

TEMA 4

INSPECCIÓN DEL PESCADO EN LONJA Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS PRODUCTOS DE LA PESCA

- Introducción.
- Inspección y control del pescado y productos de la pesca.
- Identificación de la especie.
- Evaluación del Grado de Frescura del Pescado.
- Método Índice de Calidad-Quality Index Method (QIM).
- Determinación de Nitrógeno de Trimetilamina (N-TMA).
- Prueba Colorimétrica de Nessler.
- Determinación del Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT).



Introducción

El estudio del grado de frescura y la evaluación de la calidad sanitaria es el objetivo fundamental de la inspección del pescado, antes de proceder a emitir un dictamen de aptitud para el consumo.

Inmediatamente a la captura, el pescado y los productos de la pesca deben almacenarse en refrigeración y comercializarse en hielo para mantener la calidad de los mismos. Tras la captura se inician los procesos de degradación autolítica asociados con los cambios post-mortem que tienen lugar en la musculatura. Igualmente, la flora microbiana del pescado empieza a multiplicarse aumentando la carga microbiológica y las denominadas bacterias del deterioro.

Además las manipulaciones asociadas a las operaciones de obtención del pescado y los productos de la pesca pueden producir contaminaciones posteriores, aumentando la diversidad de microorganismos pudiendo ser algunos de ellos patógenos, derivados de la manipulación. Cuanto mayor número de manipulaciones se realicen sobre el pescado y los productos de la pesca mayor es el riesgo de contaminación microbiana, por lo que se debe extremar la higiene en las distintas manipulaciones. Por ello el eviscerado, descabezado y fileteado, aunque son operaciones recomendadas en algunos casos (especies magras y que se someten a un largo transporte) para reducir la carga bacteriana del intestino y de las agallas, pueden suponer una mayor contaminación cuando no se realizan unas correctas prácticas higiénicas.

Durante la inspección se apreciara el grado de frescura y la aptitud del pescado y productos de la pesca para su consumo. Además se controlarán las tallas mínimas para evitar la captura y comercialización de peces de pequeño tamaño, no obstante las competencias para retirar partidas de pescado que no cumplan los criterios de talla mínimas establecidos por el FROM depende del SEPRONA y no de los inspectores sanitarios (consulta de tallas mínimas en las especies de pescado comercializadas en España, <http://www.um.es/nutbro/hica/>).



La talla mínima de cada una de las especies de pescado o productos de la pesca se determina mediante la medida desde el extremo anterior al posterior tal y como se indica en la Figura anterior. La talla mínima para el atún rojo aparece recogida en la siguiente imagen y viene determinada por la longitud en centímetros o por el peso.



Talla mínima atún rojo (imagen tomada del FROM)



Talla mínima de la cherna (imagen tomada del FROM)

Inspección y control del pescado y productos de la pesca

El procedimiento de control oficial del pescado y de los productos de la pesca están recogidos en el Reglamento 854/2004 *por el que se establecen las normas específicas para la organización de los controles oficiales de los productos de origen animal para consumo*. En el Anexo II se muestran los aspectos relativos a los moluscos bivalvos y el Anexo III hace referencia a controles oficiales de los productos de la pesca, <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0206:0320:ES:PDF>.

Los exámenes y controles oficiales incluirán la evaluación organoléptica del grado de frescura en todas las fases de producción, transformación y distribución. Durante la inspección el veterinario evaluará la calidad y el grado de frescura de acuerdo a los criterios de de frescura de la

legislación comunitaria. En general, se puede detectar un patrón característico del deterioro del pescado almacenado en hielo en las diferentes fases (producción, transformación y distribución) que se puede dividir en las cuatro fases siguientes:

Fase 1: El pescado está muy fresco y tiene un sabor a algas marinas, dulce y delicado. En algunas especies el sabor dulce (merluza, merlán, lenguado y bacalao) se hace más intenso a los 2-3 días.

Fase 2: Hay una pérdida del olor y del gusto característico. La carne es neutral pero no tiene olores extraños. La textura se mantiene agradable.

Fase 3: Aparecen signos de deterioro y se empiezan a formar compuestos volátiles nitrogenados de olor desagradable, como la trimetilamina (N-TMA) y el amoníaco, derivados de la actividad bacteriana. En esta fase aparecen olores y sabores ligeramente ácidos, afrutados y ligeramente amargos, especialmente en los pescados grasos. En los últimos estadios de esta fase se desarrollan olores nauseabundos, dulces como a col, amoniacales, sulfurosos y rancios. La textura se vuelve suave y aguada, o dura y seca.

Fase 4: El pescado puede caracterizarse como deteriorado y pútrido.

Cuando los exámenes organolépticos susciten dudas sobre el grado de frescura de los productos de la pesca, podrán tomarse muestras para realizar exámenes complementarios en el laboratorio. Entre los análisis químicos que ayudan a determinar el grado de frescura y conocer el grado de deterioro del pescado tenemos la determinación de Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT), de amoníaco y de nitrógeno de trimetilamina (N-TMA).

Además, en aquellos casos en los que se sospeche que los productos de la pesca pueden afectar a aspectos de seguridad alimentaria pudiendo comprometer la salud humana, se tomarán muestras para realizar los análisis complementarios que se consideren oportunos como son:

- Análisis microbiológicos (coliformes, enterobacterias, *Clostridium botulinum* tipo E, microorganismos específicos del deterioro, etc...).
- Determinaciones físicas (pH, conductividad eléctrica, textura etc....).
- Contenido de histamina.
- Residuos y Contaminantes (p.e. metales pesados, PCB etc...).
- Determinación de la presentación de parásitos (Anisakis, Antocephalus etc...).

Durante el control oficial de los productos de la pesca se deben realizar pruebas para garantizar que no se comercialicen los siguientes productos que son tóxicos:

- Productos de la pesca con biotoxinas marinas como la ciguatoxina u otras toxinas peligrosas para la salud humana.
- Peces tóxicos y venenosos de las familias: *Tetraodontidae*, *Molidae*, *Diodontidae* y *Canthigasteridae*.



Requisitos de higiene para productos de la pesca

Los requisitos de higiene para el pescado fresco y productos de la pesca se recogen en el Reglamento 853/2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:ES:PDF>.

En la Sección VII se describen los requisitos de higiene para la obtención, depuración y comercialización de los moluscos bivalvos vivos, y en la Sección VIII los relativos a los demás productos de la pesca, incluyendo el pescado fresco.

La legislación establece de forma específica medidas y actuaciones sanitarias a seguir en relación a la evaluación de las características organolépticas, niveles de histamina, nitrógeno básico volátil total, presencia de parásitos y presencia de biotoxinas y tóxicos naturales en determinadas familias (*Tetraodontidae*, *Molidae*, *Diodontidae* y *Canthigasteridae*).



Decisiones a raíz de los controles oficiales

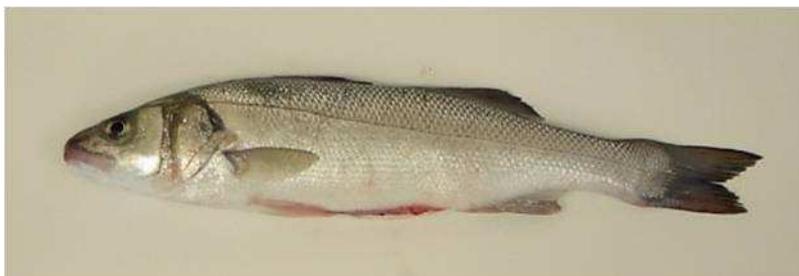
Los productos de la pesca serán declarados no aptos para el consumo cuando:

- ✓ Los exámenes organolépticos, químicos, físicos, microbiológicos o de parásitos han mostrado que no cumplen la legislación comunitaria pertinente.
- ✓ Sus partes comestibles contienen agentes contaminantes o residuos en cantidades superiores a los límites establecidos en la legislación o en cantidades tales que su consumo supere la ingesta diaria admisible para el hombre.
- ✓ Los peces sean venenosos.
- ✓ Los productos de la pesca presenten biotoxinas marinas.
- ✓ Cuando la autoridad competente considere que puede entrañar un riesgo para la salud pública o animal, por cualquier otra razón, o no ser aptos para el consumo.

IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE

Los pescados y productos derivados de la pesca destinados a consumo humano deben exponerse a la venta con su nombre comercial y con su nombre científico, que identifica la familia y especie a la que pertenece. Generalmente, las denominaciones del pescado utilizadas comercialmente pueden variar de una región a otra, por lo que es necesario siempre hacer mención expresa al nombre científico para evitar equivocaciones y errores.

El veterinario oficial durante su labor de inspección controlará que las partidas de pescado y moluscos lleven el nombre científico correcto acompañando en todo momento al nombre comercial, con el objeto de que no se produzcan fraudes.



Lubina (Dicentrarchus labrax)

La información relativa a los nombres comerciales y científico de las especies de pescado y productos de la pesca frecuentemente comercializadas en España se pueden consultar en la página web del grupo de investigación y de la asignatura de Higiene, inspección y Control Alimentario <http://www.um.es/nutbro/hica/>. La información se presenta del siguiente modo:

- Características generales para identificación del pescado.
- Lophidos y Gádidos.
- Escoftálmidos (peces planos).
- Serránidos.
- Spáridos.
- Múlidos, Esciénidos y Carangidos.
- Escómbridos, escomberesóscidos y túnidos.
- Mugílidos y Cupléidos.
- Salmoniformes y Ápodos.
- Elasmobranquios.



Salmonete (imagen tomada del FROM)

EVALUACIÓN DEL GRADO DE FRESCURA

Introducción

La comprobación organoléptica de la frescura supone determinar el grado de desarrollo alcanzado por los cambios post-mortem en el pescado y crustáceos haciendo uso de los sentidos del olfato, vista y tacto, y aplicando un código que contiene los requerimientos mínimos y frecuentemente los criterios característicos de cada categoría de calidad. Los grados de calidad utilizados para llevar a cabo la inspección del pescado fresco se basa en el método de "Evaluación de la calidad del Servicio de Inspección en Lonja y en la industria pesquera". Es un modelo europeo introducido en la Decisión del Consejo nº 103/76, que clasifica el pescado en tres niveles de calidad: categoría extra, A y B. El esquema de la EU es comúnmente aceptado en los países de la Unión Europea para la evaluación sensorial, aunque existen algunas discrepancias

en el sistema, ya que no toma en consideración las diferencias por especies sino que utiliza la clasificación de pescado blanco (< 5% de grasa en el músculo) y pescado azul (> 5% de grasa en músculo).

Los límites de categorías no coinciden exactamente con etapas de frescura. La primera categoría incluye por lo general al pescado muy fresco y aquellos pescados de frescura reducida, pero sin ningún signo de deterioro. La categoría del pescado apto para la venta comprende los alimentos marinos que exhiben los primeros signos de alteración. Tampoco están definidos con claridad los límites para el decomiso, por lo que existe cierta dificultad en lo que respecta a la diferenciación sensorial entre pescado fresco y pescado menos fresco. Un análisis sensorial correcto es tan difícil como cualquier otra prueba de laboratorio. Exige de disponer de un equipo de varias personas entrenadas durante varias semanas.

Factores mínimos de calidad

Los pescados deben ser sanos y reunir las condiciones mínimas de calidad, que serán apreciadas por las siguientes características organolépticas.

- a) Su pigmentación cutánea y el aspecto del "mucus" superficial.
- b) La apariencia de los ojos y su coloración.
- c) El color y el olor de las branquias.
- d) El estado de rigidez muscular, apreciada a nivel de los músculos dorsales y abdominales.
- e) Aspecto del peritoneo y adherencia con los tejidos subyacentes.

El pescado fresco o refrigerado debe mantenerse a temperatura óptima de almacenamiento, desde su captura hasta su distribución, que será ligeramente superior a su punto de congelación, manteniéndose en las condiciones de temperatura y humedad relativa necesarias para que no pierda peso ni se altere dentro del período normal de comercialización.



Dorada (Sparus aurata)

Clasificación comercial

Según el grado de frescura, se clasificarán en cuatro categorías, en base a los caracteres siguientes:

Cada lote debe ser homogéneo en cuanto a su grado de frescura; en caso contrario, será clasificado en la categoría de frescura más baja que esté representada

PESCADO BLANCO	Criterios			
	Categoría de frescura			No admitidos
	Extra	A	B	
Piel	Pigmento vivo y tornasolado (excepto gallineta) u opalescente; sin decoloración	Pigmentación viva pero sin brillo	Pigmentación en fase de decoloración apagada	Pigmentación apagada
Mucosidad cutánea	Acuosa, transparente	Ligeramente turbia	Lechosa	Gris amarillenta, opaca
Ojo	Convexo, pupila negra y brillante	Convexo, ligeramente hundido; pupila negra apagada; córnea ligeramente opalescente	Plano; córnea opalescente; pupila opaca	Cóncavo en el centro, pupila gris; córnea lechosa
Branquias	Color vivo; sin mucosidad	Menos coloreadas, mucosidad transparente	Color marrón/gris decolorándose; mucosidad opaca y espesa	Amarillentas; mucosidad lechosa
Peritoneo (en el pescado eviscerado)	Liso; brillante; difícil de separar de la carne	Un poco apagado; puede separarse de la carne	Grumoso; fácil de separar de la carne	No adherente
Olor de las branquias y de la cavidad abdominal -pescado blanco excepto platija -platija	Algas marinas A aceite fresco; a pimienta; olor a tierra	Ausencia de olor a algas, olor neutro A aceite; a algas marinas o ligeramente dulzón	Fermentado; ligeramente agrio A aceite; fermentado, mohoso, un poco rancio	Agrio Agrio

Carne	Firme y elástica; superficie lisa	Menos elástica	Ligeramente blanda (flácida), menos elástica; superficie cérea (aterciopelada) y opaca	Blanda (flácida); las escamas se desprenden fácilmente de la piel, superficie algo arrugada
-------	-----------------------------------	----------------	--	---

PESCADO AZUL	Criterios			
	Categoría de frescura			No admitidos
	Extra	A	B	
Piel	Pigmentación tornasolada, colores vivos y brillantes con irisaciones; clara diferencia entre superficie dorsal y ventral	Pérdida de resplandor y de brillo; colores más apagados; menor diferencia entre superficie dorsal y ventral	Apagada, sin brillo, colores diluidos; piel doblada cuando se curva el pez	Pigmentación muy apagada; la piel se desprende de la carne
Mucosidad cutánea	Acuosa, transparente	Ligeramente turbia	Lechosa	Gris amarillenta, opaca
Consistencia de la carne	Muy firme, rígida	Bastante rígida, firme	Un poco blanda	Blanda (flácida)
Opérculos	Plateados	Plateados, ligeramente teñidos de rojo o marrón	Parduzcos y con extravasaciones sanguíneas amplias	Amarillentos
Ojo	Convexo, abombado; pupila azul negruzca brillante, párpado transparente	Convexo y ligeramente hundido; pupila oscura; córnea ligeramente opalescente	Plano; pupila borrosa; extravasaciones sanguíneas alrededor del ojo	Cóncavo en el centro; pupila gris; córnea lechosa
Branquias	Color rojo vivo a púrpura uniforme; sin mucosidad	Color menos vivo, más pálido en los bordes; mucosidad transparente	Engrosándose y decolorándose; mucosidad opaca	Amarillentas; mucosidad lechosa
Olor de las branquias	Frescos, a algas marinas; picante; a yodo	Ausencia de olor a algas; olor neutro	Olor graso un poco sulfuroso, a tocino rancio o fruta descompuesta	Agrio descompuesto

Además durante la determinación del grado de frescura habrá que cumplir los criterios de tallas mínimas de las especies, ya que la captura de pescado con una talla inferior supone una infracción, tanto para los pescadores como para los otros operadores de la cadena alimentaria (mayoristas, minoristas etc...). Consultar información de tallas mínimas en la página web de la asignatura de Higiene, Inspección y Control Alimentario <http://www.um.es/nutbro/hica/>.

MÉTODO ÍNDICE DE CALIDAD-QUALITY INDEX METHOD (QIM)

Quality Index Method (QIM) en castellano Método del Índice de Calidad (<http://www.qim-eurofish.com/>) es un método objetivo para medir el grado de frescura del pescado de acuerdo a las características organolépticas del mismo. Este método fue desarrollado originariamente en el Instituto de Investigación de Alimentos de Tasmania. Posteriormente, ha sido estudiado por muchos centros y desarrollado para muchas especies de pescado fresco, procesado y derivados de la pesca, gracias a los estudios de intercolaboración de distintos institutos europeos y a nivel mundial.

Este método es seguro, objetivo y eficaz, y permite su aplicación a lo largo de toda la cadena alimentaria, asegurando de este modo el índice de frescura del pescado. Aunque todavía no ha sido establecido como método oficial, constituye un método de referencia en toda la UE para determinar la calidad del pescado de acuerdo a su grado de frescura, ya que utiliza un modelo para cada especie.

A continuación se describe el método aplicado al salmón. Un juez entrenado en el método QIM evalúa las características organolépticas y da una puntuación de 0 a 3 a cada uno de los atributos que se consideran importantes en la evaluación de la calidad. Se toman tres peces por lote para reducir las variaciones naturales y se toma el valor. Los diferentes atributos se valoran en grados deméritos dando una máxima puntuación (3) a aquellos atributos que están mal y presentan los peores signos de calidad y dando los valores inferiores cuando los atributos de calidad evaluados son muy buenos (0-1). La puntuación máxima obtenida en cada atributo se suma y este valor es la puntuación del QIM (Índice de Calidad del pescado).

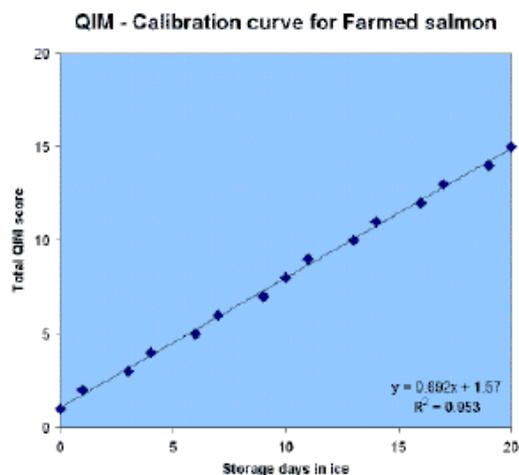
Existe una correlación lineal entre la calidad sensorial del pescado, el tiempo de almacenamiento y la duración del mismo en hielo (Figura 1), por lo que existen gráficas que nos relacionan las alteraciones en las características sensoriales con el tiempo de almacenamiento. El valor QIM obtenido en cada caso se compara con la curva de calibración, específica de la especie,

para establecer la frescura relativa y estimar el tiempo de almacenamiento en hielo y el tiempo remanente de vida comercial que le queda al pescado (Ver tabla adjunta). Para más información sobre el procedimiento de evaluación sensorial de acuerdo al QIM consultar el siguiente enlace <http://www.youtube.com/qimeurofish>.

Quality Index Method (QIM) Scheme for Farmed Salmon

Quality parameter	Description	Score	
Skin	Colour/ appearance	Pearl-shiny all over the skin	0
		The skin is less pearl-shiny	1
		The fish is yellowish, mainly near the abdomen	2
	Mucus	Clear, not clotted	0
		Milky, clotted	1
		Yellow and clotted	2
	Odour	Fresh seaweedy, nutral	0
		Cucumber, metal, hay	1
		Sour, dish cloth	2
		Rotten	3
	Texture	In rigor	0
		Finger mark disappears rapidly	1
Finger leaves mark over 3 seconds		2	
Eyes	Pupils	Clear and black, metal shiny	0
		Dark grey	1
		Matt, grey	2
	Form	Convex	0
		Flat	1
		Sunken	2
Gills	Colour	Red/dark brown	0
		Pale red, pink/light brown	1
		Grey-brown, brown, grey, green	2
	Mucus	Transparent	0
		Milky, clotted	1
		Brown, clotted	2
	Odour	Fresh, seaweed	0
		Metal, cucumber	1
		Sour, mouldy	2
Rotten		3	
Abdomen	Blood in abdomen	Blood red/not present	0
		Blood more brown, yellowish	1
	Odour	Neutral	0
		Cucumber, melon	1
		Sour, fermenting	2
Rotten/rotten cabbage	3		
Quality Index		0-24	

Figura 1. Recta de calibración para el salmón almacenado en hielo



Farmed salmon

$$\text{Quality Index} = 0,692 \times \text{days in ice} + 1,57$$

$$(R^2 = 0,953)$$

Quality Index	Storage time in ice (days)	Remaining shelf life (days)
1	0	20
2	1	19
3	3	17
4	4	16
5	6	14
6	7	13
7	9	11
8	10	10
9	11	9
10	13	7
11	14	6
12	16	4
13	17	3
14	19	1
15	20	0

Más información en la página web <http://www.qim-eurofish.com/>.

DETERMINACION DE NITRÓGENO DE TRIMETILAMINA (N-TMA)

Fundamento

La trimetilamina es una amina volátil pungente, generalmente asociada con el olor típico “a pescado” del pescado en deterioro. Su presencia en la musculatura del pescado es debido a la reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA), el cual está naturalmente presente en el tejido de muchas especies de pescados marinos. Se cree que el N-TMA está generado por la acción de las bacterias del deterioro, sin embargo, su correlación con el número de bacterias no es generalmente muy buena. Actualmente, se piensa que este fenómeno es debido a la presencia de un pequeño número de bacterias “específicas del deterioro” capaces de generar este tipo de compuesto. Así, uno de los organismos específicos del deterioro, el *Photobacterium phosphoreum*, genera hasta 100 veces más de TMA que el organismo más comúnmente conocido en el deterioro del pescado (*Shewanella putrefaciens*).

El N-TMA refleja muy bien el deterioro organoléptico del pescado y su determinación es más rápida que la cuantificación de bacterias por análisis microbiológico, sin embargo presenta la desventaja de que no refleja los estadios primarios de deterioro, ya que su contenido es marcado en la fase de mayor alteración como consecuencia del crecimiento bacteriano.

En este método la trimetilamina, amina volátil, se extrae con ácido tricloroacético de la musculatura del pescado. Posteriormente, por reacción con ácido pícrico en medio no acuoso, se forma un compuesto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de trimetilamina. La determinación es espectrofotométrica, a 410 nm.

Determinación de trimetilamina

Método (AOAC, 971.14)



Esquema de la determinación de TMA en pescado

Reactivos

- Acido Tricloroacético, CCl_3COOH , p.a.
- Tolueno, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$, p.a.
- Acido Pícrico $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$, p.a. (con 0,5 g $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$).
- Carbonato Potasio, K_2CO_3 , p.a.
- Formaldehído, HCHO , 37% p.a.
- Trimetilamina Clorhidrato. $\text{C}_3\text{H}_9\text{NxHCl}$, p.a.
- Magnesio Hidróxicarbonato, $4\text{MgCO}_3\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, p.a.
- Sulfato Sodio Anhidro, Na_2SO_4 , p.a.
- Acido Clorhídrico, HCl , 37%, p.a.
- NaCl , p.a.

Preparación de las soluciones de trabajo

- Acido pícrico 0,2% p/v: Pesar 400 mg de ácido pícrico, o una equivalente a 0.2 g de ácido pícrico base seca, y disolver en 100 mL de tolueno. Tener la precaución de agregar a la solución sulfato de sodio anhidro, para deshidratar.

- Solución de Acido Pírico 0,02%: Diluir 10 mL de la solución 0,2% de ácido pírico, a 100 mL con tolueno.
- Acido Tricloroacético (TCA) 7,5% p/v: Pesar 75 g de ácido tricloroacético. disolver con agua para análisis y diluir a 1 L.
- Carbonato de Potasio 100% p/v: Disolver 100 g de carbonato de potasio en 100 mL de agua.
- Formaldehído 20% p/p: Agitar 100 mL de formaldehído con 10 g de magnesio hidróxido hasta que la solución sea casi incolora y filtrar. Diluir 100 mL del filtrado a 200 mL con agua para análisis.
- Solución Patrón de Trimetilamina, 1 mg N-TMA/mL: Disolver 0,682 g de trimetilamina clorhidrato en 50 mL de agua destilada, agregar 1 mL de HCl 1:3 y aforar a 100 mL. Estandarizar la solución en un aparato de destilación Kjeldahl. Tomar una alícuota, alcalinizar con solución de NaOH y destilar, recogiendo el destilado en ácido bórico, finalmente titular el destilado con HCl o H₂SO₄ 0,1 N estandarizado.
- Solución de trabajo de Trimetilamina 0,01 mg N-TMA/mL: Diluir 1 mL de la solución patrón de trimetilamina 1 mg N-TMA/mL a 100 mL con agua destilada. Agregar 1 mL de HCl 1:3 antes de aforar.
- Solución de HCl 1:3, Medir 250 mL de HCl y agregarlos sobre 750 mL de agua destilada.

Material y equipos

- Espectrofotómetro UV/VIS
- Balanza de precisión, mínima división 0,001 g.
- Papel filtro Whatman 1 o equivalente.
- Picadora de alimentos
- Tubos de ensayo de 15 mL de vidrio con tapón de rosca y sello de teflón.

Procedimiento analítico

1. Preparación de la muestra

- Eliminar las espinas y la piel, trocear y preparar el homogeneizado del producto en la procesadora de alimentos

2. Extracción

En el vaso del homogeneizador de 250 mL de capacidad, pesar al miligramo 25 g de muestra y registrar el peso (M). Agregar al frasco 50 mL de TCA 7,5% p/v, agitar y dejar decantar, filtrar a

través de papel filtro Whatman 1 o equivalente, recibir el filtrado en un tubo de ensayo con tapa rosca, del filtrado, tomar una alícuota de 4 mL en tubo de ensayo seco con tapa rosca.

3. Curva de calibración

Preparar una curva de calibración, adicionando a tubos con tapa rosca debidamente rotulados, los volúmenes descritos en la siguiente tabla:

mg N-TMA Nominal	Volumen (mL) de solución 0.01 mg N-TMA/mL	Volumen (mL) de agua destilada
Blanco	0	4
0.01	1	3
0.02	2	2
0.03	3	1

4. Lectura de la curva de calibración y muestras.

A partir de este punto llevar en paralelo estándares y muestras.

Agregar sucesivamente tanto a muestra como estándares:

- 1 mL de formaldehído al 20% p/p
 - 10 mL de tolueno.
 - 2 mL de solución de carbonato de potasio 100% p/v
- Tapar los tubos y agitar vigorosamente aproximadamente 40 veces.
 - Tomar con pipeta graduada seca tomar entre 7 y 9 mL de la capa superior orgánica y colocarlos en otro tubo de ensayo de 15 mL con tapa rosca al que previamente se le ha agregado una punta de espátula equivalente a 50 mg de Na₂SO₄ anhidro.
 - Tapar los tubos y agitar vigorosamente para secar el tolueno Pipetear con precaución, con pipeta volumétrica seca, 5 mL de solución y colocarlos en otro tubo de ensayo con tapa rosca. Evitar pipetear sulfato de sodio.
 - Agregar a cada tubo, con pipeta volumétrica 5 mL de solución de ácido pícrico 0,02% y agitar suavemente.
 - Leer la absorbancia de muestras y estándares de calibración a 410 nm contra el blanco. Si la absorbancia leída para la muestra es mayor que la obtenida para el estándar de 0,03 (Abs= 0.6) mg N- TMA es necesario diluir el extracto obtenido y repetir la determinación.
 - A continuación se muestra la ecuación de una recta patrón obtenida con las soluciones de trabajo descritas en el protocolo.

$$\text{Concentración} = 20.86 \text{ Abs} + 0.0036$$

$$R^2=0.9998$$

Expresión de resultados

Construir una curva de calibración en mg de N- TMA (considerar la concentración real de N-TMA obtenida de la estandarización de la solución patrón) vs Absorbancia. Interpolarse la absorbancia encontrada para la muestra y calcular los mg N-TMA por cada 100 g de muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{N - TMA mg/100 g} = \frac{\text{mg(N - TMA)} \times 50 \times 100}{4 \times M}$$

En caso de haber efectuado alguna dilución esta debe ser considerada en el cálculo.

PRUEBA COLORIMÉTRICA DE NESSLER PARA DETERMINAR EL ESTADO DE CONSERVACIÓN DEL PESCADO Y CRUSTÁCEOS

Fundamento

El amoníaco (NH_3) presente en los músculos del pescado puede proceder de la desaminación de la creatina, de los aminoácidos o de sus compuestos por acción bacteriana. En los elasmobranquios (ej. marrajo) éste procede sobre todo de la urea presente de forma natural antes de la desaminación de los aminoácidos, lo que explica el aumento precoz que de la tasa de amoníaco se forma por degradación enzimática en el músculo estéril (llegando incluso a algunos mg por 100g), y disminuyendo ligeramente por el efecto tamponador de productos resultantes de la autólisis aséptica, para aumentar muy rápidamente por efecto de la alteración bacteriana. El más importante compuesto entre las bases nitrogenadas volátiles (NBVT) es el NH_3 , siendo particularmente útil en el pescado de agua dulce ya que éste no posee óxido de trimetilamina (OTMA) que se degrada para formar trimetilamina (TMA). Existen variaciones específicas que se deben tener en cuenta. Vierzochowski (1955) establece el límite de comestibilidad para los peces magros en 60 mg de NH_3 por 100 g de pescado, y de 30-40 mg para los peces de agua dulce. Sin embargo, existen algunas excepciones que debemos conocer como el arenque, en el que se detectan sólo pequeñas cantidades de NH_3 en estado ya avanzado de alteración.

El *yodomercuriato potásico* (**reactivo de Nessler**) en solución alcalina forma con el amoníaco un complejo de color rojo-naranja (*yodoamiduro* o *oxidimercurilo*) cuya densidad óptica

a 440 nm permite valorarlo cuantitativamente, previa obtención de una curva patrón. No obstante puede utilizarse esta técnica a modo de prueba orientativa (cualitativa) sin utilizar medida de absorción de la luz.

Material

- Homogeneizador.
- Embudo y filtro (o centrífuga).
- Espectrofotómetro que permita medir a 440 nm
- Acido tricloroacético al 5%.
- Reactivo de Nessler: Este reactivo viene ya preparado por distintas marcas comerciales.

Procedimiento

- Se mezclan 2 g de pescado y 40 mL de ácido tricloro acético al 5%.
- Homogeneizar.
- Dejar en reposo 15 min.
- Centrifugar en tubos de centrífugas de plástico a 4000 rpm durante 10 minutos.
- Tomar 2 mL de filtrado y 1 mL de reactivo de Nessler y dejar reposar las muestras unos 10 min para que se desarrolle adecuadamente la reacción.
- Para resultados de carácter cualitativo observar a simple vista la tonalidad de amarillo o naranja, de acuerdo con el cuadro que incluimos en la interpretación.
- Para resultados cuantitativos realizar una recta patrón tal y como se describe a continuación.

Interpretación

Cualitativa (control del color a simple vista):

Grado de calidad	color observado
Buena calidad	Amarillo claro azufrado
Calidad media	Amarillo (intermedio)
Mala calidad	Naranja

Cuantitativa

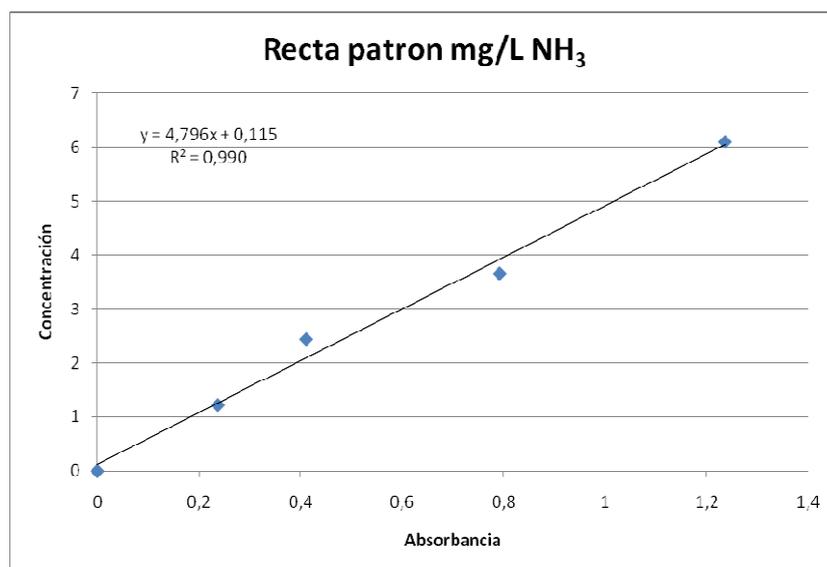
Para realizar la determinación cuantitativa se realiza una lectura de la absorbancia a 440 nm, realizando las siguientes diluciones para preparar la recta patrón.

- Preparación de la Solución madre: Disolver 3.819 g de cloruro de amonio anhidro previamente desecado en 1 L de agua destilada.
- Preparación de la solución de trabajo: Tomar 10 mL de la solución madre y llevar a 1 L de agua destilada. Esta solución tiene una concentración de 12.2 mg de NH₃/mL. A partir de la solución de trabajo se preparan los diferentes puntos de la recta patrón.

Conc NH ₃ /mL	mL Solucion de trabajo	mL agua
0	0	10
1,22	1	9
2,44	2	8
3,66	3	7
6,1	5	5

Para determinar los valores de absorbancia de los patrones realizar la reacción tomando 2 mL de cada uno de los patrones y 1 mL de reactivo de Nessler. Dejar reposar los tubos aproximadamente 10 min antes de proceder a la lectura a 440 nm realizando el autocero con el blanco. Tras la lectura de la recta patrón proceder a leer las muestras problemas.

Con estos patrones se obtiene la siguiente ecuación de la recta:



La concentración de NH₃ se expresa en mg de NH₃/100 g de pescado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{mg de NH}_3/100 \text{ g} = \frac{(\text{mg de NH}_3/\text{L} \times 4)}{\text{Peso muestra}}$$

A continuación se resume una tabla con valores de referencia para diferentes especies.

mg de NH ₃ /100 g de pescado			
Especie	Fresco	Menos fresco	Alterado
<i>Cuplea spratus</i> (lacha)	25	35	240
<i>Engraulis encrasicolus</i> (boquerón)	20	27	230
<i>Mugil cephalus</i> (lisa)	20	30	215
<i>Mullus barbatus</i> (salmonete)	20	32	235
<i>Scomber scombrus</i> (caballa)	17	33	220
<i>Trachurus trachurus</i> (jurel)	15	25	190
<i>Boops boops</i> (boga)	20	30	225
<i>Gobius paganellus</i> (gobio)	20	25	220
<i>Solea solea</i> (lenguado)	16	30	185
<i>Merluccius merluccius</i> (merluza)	20	20	220
<i>Raja clavata</i> (raya)	30	35	240

DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO BÁSICO VOLÁTIL TOTAL (NBVT) EN EL PESCADO (Método recomendado por la Decisión de la Comisión (95/149/CE))

Fundamento

La determinación del NBVT es una de las pruebas analíticas más ampliamente utilizadas para evaluar el grado de frescura del pescado y los productos derivados. Este concepto incluye la determinación de compuestos nitrogenados de carácter volátil que se libran como consecuencia del proceso de degradación post-mortem:

- Trimetilamina (producida por deterior bacteriano)

- Dimetilamina (producida por enzimas autolíticas durante el almacenamiento en congelación).
- Amoníaco (producido por desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos).
- Otros compuestos volátiles nitrogenados asociados con el deterioro de los productos pesqueros.

A pesar de que los análisis de NBVT son simples de realizar, tiene la limitación en su uso, porque solo reflejan la pérdida del grado de frescura del pescado en estadios avanzados de deterioro, y son generalmente poco fiables para medir adecuadamente el grado de frescura del pescado almacenado en hielo durante los primeros días.

Las bases nitrogenadas volátiles se extraen de la muestra mediante una solución de perclórico. Una vez alcalinizado el extracto (para permitir la volatilización de las aminas), se somete a destilación al vapor y los componentes básicos volátiles se absorben mediante un receptor ácido. La concentración de NBVT se determina mediante valoración de las bases absorbidas.

Determinación de trimetilamina

Método (AOAC, 971.14)



Esquema de la determinación de TMA en pescado

Material y reactivos

- Triturador de carne
- Filtros de 150 mm de diámetro.
- Bureta graduada
- Aparato de destilación al vapor.

- Solución de ácido perclórico (6g/100 ml)
- Solución de hidróxido sódico (20g/100 ml)
- Solución de ácido clorhídrico (0.01N)
- Solución de ácido bórico (3g/100 ml)
- Agente antiespumante de silicona
- Solución de fenolftaleína (1g/100 ml de etanol 95%)
- Solución indicadora: disolver 2 g de rojo de metilo y 1 g de azul de metileno en 1000 ml de etanol 95%.

Procedimiento

Triturar cuidadosamente la muestra que vaya a analizarse con un triturador. Pesar exactamente 10 g de carne triturada en un recipiente adecuado, mezclar con 90 ml de solución de ácido perclórico, homogeneizar durante 2 minutos en un agitador y filtrar. El extracto así obtenido puede guardarse durante al menos 7 días a una temperatura comprendida entre 2 y 6 ° C aproximadamente.

Poner 50.0 ml de extracto obtenido en un aparato de destilación al vapor. Añadir varias gotas de fenolftaleína para comprobar posteriormente que el extracto esté suficientemente alcalinizado. Tras añadir algunas gotas de agente antiespumante de silicona, añadir al extracto 6.5 ml de solución de hidróxido de sodio e iniciar inmediatamente la destilación al vapor (manipular estas soluciones con mucho cuidado pues tanto el perclórico como la sosa son corrosivas).

Se sumerge el tubo de salida en un recipiente (Erlenmeyer) con 100 ml de solución de ácido bórico, a la que se le habrán añadido de 3 a 5 gotas de la solución indicadora mencionada. Debe cortarse la destilación cuando en total tengamos un volumen de 200 ml de líquido en el Erlenmeyer. Retirar el tubo de salida del recipiente y lavarlo con agua. Determinar mediante valoración con el ácido clorhídrico 0.01N las bases volátiles contenidas en la solución receptora. El pH final deberá ser de 5.0 aproximadamente.

Se debe hacer, en paralelo, un blanco en el que en lugar del extracto de pescado, se utilicen 50 ml de solución de ácido perclórico.



Cálculos

La concentración de NBVT se calcula con la ecuación siguiente, tras la valoración de la solución receptora con ácido clorhídrico 0.01N.

$$\text{NBVT (expresado en mg/100g de muestra)} = \frac{(V_1 - V_0) \times 0.14 \times 2 \times 100}{M}$$

Siendo:

V_1 = volumen en ml de solución de clorhídrico 0.01 N por muestra

V_0 = volumen en ml de solución de ácido clorhídrico 0.01 N para el blanco

M = peso de la muestra en g

Interpretación

Se considerarán impropios para el consumo humano, el pescado fresco o los productos pesqueros no transformados, que habiendo suscitado el examen organoléptico dudas sobre su frescor, el análisis químico demuestre que se han superado los límites de NBVT siguientes:

Categorías de especies	Límites de NBVT
<i>Sebastes sp.</i> <i>Helicolenus dactylopterus</i> <i>Sebastichthys capensis</i>	25 mg de NBVT/100 g
Especies que pertenezcan a la familia de los PLEURONECTIDAE (excepto el fletán: <i>Hippoglossus sp.</i>)	30 mg de NBVT/100 g
<i>Salmo salar</i> Especies que pertenezcan a la familia de los MERLUCCIIDAE Especies que pertenezcan a la familia de los GADIDAE	35 mg de NBVT/100 g

Estos valores están establecidos legalmente, para las demás especies tenemos que tener en cuenta valores de referencia, aunque no están regulados legalmente.

Pescados frescos, refrigerados o congelados, enteros o troceados.

-*Seláceos* (rayas y escualos): para pescados con un estado de frescura muy satisfactorio los niveles de nitrógeno básico volátil son de orden de 50 a 70 mg. por 100 g. de producto.

-*No seláceos*: de una manera general, se puede afirmar que su estado de frescura es satisfactorio cuando el nivel de NBV es inferior a 25 ó 30 mg. por 100 g. de producto. No obstante, estos niveles varían según la especie, siendo las tasas medias para determinadas especies las que se indican en la tabla que figura más adelante.

Pescados ahumados o salados: Las tasas medias son las siguientes:

- Anguila: 50 mg/100 g.
- Arenque, caballa, sardina, anchoa y atún : 80 mg/100 g.

Debe tenerse en cuenta que cuando en el proceso de fabricación se busca un aroma y un sabor más característico del producto tratado, se suele llegar a una maduración más avanzada, lo que hace que aumente el índice de NBV.

Conservas y seniconservas de pescados Para diferentes pescados y calidades comerciales, las tasas medias de NBV son las siguientes, en mg/100 g.

Grado de calidad	Conserva de	
	Sardinas, Caballa	Atún
Buena calidad	50	40
Calidad corriente	50-60	40-60
Calidad mediocre	60-70	60-70
Tasa límite	70	70

Crustáceos frescos y en conserva

Las tasa medias para crustáceos frescos crudos, cocidos, refrigerados, congelados o en conserva son las siguientes:

Buena calidad : 30 mg/100 g.
Calidad corriente : 30-40 mg/100 g.

Calidad mediocre : 40-60 mg/100 g.
Tasa límite : 60 mg/100 g.