a 5 %.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GAS ACOPLADA A UN ESPECTRÓMETRO DE MASA (GC-MS)

El cromatógrafo de gas es muy utilizado para el análisis de lípidos ya que se pueden identificar y determinar la cantidad de ácidos grasos presentes en una muestra. En esta investigación se evaluó la composición de ácidos grasos, en particular los ácidos grasos insaturados, para cada tratamiento y a través del tiempo de almacenamiento.

La tabla 10 muestra los tiempos de retención de los ácidos grasos identificados por el cromatógrafo de gas. Los ácidos grasos más abundantes encontrados en las todas las muestras de filetes fueron: ácido hexadecanoico (ácido palmítico), ácido 9-octadecenoico (ácido oleico),

ácido 9,12-octadecadienoico (ácido linoleico), ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA) y ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA) (tabla 11). Vargas (2001) reportó el ácido palmítico, linoleico, esteárico, araquidónico, EPA y DHA como los más abundantes en filetes de tilapia.

Tabla 10. Tiempos de retención de ácidos grasos en filete de tilapia (*Oreochromis niloticus*) caracterizados mediante GC/MS.

Ácido Graso	Tiempo de retención (minutos)
ácido tetraenoico (14:0) ¹	12.68
ácido 9-hexadecenoico (16:1)	14.71
ácido hexadecanoico (16:0)	14.94
ácido 9, 12- octadecadienoico (18:2)	16.70
ácido 9- octadecenoico (18:1)	16.76
ácido 6- octadecenoico (18:1)	16.81
ácido 11- octadecenoico (18:1)	16.89
ácido octadecanoico (18:0)	17.00
ácido 5, 8, 11, 14, 17- eicosapentaenoico (EPA, 20:5)	18.49
ácido 7, 10, 13- eicosatrienoico (20:3)	18.89
ácido 11, 14, 17- eicosatrienoico (20:3)	18.91
ácido 4, 7, 10, 13, 16, 19- docosahexaenoico (DHA, 20:6)	20.72

¹Nomenclatura entre paréntesis (número de enlaces: número de enlaces dobles)

Una disminución en el porcentaje de ácidos grasos insaturados puede indicar que los ácidos grasos se están oxidando y formando productos secundarios de oxidación. La tabla 11 muestra el porcentaje de ácidos grasos en el sexto mes de almacenamiento y tabla 15 en el apéndice, resume los resultados del porcentaje de ácidos grasos para todos los tratamientos a través de los seis meses. La mayoría de los ácidos grasos no muestran una tendencia de aumento o disminución significativa, lo que sugiere que no hubo gran desarrollo de rancidez a través del tiempo. El poco desarrollo de rancidez se puede relacionar a la temperatura de congelación y el bajo porcentaje de grasa que tiene la tilapia, lo que aumenta el error experimental de las muestras. Vargas (2001) reportó el mismo problema con la técnica y el método utilizado para analizar la

composición de ácidos grasos. Probablemente se requiera un estudio con un tiempo de almacenamiento más prolongado o a una temperatura de almacenamiento más alta para aumentar el grado de rancidez en los filetes de tilapia.

Tabla 11. Porciento de ácidos grasos caracterizados en tilapia (*Oreochromis niloticus*) al sexto mes de almacenamiento en tratamientos con ácido ascórbico (vitamina C) y control mediante GC/MS

Ácido graso identificado	Sexto mes de almacenamiento			
	Control	5 ppm	500 ppm	50,000 ppm
ácido tetraenoico (14:0) ²	1.12	0.93	1.46	0.85
ácido 9-hexadecenoico (16:1)	2.36	1.85	3.11	1.42
ácido 11-hexadecenoico				
ácido hexadecanoico (16:0)	29.79	28.27	28.49	36.07
ácido 9, 12- octadecadienoico (18:2)	11.65	12.27	15.88	11.73
ácido 9- octadecenoico (18:1)	13.66	10.01	24.27	14.54
ácido 6- octadecenoico (18:1)	7.60	6.36	2.35	1.66
ácido 11- octadecenoico (18:1)		1.21		
ácido octadecanoico (18:0)	7.10	6.47	4.52	6.86
ácido 5, 8, 11, 14, 17- eicosapentaenoico (EPA, 20:5)	8.68	8.70	4.78	7.33
ácido 7, 10, 13- eicosatrienoico (20:3)	1.32	1.38	0.26	1.16
ácido 11, 14, 17- eicosatrienoico (20:3)				
ácido 4, 7, 10, 13, 16, 19 - docosahexaenoico (DHA, 20:6)	6.37	8.34	6.21	7.09

¹Los ácidos grasos que no muestran un valor correspondiente en la tabla no se detectaron en esa muestra a ese tiempo de almacenamiento.

²Nomenclatura entre paréntesis (número de enlaces: número de enlaces dobles)

4.5 CUANTIFICACIÓN DE HEXANAL Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN DE FASE SÓLIDA (SPME) Y ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GAS ACOPLADA A UN ESPECTÓMETRO DE MASAS

Los aldehídos y otros compuestos volátiles son productos secundarios de la oxidación de lípidos y son causantes del deterioro en el sabor y la calidad del producto. Hexanal, producido de la descomposición del ácido linoleico, es comúnmente utilizado como indicador de deterioro en el sabor y de oxidación de lípidos en carnes (Shahidi y Pegg, 1994). En esta investigación se utilizó la microextracción de fase sólida (SPME) para extraer los componentes volátiles en el “headspace” de las muestras y luego caracterizarlos mediante el cromatógrafo de gas.

4.5.1 Cuantificación de hexanal mediante SPME-GC/MS

En el análisis estadístico del contenido de hexanal se encontró interacciones entre los dos factores estudiados por los cual los efectos principales del ácido ascórbico y el tiempo de almacenamiento no pudieron interpretarse. Sin embargo, el análisis de los efectos simples de cada tratamiento a través del tiempo de almacenamiento se observa un patrón de aumento en el contenido de hexanal para el control. Entre el primer y segundo mes no hubo diferencias notable en el contenido de hexanal, mientras que para el cuarto y sexto mes aumentó significativamente (tabla 12). Según St. Angelo et. al. (1992), en un estudio sobre la evaluación química y sensorial del sabor en carnes sin tratamiento de antioxidantes y con antioxidantes, se encontró que el primer producto de oxidación observado fue hexanal y luego de tres días de almacenamiento de la carne, hexanal obtuvo un crecimiento diez veces mayor y un coeficiente de correlación con el análisis de TBARS (“Thiobarbituric Reactive Substances”) de 0.7854. Se encontró una relación entre el deterioro en la carne y un aumento en el contenido de hexanal.

Tabla 12. Contenido de hexanal en filetes de tilapia según los factores de tratamiento de ácido ascórbico y tiempo de almacenamiento

Mes de almacenamiento (meses)	Contenido de ácido ascórbico (ppm)	Contenido de hexanal (mg de hexanal/g de muestra)
0	0	0.000
0	5	1.301
0	500	1.460
0	50,000	1.463
2	0	2.225
2	5	2.155
2	500	1.535
2	50,000	1.975
4	0	3.128
4	5	1.800
4	500	3.763
4	50,000	2.544
6	0	6.188
6	5	2.317
6	500	2.093
	50,000	1.811

La figura 10 muestra las interacciones entre los tratamientos de ácido ascórbico y el tiempo de almacenamiento. Los tratamientos con ácido ascórbico añadido mantuvieron una tendencia aumento de contenido de hexanal similar a través de los meses. La figura 10 muestra el control y el tratamiento de 5 ppm de ácido ascórbico con una tendencia de aumento de hexanal al sexto mes. En los tratamientos de 500 ppm y 50,000 ppm de ácido ascórbico el contenido de hexanal se mantuvo constante hasta el cuarto mes donde se observó un aumento seguido de una disminución en el sexto mes. Las medias obtenidas sugieren que el control desarrolló mayor

rancidez, con una tendencia de incremento marcada para el sexto mes de almacenamiento. La concentración de 5 ppm de ácido ascórbico obtuvo el menor valor promedio (1.893 mg de hexanal/g de muestra) para hexanal seguida de la concentración de 50,000 ppm de ácido ascórbico (1.949 mg de hexanal/g de muestra). Estos resultados sugieren que el ácido ascórbico a 50,000 ppm (5%) y 5 ppm actuó como antioxidante en los filetes de tilapia.

En el mes cero se observó un contenido inicial similar para las muestras sumergidas en vitamina C. Las muestras control fueron las únicas a las que no se les detectó hexanal en el mes cero. Esto podría sugerir que al sumergir las muestras en las diferentes soluciones se promueve un grado de oxidación inicial o que la solución de ácido ascórbico contuviera hexanal.

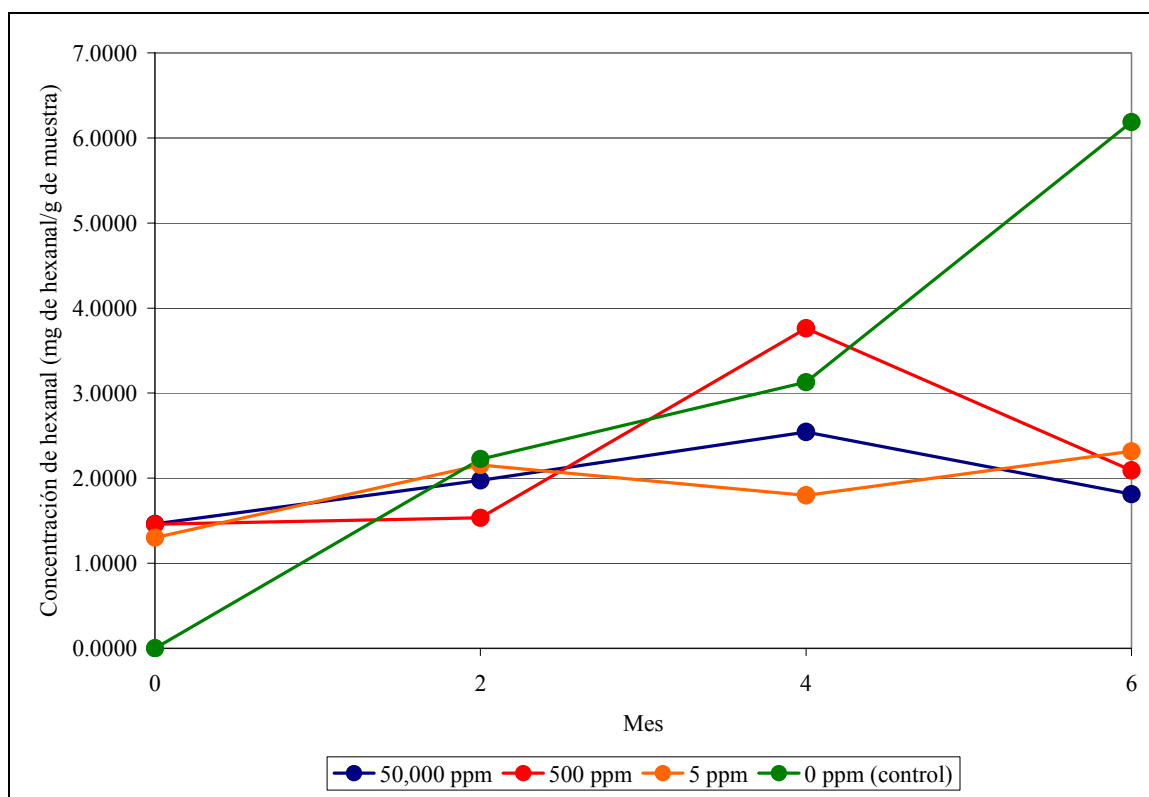


Figura 10. Interacción no ordenada entre el factor de tratamiento de ácido ascórbico y el factor de tiempo de almacenamiento a través del tiempo de almacenamiento

4.5.2 Caracterización de compuestos volátiles mediante SPME-GC/MS

La tabla 13 muestra los compuestos volátiles identificados en el “headspace” de las muestras a través de los seis meses de almacenamiento. Se identificaron un total de 53 compuestos volátiles en los filetes de tilapia los cuales se clasificaron en: 14 aldehídos, 12 alcanos, 10 alcoholes, 8 cetonas, 8 ácidos carboxílicos y un terpeno. La figura 11 muestra el porcentaje de los compuestos volátiles identificados en cada tratamiento entre el total de los compuestos identificados durante el tiempo de almacenamiento. Se observa en el cuarto mes un mayor contenido de volátiles para el control. Además, el contenido de compuestos volátiles es similar en el sexto mes de almacenamiento en todos los tratamientos lo que puede indicar un desarrollo de oxidación igual en cada tratamiento. En todas las muestras de tilapia se identificó: hexanal, nonanal y d-limoneno. Hexanal es utilizado como indicador de oxidación de lípidos. Nonanal es un aldehído, producto de la oxidación del ácido oleico, que también ha sido utilizado como indicador de oxidación (St. Angelo et. al., 1992). Limoneno es un terpeno que se encuentra en la cubierta de los cítricos y tiene un sabor característico a limón. Este compuesto es utilizado como saborizante artificial, insecticida y pesticida clasificado de bajo riesgo por la agencia federal de protección ambiental (EPA).

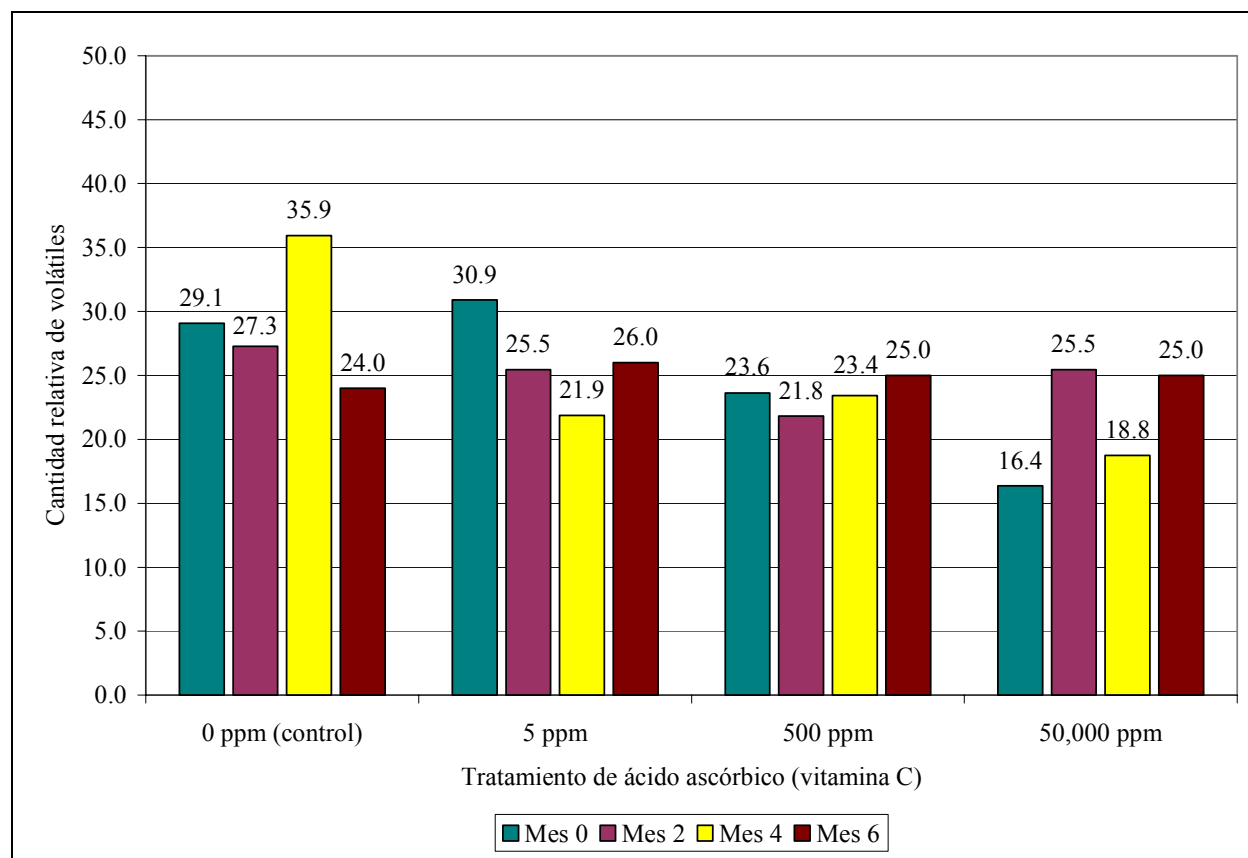


Figura 11. Porcentaje relativo de compuestos volátiles identificados mediante SPME-GC/MS por tratamiento de ácido ascórbico a través del tiempo de almacenamiento

Durante los primeros dos meses la cantidad de compuestos volátiles identificados se mantuvo igual. Se observó un aumento de estos compuestos durante el cuarto y sexto mes de almacenamiento (figura 12). Un aumento de los compuestos volátiles puede sugerir el desarrollo de rancidez en los filetes ya que los compuestos volátiles son productos secundarios de la oxidación de lípidos.

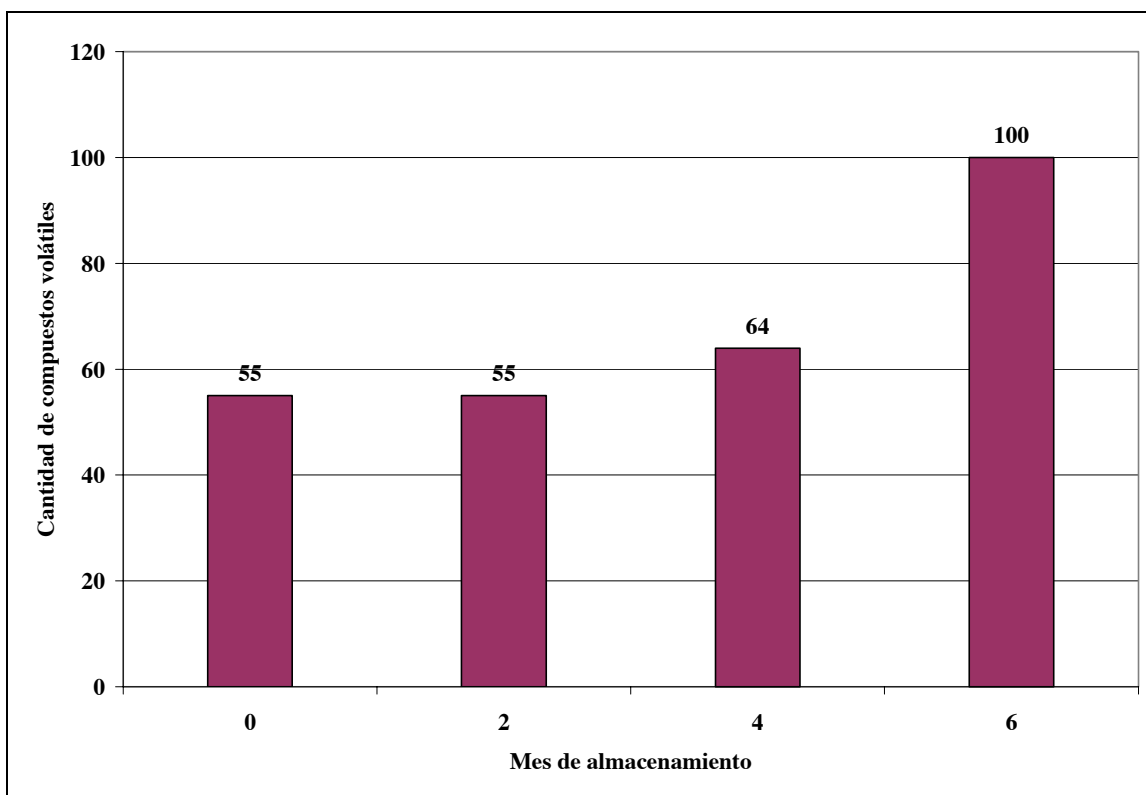


Figura 12. Compuestos volátiles identificados por SPME-GC/MS en el “headspace” del filete de tilapia (*Oreochromis niloticus*) a través del tiempo de almacenamiento

La mayor cantidad de compuestos volátiles se obtuvo del tratamiento control (0 ppm de ácido ascórbico). El tratamiento de 50,000 ppm (5%) de ácido ascórbico obtuvo el menor número de compuestos volátiles a través del tiempo (figura 13). Estos resultados sugieren que el ácido ascórbico tuvo un efecto antioxidante en los filetes que recibieron 50,000 ppm de ácido ascórbico hasta el cuarto mes de almacenamiento. Por otra parte, en los tratamientos con menor concentración de ácido ascórbico (5 ppm y control) no hubo efecto antioxidante a través del tiempo.

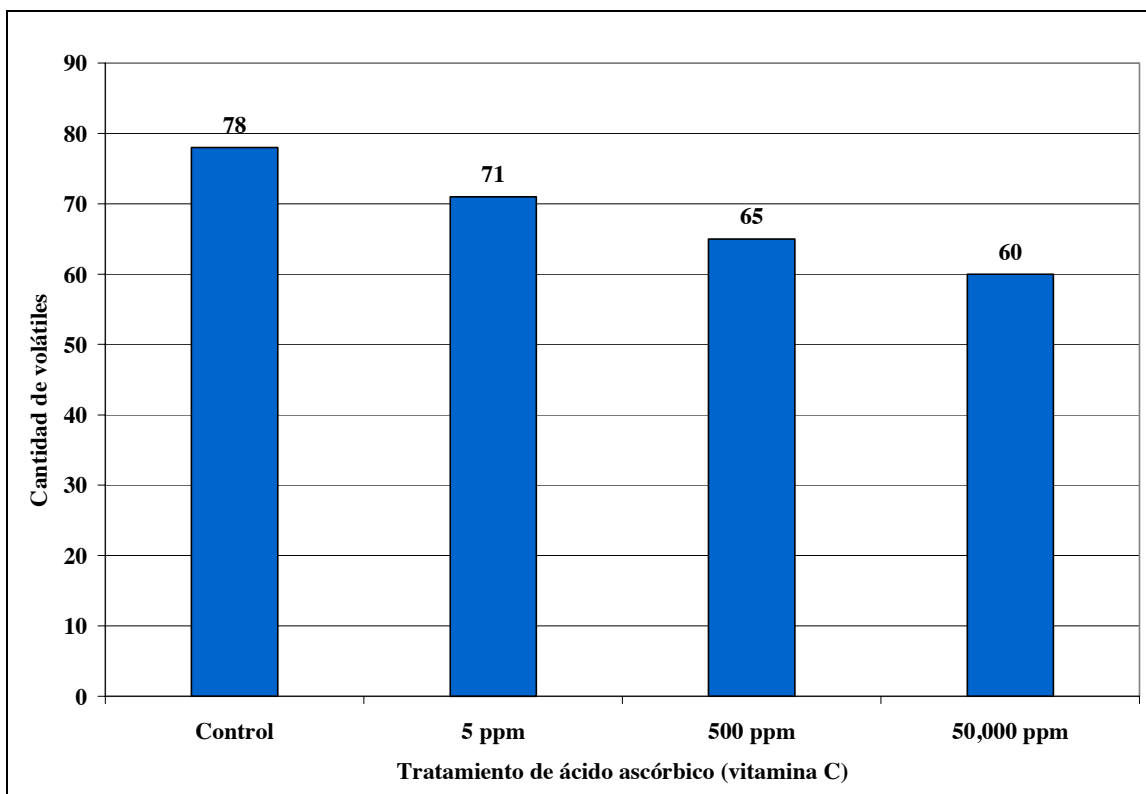


Figura 13. Compuestos volátiles identificados por SPME-GC/MS en el “headspace” del filete de tilapia (*Oreochromis niloticus*) por tratamiento de ácido ascórbico (vitamina C)

De los volátiles identificados, los aldehídos son los compuestos más significativos en el desarrollo de sabores. Hexanal imparte un olor o sabor penetrante descrito como “fatty-green”. Otros aldehídos como 2-heptenal, imparten “green flavors” al pescado. Sin embargo, los aldehídos 2,4,7-decatienales y cis-4-heptenal, responsables de sabores “oxidized-fishy” o “cod liver oil” (Karahadian y Lindsay, 1989), no fueron detectados en ninguna de las muestras mediante el método utilizado. El aldehído cis-4-heptenal proviene de la descomposición de trans-2, cis-6-nonadienal en la oxidación de lípidos y promueve los sabores de rancidez que provienen de 2,4,7-decatrienales (Högnadóttir, 1999). Los alcoholes y cetonas contribuyen en menor grado a sabores no deseados. Un alcohol identificado al sexto mes en el tratamiento de

500 ppm y el control (tabla 13), 1-octen-3-ol, se encuentra frecuentemente en el pescado y contribuye a sabores parecidos a plantas y sabores metálicos (Lindsay, 1994). Los hidrocarburos proveen una contribución mínima a los sabores u olores (Dumm y Spanier, 1991). Los ácidos carboxílicos reportados son probablemente productos de la oxidación de los aldehídos.

Tabla 13. Compuestos volátiles identificados en tilapia (*Oreochomis niloticus*) mediante SPME-GC/MS.

Compuestos volátiles	Mes 0 ¹				Mes 2				Mes 4				Mes 6			
	control	500 ppm ²	50,000 ppm	5 ppm	control	500 ppm	50,000 ppm	5 ppm	control	500 ppm	50,000 ppm	5 ppm	control	500 ppm	50,000 ppm	5 ppm
Aldehídos																
acetaldehído					X											
n-butanal				X	X				X	X			X			
n-pentanal					X	X			X X							
n-hexanal		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
n-heptanal					X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
2-hexenal		X														
n-octanal													X			
2-heptenal					X											X
n-nonanal	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
decanal	X	X			X		X		X				X			X
undecanal									X							
2,4-hexadienal													X			
benzaldehído	X		X		X				X	X	X	X	X			

Compuestos volátiles	Mes 0 ¹				Mes 2				Mes 4				Mes 6			
	control	500 ppm ²	50,000 ppm	5 ppm	control	500 ppm	50,000 ppm	5 ppm	control	500 ppm	50,000 ppm	5 ppm	control	500 ppm	50,000 ppm	5 ppm
5-octadecenal											X		X			X
Alcanos																
hexano				X					X			X	X	X	X	X
heptano		X		X		X	X		X				X	X	X	X
1-hepteno														X	X	
octano	X	X	X	X			X	X	X	X		X	X	X	X	X
nonano		X						X	X	X		X	X	X	X	X
decano	X	X		X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X
undecano	X	X		X	X	X		X	X	X			X	X	X	X
dodecano					X			X	X		X		X	X	X	X
hexadecano	X								X				X	X	X	X
heptadecano															X	
octadecano			X						X				X	X		X
nonadecano														X	X	
Alcoholes																
2-propanol									X				X	X	X	X

Compuestos volátiles	Mes 0 ¹				Mes 2				Mes 4				Mes 6			
	control	500 ppm ²	50,000 ppm	5 ppm	control	500 ppm	50,000 ppm	5 ppm	control	500 ppm	50,000 ppm	5 ppm	control	500 ppm	50,000 ppm	5 ppm
1-pentanol	X			X									X			
2-nonanol		X														
1-octanol				X			X				X		X	X		
1-octen-3-ol													X	X		
1-nonen-3-ol													X			X
1-decanol				X					X				X	X	X	X
1-dodecanol													X	X		X
1,6,10-dodecatrie-3-ol															X	
fenol	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X			X	X
Cetonas																
2-hexanona	X															
3-hexanona				X												
2-hexen-2-ona														X		
5-hepten-2-ona		X	X			X								X		X
3-heptanona					X											
2,3-octadienona					X			X	X	X			X	X		X

Compuestos volátiles	Mes 0 ¹				Mes 2				Mes 4				Mes 6			
	control	500 ppm ²	50,000 ppm	5 ppm	control	500 ppm	50,000 ppm	5 ppm	control	500 ppm	50,000 ppm	5 ppm	control	500 ppm	50,000 ppm	5 ppm
2,5-hexanediona									X			X	X			
Terpeno																
d-limoneno	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ácidos carboxílicos																
propanoico				X		X	X		X			X			X	X
butanoico				X		X	X	X	X					X	X	X
pentanoico				X				X	X		X	X				X
2-propenoico	X															
hexanoico					X				X							
9-hexadecenoico	X															
decanoico	X															
benzoico	X		X		X		X		X	X	X			X	X	
Total	17	13	9	16	14	12	14	15	14	15	12	23	26	25	25	24

¹ Mes de almacenamiento de la muestra.

² Concentración de ácido ascórbico (vitamina C) añadida.

4.6 ANÁLISIS SENSORIAL

Una prueba sensorial es la evaluación e interpretación de las reacciones humanas a ciertos atributos en los alimentos que son percibidos a través de los sentidos. Las pruebas sensoriales objetivas se dividen en: pruebas discriminativas y pruebas descriptivas. En las pruebas discriminativas los panelistas establecen diferencias o similitudes entre dos productos. Las pruebas descriptivas son para determinar el grado de diferencia entre las muestras.

Doce panelistas, con conocimientos en análisis sensorial, fueron adiestrados para reconocer el atributo de rancidez en tilapia. Sólo se escogieron 11 panelistas que lograron reconocer el atributo rancidez correctamente en la prueba discriminativa A no-A. Los 11 panelistas entrenados evaluaron el atributo de rancidez en tilapia a los seis meses de almacenamiento mediante la prueba de ordenamiento simple. Los panelistas determinaron el orden de las muestras de menor a mayor rancidez. Cada panelista recibió una muestra codificada que representaba un tratamiento, un total de 4 muestras por panelista.

La tabla 14 muestra los resultados obtenidos de la prueba de ordenamiento simple realizada a los seis meses. Los panelistas determinaron que la muestra con sabor menos rancio fue la de 5 ppm de ácido ascórbico, seguida del tratamiento de 50,000 ppm de ácido ascórbico. El tratamiento de 500 ppm de ácido ascórbico resultó ser la muestra más rancia.

Tabla 14. Resultados de la prueba sensorial de ordenamiento simple

Muestra	Tratamiento	Suma ordenada	Grado de rancidez
B	500 ppm	43 _a	Mayor
D	Control	27 _b	↓
A	50,000 ppm	21 _{bc}	↓
C	5 ppm	19 _c	Menor

Medias de cada factor con distintos subíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$) según la prueba de Friedman.

Los resultados del panel sensorial coincidieron con los resultados obtenidos de la prueba de cuantificación de hexanal ya que ambas pruebas indican que tanto el tratamiento con 5 ppm como el tratamiento de 50,000 ppm tuvieron un efecto antioxidante en los filetes. Hexanal es un aldehído que tiene un sabor característico descrito como “fatty-green”. Por esta razón se presume que las muestras con mayor producción de hexanal (500 ppm y control) tuvieran un sabor rancio más pronunciado. Algunos panelistas hicieron referencia a que las muestras de 5 ppm, 50,000 ppm de ácido ascórbico y el control eran muy similares, mientras que otros hicieron referencias a que todas las muestras eran muy parecidas en sabor y se diferenciaban en la textura.

El tratamiento de 500 ppm, determinado como el más rancio, tuvo una producción de aldehídos menor comparado con otros tratamientos, pero una mayor producción de cetonas y alcoholes. A pesar de que este tratamiento alcanzó una mayor producción de hexanal al cuarto mes, su producción disminuyó al sexto mes. Al observar los resultados para el tratamiento de 50,000 ppm de las pruebas de ácido tiobarbitúrico (TBA) (figura 9), hexanal (figura 10) y la caracterización de compuestos volátiles (tabla 13), estos resultados coinciden con el panel sensorial, ya que determinan que este tratamiento desarrolló menor rancidez al sexto mes de

almacenamiento. En la investigación de Vargas (2001), se reporta que para el sexto mes de almacenamiento congelado de tilapia, el análisis sensorial determinó que los panelistas no encontraron diferencias entre las muestras con 5% de ácido ascórbico (50,000 ppm) y el control. En la tabla 14 demuestra que los resultados siguen el mismo patrón ya que no hay diferencias entre el tratamiento de 50,000 ppm y el control. Arvelaiz y Kodaira (1996) evaluaron sensorialmente la estabilidad de la tilapia en almacenamiento congelado a -10°C y -30°C durante 6 meses. En dicha investigación se reporta que los parámetros sensoriales como: sabor, textura, olor y rancidez permanecieron inalterables catalogando el pescado cocido de “bueno a muy bueno”.

En general, los panelistas determinaron que tanto el control como el tratamiento de 500 ppm de ácido ascórbico resultaron con un sabor más pronunciado de rancidez. Por otro lado, las muestras de 50,000 ppm y 5 ppm resultaron con sabores similares. Los tratamientos de 5 ppm y 50,000 ppm (5%) de ácido ascórbico en tilapia son aceptables en términos sensoriales para preservar la calidad y evitar el desarrollo de rancidez luego de seis meses de congelación. Se presume que debido al bajo contenido de grasa en el pescado, el sabor rancio no se produzca en los niveles de detección necesarios para determinar el grado de diferencia en rancidez mediante un análisis sensorial.

5 CONCLUSIÓN

En esta investigación se establecieron tres objetivos principales. El primero fue determinar el si hay o no desarrollo de rancidez en tilapia y el grado de desarrollo durante seis meses de almacenamiento a -18°C (condiciones de almacenamiento caseras). Los resultados de la prueba de ácido tiobarbitúrico (TBA), cuantificación de hexanal y composición de lípidos muestran que la rancidez oxidativa desarrollada durante el almacenamiento es mínima y no afecta la calidad del pescado. Esto sugiere que no hay una necesidad de utilizar antioxidantes para extender el largo de vida de la tilapia congelada a -18°C .

Como segundo objetivo se estableció el estudiar el efecto antioxidante o prooxidante del ácido L-ascórbico añadido en diferentes concentraciones, en el desarrollo de rancidez oxidativa en filetes de tilapia congelados. La prueba de TBA sugirió que una alta concentración de ácido ascórbico (50,000 ppm) tiene un efecto antioxidante en el pescado pero no determinó un efecto prooxidante en ninguno de los tratamientos. La composición de lípidos se mantuvo constante en todos los tratamientos durante el proceso de congelación por lo que no se detecta mediante la prueba algún efecto de los tratamientos en la oxidación de lípidos. El promedio obtenido del contenido de hexanal en los tratamientos sugiere que tanto el tratamiento de 5 ppm como 50,000 ppm de ácido ascórbico tienen efectos antioxidantes en el pescado. La caracterización de volátiles mediante microextracción de fase sólida demuestra que hubo un efecto antioxidante en alta concentración (50,000 ppm) ya que hubo menos producción de volátiles específicamente hasta el cuarto mes de almacenamiento. El panel sensorial sugirió que no hay diferencias en sabor entre las muestras con menor (5 ppm) y mayor (50,000 ppm) concentración de ácido ascórbico y que las muestras del control sufrieron de mayor rancidez.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el grado de rancidez desarrollado a través del tiempo de almacenamiento fue poco, lo que causó dificultad para ser diferenciado mediante las pruebas químicas y sensoriales realizadas. Se presume que esto se debe mayormente al bajo contenido de lípidos de la tilapia. Sin embargo, se pudo concluir que el menor desarrollo de rancidez lo obtuvieron los filetes con alto contenido de ácido L-ascórbico. No se observó ningún efecto prooxidante de ninguno de los tratamientos.

Finalmente, el tercer objetivo era determinar la aceptabilidad del consumidor al producto luego de seis meses de almacenamiento y observar si hay diferencias significativas en el sabor de los filetes con los diferentes tratamientos y control. En general el resultado del panel sensorial sugirió que hay aceptabilidad del consumidor al producto luego de seis meses. Al evaluar la respuesta del panel, no es necesario en uso de antioxidante en tilapia ya que el tratamiento control fue aceptable al final del período de almacenamiento.

6 RECOMENDACIONES

Recomendaciones para investigaciones futuras:

1. Aumentar la temperatura de almacenamiento, en un rango de -18°C a -26°C , de la tilapia con el fin de aumentar el grado de rancidez oxidativa a niveles detectables.
2. Modificar el método de composición de lípidos por cromatografía de gas de modo que se puedan cuantificar analíticamente los ácidos grasos y determinar tendencias de oxidación claramente.
3. Utilizar otros antioxidantes para comparar su efecto con el obtenido con el ácido ascórbico.
4. Sumergir los filetes correspondientes al tratamiento control en el agua utilizada para preparar las soluciones de ácido ascórbico para los otros tratamientos, con el fin de determinar si el proceso de inmersión tiene algún efecto en la oxidación de los lípidos.

Recomendaciones para la industria:

1. No es necesario el uso de ácido L-ascórbico (vitamina C) para minimizar el desarrollo de rancidez oxidativa en la tilapia congelada por seis meses a -18°C .

7 BIBLIOGRAFÍA

- Ackman, R. G. y W. N. N. Ratnayake. 1992. Non-enzymatic Oxidation of Seafood Lipids. En: G. J. Flick y R. E. Martin (eds.). *Advances in Seafood Biochemistry: Composition and Quality*. Technomic Publishing Company, Inc., Pennsylvania.
- Ackman, R. G. 1994. Seafood lipids. En: F. Shahidi y J. R. Botta (eds.). *Seafoods: Chemistry, Processing, Technology and Quality*. Blackie Academic & Professional, Galsglow.
- Acworth, I. N. y B. Bailey. 1995. *The Handbook of Oxidative Metabolism*. ESA, Inc.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. Association of Oficial Analytical Chemists, Washigton, D.C.
- Arveláiz, P. V. y M. Kodaira. 1996. Evaluación de la estabilidad lipídica y proteica de la tilapia (*Oreochromis* híbrido) durante su almacenamiento congelado. <http://www.postgrado.ucv.ve/biblioteca/tesis.asp?id=TCi438&fecha=3>. Visitada en noviembre, 2005.
- Botta, J. R. 1995. *Evaluation of Seafood Freshness Quality*. VCH Publishers, Inc., New York.
- Brannan, R. G. y M. C. Erickson. 1996. Quantification of Antioxidants in Channel Catfish During Frozen Storage. *J. Agric. Food Chem.* 44(6): 1361-1366.
- Code of Federal Regulations. 2003. 21 CFR 182.3013. <http://www.gpoaccess.gov/cfr/index.html>. Visitada en noviembre, 2005.
- Cort, W. M. 1982. Antioxidant Properties of Ascorbic Acid in Foods. En: P.A. Seib y B. M. Tolbert (eds.). *Advances in Chemistry Series, Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses*. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Decker, E. A. y H. O. Hultin. 1990a. Factors Influencing Catalysis of Lipid Oxidation by the Soluble Fraction of Mackerel Muscle. *J. Food Sci.* 55(4): 947-950.

- Decker, E. A. y H. O. Hultin. 1990b. Nonenzymic Catalysis of Lipid Oxidation in Mackerel Ordinary Muscle. *J. Food Sci.* 55(4): 951-953.
- Decker, E. A. y H. O. Hultin. 1992. Lipid Oxidation in Muscle Foods via Redox Iron. En: A. J. St. Angelo (ed.). *Lipid Oxidation in Food*. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Deng, J. C., R. F. Matthews y C. M. Watson. 1977. Effect of Chemical and Physical Treatments on Rancidity Development of Frozen Mullet (*Mugil cephalus*) Fillets. *J. Food Sci.* 42(2): 344-347.
- Deng, J. C., Watson M., Bates R. P. y E. Schroeder. 1978. Ascorbic Acid as an Antioxidant in Fish Flesh and its Degradation. *J. Food Sci.* 43: 457-460.
- Dumm, T. D. y A. M. Spanier. 1991. Changes in the Content of Lipid Autoxidation and Sulfur – Containing Compounds in Cooked Beef during Storage. *J. Agric. Food Chem.* 39 (2): 336-343.
- Erickson, M. 1993. Compositional Parameters and Their Relationship to Oxidative Stability of Channel Catfish. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1213-1218.
- Eskin, N.A.M. y R. Przybylski. 2000. Antioxidants and Shelf Life of Foods. En: N. A. M. Eskin y D. S. Robinson (eds.). *Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical and Microbiological Changes*. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Fennema, O. R. 1996. *Food Chemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Flick, G. J., Gi-Pyo H. y G. M. Knobl. 1992. Lipid Oxidation of Seafood During Storage. En: A. J. St. Angelo (ed.). *Lipid Oxidation in Food*. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Foegeding, E. A., Lanier, T. C. y H.O. Hultin. 1996. Characteristics of Edible Muscle Tissues. En: O. R. Fennema (ed.). *Food Chemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Gordon, D. T. y V. Ratliff. 1992. The Implications of Omega 3 Fatty Acids in Human Health. En: G. J. Flick y R. E. Martin (eds.). *Advances in Seafood Biochemistry: Composition and Quality*. Technomic Publishing Company, Inc., Pennsylvania.

- Gray, J. I., A. M. Pearson y F. J. Monahan. 1994. Flavor and Aroma Problems and Their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products. En: Quality Attributes and Their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products. A. M. Pearson y T. R. Dutson (eds.). Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.
- Hamilton, R. J. 1999. The Chemistry of Rancidity in Foods. En: J. C. Allen y J. H. Hamilton (eds.). Rancidity in Foods. Aspen Publishers, Inc., Maryland.
- Harris, P. y J. Tall. 1999. Rancidity in Fish. En: J. C. Allen y J. H. Hamilton (eds.). Rancidity in Foods. Aspen Publishers, Inc., Maryland.
- Ho, C.T. y Q. Chen. 1994. Lipids in Food Flavors. En: C. T. Ho y T. G. Thomas (eds.). Lipids in Food Flavors. American Chemical Society, Washington, D. C.
- Högnadóttir, Á. 1999. Flavor Perception and Volatile Compounds in Fish. M.S. University of Iceland.
- Hultin, H. O. 1992. Lipid Oxidation in Fish Muscle. En: G. J. Flick y R. E. Martin (eds.). Advances in Seafood Biochemistry: Composition and Quality. Technomic Publishing Company, Inc., Pennsylvania.
- Hultin, H. O. 1994. Oxidation of Lipids in Seafoods. En: F. Shahidi y J. R. Botta (eds.). Seafoods: Chemistry, Processing, Technology and Quality. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Joslyn, M. A. 1970. Methods in Food Analysis: Physical, Chemical and Instrumental Methods of Analysis. Academic Press, Inc., New York.
- Kanner, J., S. Harel y B. Hazan. 1986. Muscle Membranal Lipid Peroxidation by an "Iron Redox Cycle" System: Initiation by Oxy Radicals and Site-Specific Mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 34: 506-510.
- Karahadian, C. y R. C. Lindsay. 1989. Role of Oxidative Processes in the Formation and Stability of Fish Flavors. En: Flavor Chemistry: Trends and Developments. M. J. Comstock (ed.). American Chemical Society, Washington, D. C.
- Lindsay, R. C. Flavor of Fish. 1994. En: Seafoods: Chemistry, Processing, Technology and Quality. F. Shahidi y J. R. Botta (eds.). Blackie Academic & Professional, Glasgow.

- Lupton, J. R. y H. R. Cross. 1994. The Contributions of the Meat, Poultry and Fish to the Health and Well Being of Man. En: Quality Attributes and Their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products. A. M. Pearson y T. R. Dutson (eds.). Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.
- Meilgaard, M., G. V. Civille y B. Thomas. 1999. Sensory Evaluation Techniques. CRC Press, New York
- Nettleton, J. A. y J. Exler. 1992. Nutrients in Wild and Farmed Fish and Shellfish. *J. Food Sci.* 57(2): 257-260.
- Pachala, L. A. y D. L. Reynolds. 1985. Review of Ascorbic Acid Methodology. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68(1): 1-12.
- Pawliszyn, J. 1999. Quantitative Aspects of SPME. En: J. Pawliszyn (ed.). Applications of Solid Phase Microextraction. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Pike, O. A. 2003. Fat Characterization. En: S. S. Nielsen (ed.). Food Analysis, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Pullin, R.S.V., y R. H. Lowe. 1982. The Biology and Culture of Tilapias. ICLARM. Manila, Philippines.
- Reineccius, G. A. 2003. Gas Chromatography. En: S. S. Nielsen (ed.). Food Analysis, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Rounds, M. A. y J. F. Gregory. 2003. High Performance Liquid Chromatography. En: S. S. Nielsen (ed.). Food Analysis, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Santana, V. 1989. Evaluación química y microbiológica de la Tilapia nilotica ahumada y almacenada a 2°C. Tesis MS. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R.
- Schultz, H. W. 1962. Lipids and Their Oxidation. The AVI Publishing Company, Inc., Connecticut.

- Shahidi, F. y R. B. Pegg. 1994. Hexanal as an Indicator of the Flavor Deterioration of Meat and Meat Products. En: C. T. Ho y T. G. Thomas (eds.). *Lipids in Food Flavors*. American Chemical Society, Washington, D. C.
- Sizer, F y E. Whitney. 2000. *Nutrition Concepts and Controversies*. Wadworth Thopmson Learning.
- St. Angelo, A. J., A. M. Spanier y K. L. Bett. 1992. Chemical and Sensory Evaluation of Flavor in Untreated and Antioxidant-Treated Meat. En: A. J. St. Angelo (ed.). *Lipid Oxidation in Food*. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Thompson, L. U. y O. Fennema. 1971. Effect of Freezing on Oxidation of L-Ascorbic Acid. *J. Agr. Food. Chem.* 19:121-124.
- Vargas, K. M. 2001. 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.
- Vercellotti, J. R., A. J. St. Angelo y A. M. Spanier. 1992. Lipid Oxidation in Foods: an Overview. En: A. J. St. Angelo (ed.). *Lipid Oxidation in Food*. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Zang, H. y Lee, T. 1997. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Volatile Flavor Compounds in Mackerel for Assessment of Fish Quality. En: F. Shahidi y K. R. Cadwallader (eds.). *Flavor and Lipid Chemistry of Seafoods*. American Chemical Society, Washington, DC.

8 APÉNDICE

Tabla 15. Por ciento de ácidos grasos caracterizados en tilapia (*Oreochromis niloticus*) en tratamientos con ácido ascórbico (vitamina C) y control mediante GC/MS

50,000 ppm de ácido ascórbico (5%)							
Ácido Graso Identificado	Mes de almacenamiento¹						
	0	1	2	3	4	5	6
ácido tetraenoico (14:0)	1.53	2.27	2.15	1.58	0.91	0.61	0.85
ácido -9-hexadecenoico (16:1)	2.51	2.78	3.47	2.58	4.06	2.14	1.42
ácido-11-hexadecenoico							
ácido hexadecanoico (16:0)	38.97	34.44	34.11	32.90	30.68	33.79	36.07
ácido -9, 12- octadecadienoico (18:2)	8.78	11.19	11.54	11.72	12.49	4.38	11.73
ácido -9- octadecenoico (18:1)	10.94	6.54	11.17	6.12	6.54	11.08	14.54
ácido -6- octadecenoico (18:1)	0.00	18.82	7.64	6.37	9.60	5.83	1.66
ácido -11- octadecenoico (18:1)	5.02		0.69		0.52		
ácido octadecanoico (18:0)	6.82	2.99	5.43	7.35	5.57	7.10	6.86
ácido -5, 8, 11, 14, 17- eicosapentaenoico (EPA, 20:5)	6.07	4.61	5.13	10.12	7.56	7.14	7.33
ácido -7, 10, 13- eicosatrienoico (20:3)	0.76	1.17	1.15	1.84	1.45	1.56	1.16
ácido -11, 14, 17- eicosatrienoico (20:3)							
ácido -4, 7, 10, 13, 16, 19 - docosaheptaenoico (DHA, 20:6)	7.22	3.36	7.12	7.77	6.96	5.98	7.09

500 ppm de ácido ascórbico							
Ácido Graso Identificado	Mes de almacenamiento¹						
	0	1	2	3	4	5	6
ácido tetraenoico (14:0)	1.73	2.69	1.62	1.22	0.61	0.33	1.46
ácido -9-hexadecenoico (16:1)	3.32	4.44	2.81	3.45	2.55	2.63	3.11
ácido-11-hexadecenoico							
ácido hexadecanoico (16:0)	34.34	38.82	32.31	34.18	33.11	34.45	28.49
ácido -9, 12- octadecadienoico (18:2)	11.89	12.71	10.70	13.39	14.66	13.09	15.88
ácido -9- octadecenoico (18:1)	19.65	6.62	13.87	9.96	16.22	0.80	24.27
ácido -6- octadecenoico (18:1)		14.27	0.67	18.64		20.17	2.35
ácido -11- octadecenoico (18:1)	2.10	0.77	0.52				
ácido octadecanoico (18:0)	5.07	4.15	4.86	5.24	4.46	5.70	4.52
ácido -5, 8, 11, 14, 17- eicosapentaenoico (EPA, 20:5)	4.65	3.84	5.10	4.21	7.74	7.29	4.78
ácido -7, 10, 13- eicosatrienoico (20:3)	0.85	0.23	0.69	0.42	0.80	0.50	0.26
ácido -11, 14, 17- eicosatrienoico (20:3)							
ácido -4, 7, 10, 13, 16, 19 - docosaheptaenoico (DHA, 20:6)	4.71	3.81	5.27	3.98	8.96	6.21	6.21

5 ppm de ácido ascórbico

Ácido Graso Identificado	Mes de almacenamiento ¹						
	0	1	2	3	4	5	6
ácido tetraenoico (14:0)	1.54	1.61	1.80	0.94	1.16	0.43	0.93
ácido 9-hexadecenoico (16:1)	3.14	2.08	3.00	0.40	1.79	2.85	1.85
ácido 11-hexadecenoico					1.22		
ácido hexadecanoico (16:0)	40.51	32.09	33.16	26.84	33.73	30.64	28.27
ácido 9, 12- octadecadienoico (18:2)	9.92	10.81	12.52	14.52	14.16	13.44	12.27
ácido 9- octadecenoico (18:1)	13.50	13.85	7.88	17.87	7.26	5.21	10.01
ácido 6- octadecenoico (18:1)	6.73	0.79	5.32		6.94	12.65	6.36
ácido 11- octadecenoico (18:1)		0.86	3.67	1.90	6.02		1.21
ácido octadecanoico (18:0)	6.76	5.77	4.98	8.85	3.97	6.23	6.47
ácido 5, 8, 11, 14, 17- eicosapentaenoico (EPA, 20:5)	4.19	8.43	6.42	9.79	5.00	6.17	8.70
ácido 7, 10, 13- eicosatrienoico (20:3)	0.31	1.50	0.45		1.08	0.41	1.38
ácido 11, 14, 17- eicosatrienoico (20:3)							
ácido 4, 7, 10, 13, 16, 19 - docosaheptaenoico (DHA, 20:6)	4.95	6.41	7.03	5.17	6.13	7.64	8.34

Control

Ácido Graso Identificado	Mes de almacenamiento ¹						
	0	1	2	3	4	5	6
ácido tetraenoico (14:0)	1.70	2.38	1.46	0.82	0.61		1.12
ácido 9-hexadecenoico (16:1)	2.58	2.85	2.92	1.19	1.71	3.04	2.36
ácido 11-hexadecenoico							
ácido hexadecanoico (16:0)	30.40	25.22	32.48	23.60	32.28	31.43	29.79
ácido 9, 12- octadecadienoico (18:2)	11.56	7.21	12.80	12.22	8.29	14.53	11.65
ácido 9- octadecenoico (18:1)	14.12	15.66	14.79	12.27	4.95	17.50	13.66
ácido 6- octadecenoico (18:1)	2.08		1.24	5.56	9.56		7.60
ácido 11- octadecenoico (18:1)		2.01					
ácido octadecanoico (18:0)	7.21	4.95	6.28	10.92	6.37	8.82	7.10
ácido 5, 8, 11, 14, 17- eicosapentaenoico (EPA, 20:5)	6.52	2.89	9.67	8.33	7.74	9.48	8.68
ácido 7, 10, 13- eicosatrienoico (20:3)		0.71	0.79	0.44	1.46	0.55	1.32
ácido 11, 14, 17- eicosatrienoico (20:3)							
ácido 4, 7, 10, 13, 16, 19 - docosaheptaenoico (DHA, 20:6)	7.57	3.08	8.19	4.72	9.58	6.17	6.37

¹Los ácidos grasos que no muestran un valor correspondiente en la tabla no se detectaron en esa muestra a ese tiempo de almacenamiento.

Prueba A-no-A			
Panelista: _____		Fecha: 5 de noviembre de 2004	
Tipo de muestra: Filete de tilapia			
INSTRUCCIONES:			
1. Antes de hacer la prueba familiarícese con el atributo a ser considerado durante la prueba. 2. Pruebe las muestras una a una de izquierda a derecha. 3. Luego de probar una muestra y antes de seguir con la próxima muestra debe anotar el código y su respuesta correspondiente. Además, recuerde lavar su paladar con agua o galleta y esperar un minuto para continuar con la siguiente muestra. 4. Solo se aceptan respuestas A o no-A. Si tiene algún comentario debe incluirlo en la parte inferior de esta hoja.			
MUESTRAS		La muestra es:	
Número	Código	A	no A
1	_____	☐	☐
2	_____	☐	☐
3	_____	☐	☐
Comentarios:			
¡Muchas Gracias!			

Figura 14. Hoja de panelistas para adiestramiento del panel sensorial.

PRUEBA ORDENAMIENTO SIMPLE				
Panelista: _____	Fecha: 12 de noviembre de 2005			
Tipo de muestra: Filete de Tilapia				
Característica o atributo bajo estudio: Rancidez				
INSTRUCCIONES:				
1. Observe las 4 muestras y sus respectivos códigos. Anote los códigos en la parte inferior de esta hoja en el orden que están colocados. 2. Pruebe las muestras de izquierda a derecha y note el sabor rancio de la muestra. Espere, enjuague su paladar y espere 30 segundos entre muestras. 3. Escriba el número 1 en el blanco bajo el código de la muestra de menor rancidez. Escriba el número 2 en el blanco bajo el código de la próxima muestra y así con las muestras restantes hasta el número 4 para la muestra de mayor rancidez. Puede probar las muestras la primera vez y ordenarlas preliminarmente y luego probar cautelosamente y reordenar si es necesario. 4. Si dos muestras parecen ser iguales en rancidez, adivine lo mejor que pueda. Puede hacer comentarios en la parte inferior de la hoja.				
Código	_____	_____	_____	_____
Ordenamiento	☐	☐	☐	☐
Comentarios:				

Figura 15. Hoja de panelistas para la evaluación de rancidez en filetes de tilapia por panel sensorial.

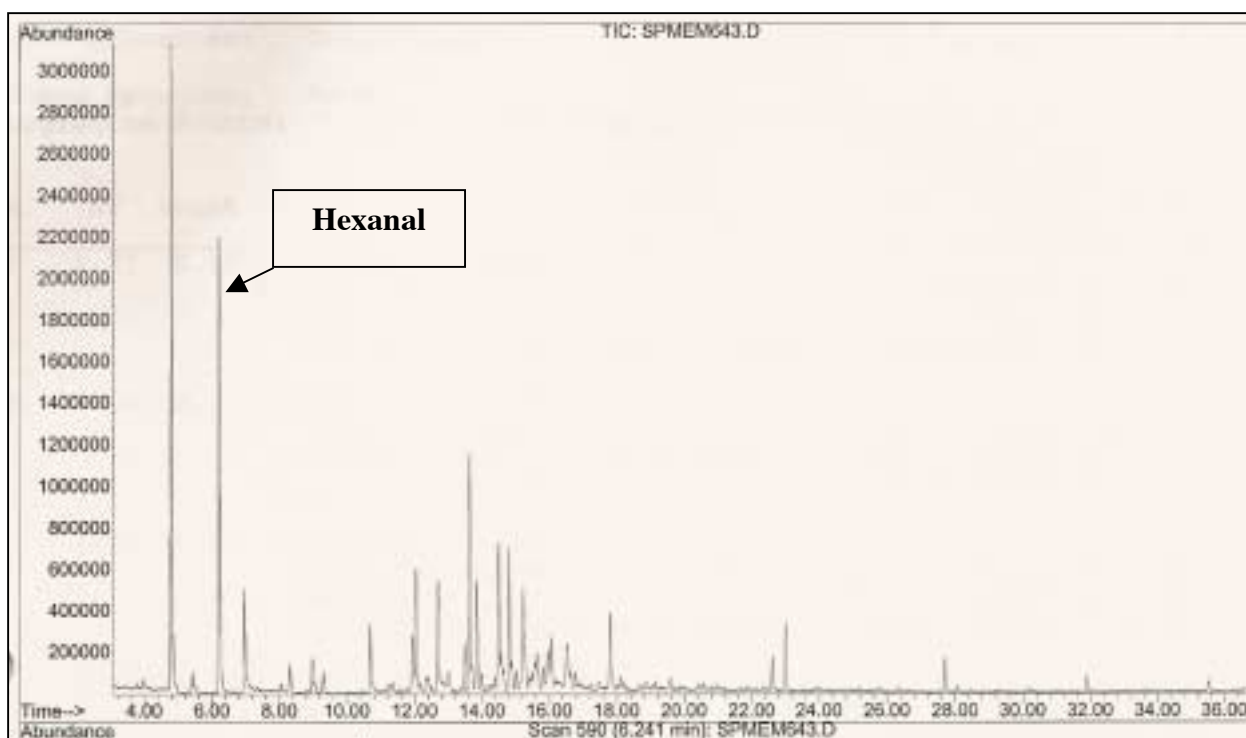
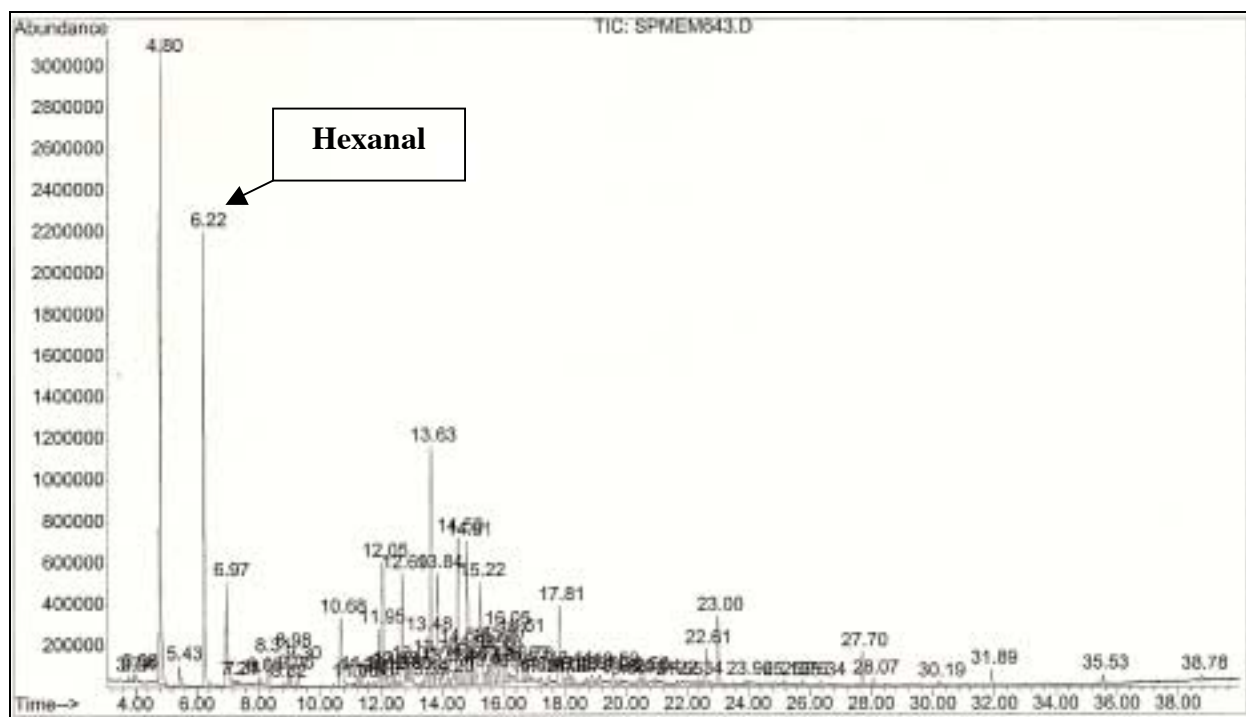


Figura 16. Cromatogramas obtenidos del análisis de hexanal y compuestos volátiles mediante SPME/GC-MS.

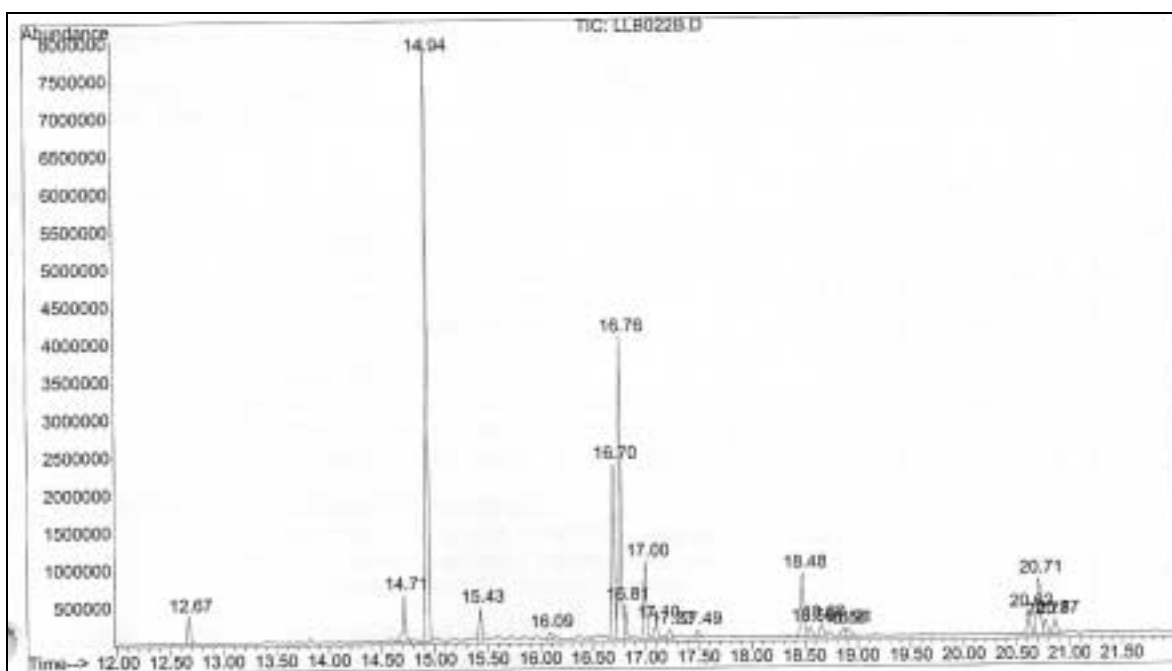
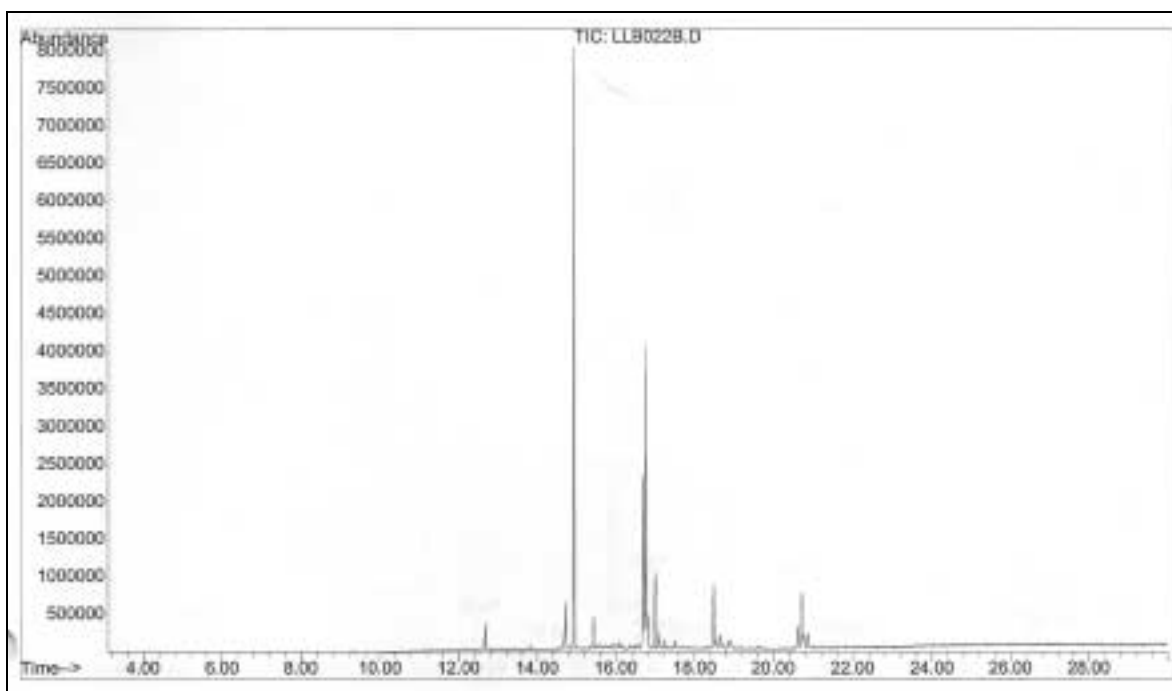


Figura 17. Cromatogramas obtenidos del análisis de composición de ácidos grasos mediante GC-MS.

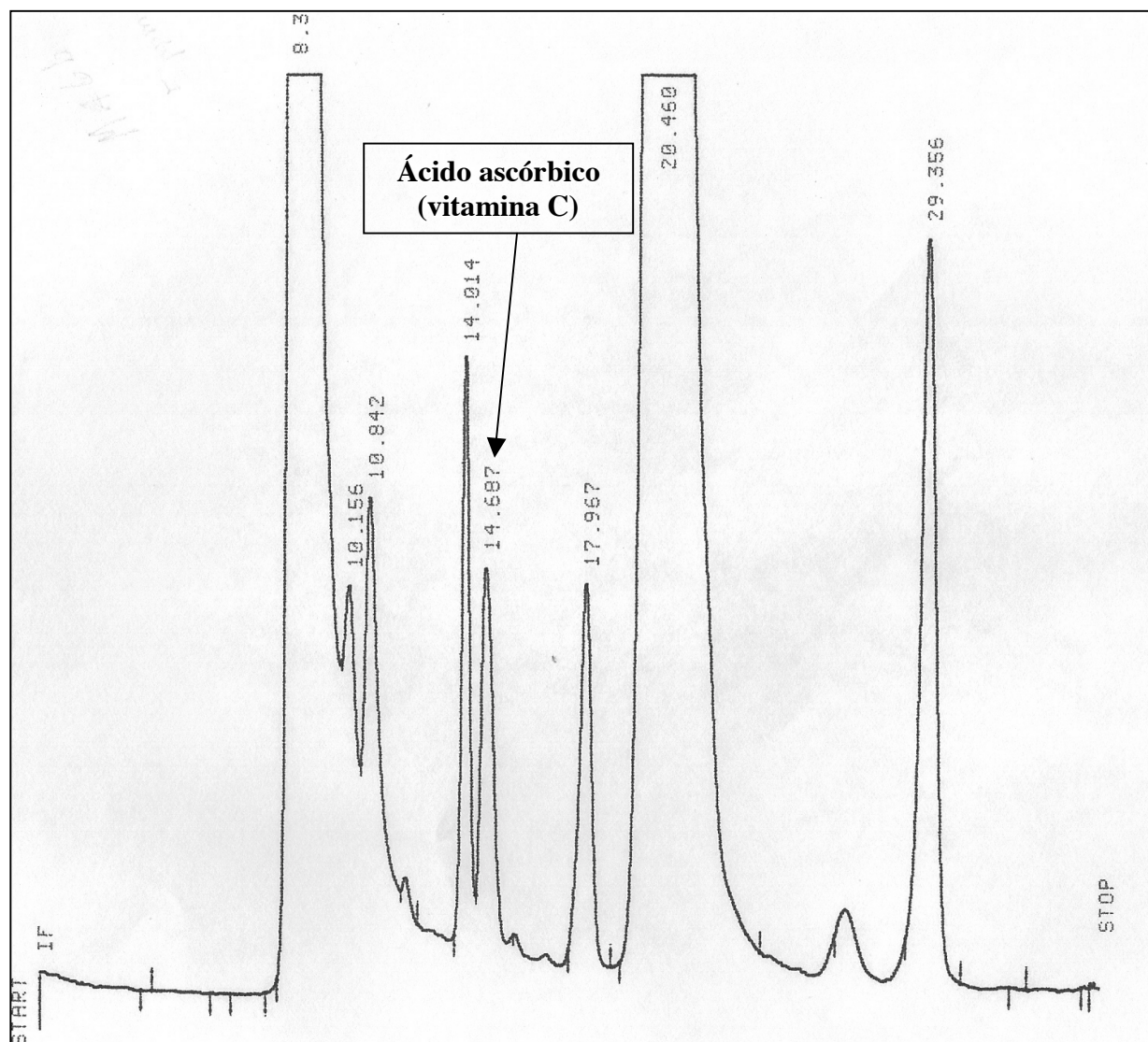


Figura 18. Cromatograma típico obtenido del análisis de contenido de ácido ascórbico (vitamina C) mediante HPLC.