

Métodos generales de análisis utilizados en el examen del pescado y productos pesqueros con referencia a su alteración

por

J. M. GALLARDO y M. I. MONTEMAYOR *

INTRODUCCIÓN

Los métodos de análisis utilizados en el examen de los productos pesqueros se clasifican en subjetivos y objetivos; ambos procedimientos tienen sus ventajas y sus inconvenientes. Los métodos subjetivos dependen de los elementos sensoriales, que pueden estar modificados por circunstancias fortuitas y por la sensibilidad del degustador; en ellos el individuo es un sujeto activo, por lo que a veces en un panel de degustación pueden presentarse divergencias más o menos significativas.

Existen muchos argumentos a favor de los ensayos organolépticos (BAINES *et al.*, 1967; ANTONACOPOULOS, 1969 a; LEARSON y RONSI-VALLI, 1969; citas en GOULD y PETERS, 1971) y también propuestas indicando la conveniencia de utilizar los ensayos objetivos como confirmación de los subjetivos (ANTONACOPOULOS, 1969 b).

Por otra parte, un panel de expertos suele ser costoso en su entrenamiento y mantenimiento y no siempre los resultados son válidos para el control de calidad.

Los ensayos objetivos no reflejan preferencias sino que miden una propiedad que indica el grado de frescura o alteración. En general, los métodos publicados se han utilizado en productos frescos y enfriados, pero no son

* Instituto de Investigaciones Pesqueras de Vigo. Muelle de Bouzas, s/n. Vigo.
Recibido el 30 de octubre de 1981.

muy útiles en pescado congelado, ya que los pasos de alteración son distintos (DYER *et al.*, 1958).

Asimismo no se ha tenido en cuenta la variación entre individuos de la misma especie y otros factores como los geográficos y variación estacional, por lo que los resultados no son buenos y no han podido ser confrontados.

Los métodos organolépticos son muy usados a escala mundial y los factores que se tienen en cuenta principalmente son el olor, sabor, apariencia y textura, existiendo otros secundarios como aspecto de las branquias, ojos, apariencia de las escamas, etc., de valor a veces muy limitado.

Sobre los índices objetivos de frescura existe numerosa bibliografía, siendo de destacar la suministrada por SIGURDSSON (1947), ALLISON (1948), STANSBY *et al.* (1957) y FARBER (1965), entre otros, que han centrado sus revisiones en la alteración del pescado conservado en hielo.

Uno de los primeros ensayos para determinar la calidad del pescado fue el del amoníaco, que en principio se consideró como un índice satisfactorio de la descomposición proteica (CROOKE y RITCHIE, 1938; citado en GOULD y PETERS, 1971). Sin embargo, LUIJPEN (1958) no considera los valores de amoníaco válidos para el pescado congelado; VYNCKE (1970) confirma que es un método con limitaciones, aunque sí es válido en pescados cartilagosos, estando de acuerdo los resultados con los del panel organoléptico.

Los ensayos de bases volátiles tienen más importancia y son de general implantación en casi todos los laboratorios; VAN SPREEKENS (1969) lo considera como bueno y similar al análisis de hipoxantina y es recomendable para confirmar los ensayos subjetivos; GALLARDO *et al.* (1979) hacen una revisión de los métodos utilizados en la determinación de bases volátiles, y proponen una modificación del método citado por el Codex (Committee on Fish and Fishery Products).

Un ensayo muy estudiado y ampliamente discutido es el análisis de trimetilamina (TMA); BEATTY y GIBBONS (1936) lo proponen como índice de frescura en pescado, empleando una modificación de la técnica de microdifusión de CONWAY-BYRNE (1933). Más tarde, DYER (1945) publicó un método colorimétrico para la TMA, que es muy utilizado, aunque no es totalmente específico debido a las interferencias de la dimetilamina (DMA) y otras aminas. CASTELL *et al.* (1958) encontraron que los valores de TMA se correlacionan con los grados asignados al pescado fresco y congelado. ANTONACOPOULOS (1969 c) propuso que tanto la TMA como el óxido de trimetilamina (OTMA) se empleasen como métodos estándar para el control de calidad, juntamente con el método de bases volátiles y el panel sensorial.

La TMA se forma por reducción bacteriana, en principio, del OTMA, aunque algunas especies tienen enzimas capaces de transformar el OTMA y dar formaldehído y DMA. CASTELL (1970) señala que ciertos metales,

a nivel de «traza» o pigmentos, pueden reducir el OTMA. CASTELL y SMITH (1970) han comprobado que de 15 especies marinas, a lo largo de un almacenamiento en congelación, tan sólo los gádidos desarrollan DMA y con diferencias apreciables entre las especies, existiendo una relación directa entre el incremento en DMA y el decrecimiento en la solubilidad de la proteína.

La estimación del contenido en DMA parece tener posibilidades como índice de calidad en pescado congelado, especialmente en gádidos, aunque es necesario mayor investigación. CASTELL *et al.* (1974) realizan medidas de TMA y DMA simultáneamente sobre 84 filetes de eglefino, bacalao, carbonero, brosmio y merluza, comprobando la utilidad de dichas medidas para la estimación de la calidad; aunque la DMA no contribuye en sí misma y de manera significativa a los cambios que tienen lugar en el músculo de pescado congelado, es de utilidad para medirlos, ya que durante su formación se produce formaldehído de manera equivalente, que se combina con la proteína y otros componentes del músculo, provocando un deterioro de la textura y en definitiva de la calidad. Debido a que el formaldehído está muy ligado a los componentes con los que reacciona, es difícil extraerlo para su determinación cuantitativa, por lo que se recurre al análisis de DMA acumulada, estimándose posteriormente el formaldehído producido (CASTELL *et al.*, 1973 b).

TARR (1950) detecta en la carne de pescado hexosafosfatos y otros compuestos de fósforo de alta energía. La ribosa, que se presenta libre en el músculo del pescado sólo después de la muerte (TARR y LEROUX, 1962), es un factor prominente en el pardeamiento. VALENCIA y SANAHUJA (1968) sostienen que convendría estudiar los cambios que se producen en el catabolismo post-mortem de los nucleótidos musculares, siendo necesario conocer la concentración de nucleótidos y de sus productos de degradación, para usarlos como índice de frescura.

En un estudio sobre el bacalao almacenado en hielo, SHEWAN y JONES (1957) observan un incremento de hipoxantina (Hx) y lo proponen como índice de frescura; asimismo DUGAL (1967) estudió la degradación de nucleótidos y considera que la Hx puede ser utilizada también como índice de calidad; por otra parte, JONES (1964) encuentra en bacalao mantenido en hielo un aumento de Hx a medida que decrece la calidad, y FRASER *et al.* (1968) observaron en caballa, mantenida durante 15 días a 0-5°C, un incremento en la velocidad de acumulación de Hx.

SAITO *et al.* (1959 a) sugieren emplear como criterio de frescura la razón de inosina e Hx a nucleótidos totales. HUGHES y JONES (1966) determinaron Hx en arenques enlatados y sugieren la Hx como índice de frescura de la materia prima, y GALLARDO (1978), en estudios sobre sardinas enlatadas, comprueba la estabilidad de la Hx, sugiriéndola como índice de calidad de la materia prima.

En la actualidad, la Hx es un ensayo aceptado para determinar la frescura del pescado conservado en hielo; sin embargo, en pescado congelado no sería aconsejable utilizarlo como único procedimiento de calidad, si bien nos permite saber la condición de la materia prima antes de la congelación.

Teniendo en cuenta que los productos marinos son alimentos perecederos, es de interés disponer de métodos analíticos que permitan evaluar su calidad. Desde el punto de vista comercial es deseable la utilización de ensayos objetivos que conjuntamente con los subjetivos den una rápida información sobre la pérdida de olores y sabores frescos.

Las exigencias actuales del consumidor sobre la calidad de los productos pesqueros, las legales, la competencia comercial y la importancia del sector pesquero español, nos han animado a llevar a cabo un resumen de los métodos analíticos más importantes y relacionados con la alteración de los productos marinos, citados por la bibliografía y empleados y estudiados por nosotros. La ausencia de esta información en la industria y la necesidad que tiene el sector de una recopilación actualizada de metodología, que les permita el control de sus productos y la ayuda que prestaría a los que se inician en este campo, siguiendo el ejemplo de otros países avanzados, de informar y ayudar a la industria, han motivado este trabajo.

MÉTODOS ANALÍTICOS

1. Preparación de la muestra

Pescado congelado

Descongelar en refrigerador; si la cantidad de pescado es grande, descongelar parcialmente a temperatura ambiente y completar el proceso en refrigerador. Evitar siempre un calentamiento de la muestra. Una vez descongelado, se procede como se indica para el pescado fresco.

Pescado fresco

Preparar el tejido, fileteando y quitando la piel; pasar la muestra por una picadora de carne, cuyos agujeros sean de un diámetro aproximado de 4 mm y proceder al análisis inmediatamente, procurando mantener el material frío.

BASES VOLÁTILES TOTALES

Durante la alteración del pescado se forman diferentes bases volátiles: amoníaco, mono, di y trimetilamina fundamentalmente. Estas bases se determinan conjuntamente como nitrógeno de bases volátiles. Se considera

esta determinación como un importante índice objetivo del grado de frescura de los productos marinos.

2. Determinación de nitrógeno de bases volátiles totales según la técnica de Lücke y Geidel modificada por Antonacopoulos

Principio del método

En Alemania y otros países europeos se emplea generalmente la técnica de LÜCKE y GEIDEL (1935), que supone la destilación de las bases volátiles directamente del músculo del pescado, bajo condiciones estandarizadas y en presencia de óxido de magnesio; esta técnica ha sido modificada y mejorada por ANTONACOPOULOS (1960), utilizando una unidad de destilación de vapor especialmente diseñada. En España se aplica dicha técnica, estando regulada su aplicación por el B.O.E., n.º 157, de 1977.

Aparatos

Aparato de destilación con arrastre de vapor según ANTONACOPOULOS (1960).

Reactivos

Óxido de magnesio.

Antiespumante.

Disolución de ácido bórico. Se disuelven 8 g de ácido bórico en 200 ml de agua destilada y se añaden 2 ml de indicador Tashiro, preparado de la siguiente forma: se disuelven 0,125 g de rojo de metilo en 10 ml de hidróxido sódico N/20 acuoso y se le añade una disolución de 0,080 g de azul de metileno en 90 ml de agua destilada.

Ácido clorhídrico 0,01 N. Se prepara una disolución de ácido clorhídrico 1N, diluyendo 80,6 ml de ácido clorhídrico concentrado ($d = 1,19$, 23°Bé) con 919,4 ml de agua destilada; se toman 10 ml de esta disolución y se llevan a 1000 ml con agua destilada.

Procedimiento

Se toman 10 g de músculo de pescado y se introduce en el matraz de destilación, adicionando 2 g de óxido de magnesio y unas gotas de antiespumante y se destila durante 10 minutos exactamente, recogiendo unos 120 ml de destilado sobre el indicador de ácido bórico. A continuación se valora con ácido clorhídrico 0,01 N. El resultado se expresa en mg de N-BVT/100 g.

3. Determinación de nitrógeno de bases volátiles totales según Gallardo et al. (1979)

Principio del método

Otra técnica es la propuesta por GALLARDO *et al.* (1979), similar a la citada por el Codex, Committee on Fish and Fishery Products (FAO/WHO, 1968), en la cual las bases se destilan de un extracto tricloroacético con exceso de óxido de magnesio, en lugar de hidróxido sódico, durante 10 minutos, recogiendo el destilado sobre ácido bórico con indicador.

Aparatos

Aparato de arrastre de vapor según GALLARDO *et al.* (1979).
Homogeneizador.

Reactivos

Ácido tricloroacético al 5 %.
Óxido de magnesio.
Antiespumante.
Disolución de ácido bórico con indicador, preparado según 2.
Ácido clorhídrico 0,01 N según 2.

Preparación del extracto

Se toman 20 g de la muestra preparada como se indicó en el punto 1 y se adicionan 80 ml de ácido tricloroacético al 5 %, se homogeniza y se deja reposar 15 minutos y se filtra; el filtrado debe ser claro, y se diluye a 100 ml con ácido tricloroacético.

Procedimiento

Se toman 25 ml del extracto de tricloroacético y se introducen en el matraz de destilación, se añaden 2 g de óxido de magnesio (pH 10,6) y unas gotas de antiespumante y se destilan las bases durante unos 10 minutos, recogiendo unos 40 ml de destilado sobre 5 ml del indicador de ácido bórico, a continuación se valora con ácido clorhídrico 0,01 N. El resultado se expresa en mg de N-BVT/100 g.

4. Determinación de dimetilamina por el método del ditiocarbamato

Principio del método

La determinación de dimetilamina se basa en la reacción con sulfuro de carbono y disolución de sulfato cúprico amoniacal, según el método espectrofotométrico de Dowden (1938). En esta reacción se forma un com-

plejo de cobre amarillo del ácido ditiocarbámico, que es insoluble en agua y que se extrae con disolventes orgánicos. La reacción es específica para aminas secundarias; las primarias y terciarias no interfieren.

Aparatos

Tubos de ensayo con tapón esmerilado.
Espectrofotómetro.
Baño termostático.

Reactivos

Ácido tricloroacético al 5 %.
Sulfuro de carbono.
Etanol.
Cloroformo.
Acetato amónico.
Sulfato cúprico.
Hidróxido sódico al 10 %, 100 ml.
Hidróxido amónico.
Ácido acético.
Sulfato sódico anhidro.
Clorhidrato de dimetilamina.

Ácido clorhídrico al 25 %. Diluir 614,5 ml de ácido clorhídrico concentrado ($d = 1,19$, 23°Bé) en 388,5 ml de agua destilada.

Disolución A. Sulfuro de carbono:etanol:cloroformo (5,0:10:85,0).

Disolución B. 20 g de acetato amónico se disuelven en 100 ml de agua destilada y se le añaden 0,2 g de sulfato cúprico. A 100 ml de una disolución de hidróxido sódico al 10 % fría de nevera se añaden lentamente 20 ml de hidróxido amónico concentrado, mezclar con la disolución cúprica bajo agitación continua y lentamente, y diluir a 250 ml con agua destilada.

Disolución C. Disolución al 30 % de ácido acético en agua destilada.

Disolución stock de DMA. Disolver 0,582 g de clorhidrato de DMA en agua destilada, añadir 1 ml de ácido clorhídrico al 25 %, llevar a 100 ml con agua destilada. Esta disolución contiene 1,0 mg de nitrógeno de DMA por ml. El valor exacto de la concentración debe determinarse por microkjeldahl.

Disolución estándar de DMA. Diluir 1 ml de la disolución stock de DMA, añadiendo 1 ml de ácido clorhídrico al 25 %, a 100 ml con agua destilada. La concentración de esta disolución es de 0,010 mg de nitrógeno de DMA por ml.

Preparación del extracto

Se prepara un extracto en tricloroacético al 5 % tal y como se indicó en el punto 3.

Procedimiento

Del extracto de pescado en TCA al 5 %, tomar una alícuota de 0 a 1 ml, conteniendo 0,000-0,006 mg de N-DMA, completando hasta 1 ml si fuera preciso. Se añade 1 ml de la disolución B, 10 ml de la disolución A, se calienta el tubo tapado a 40°C durante 5 minutos, se agita enérgicamente durante 30 segundos, se añade 1 ml de la disolución C, se vuelve a agitar y se enfría al grifo. Se deja reposar hasta que la fase orgánica esté completamente translúcida. Pasar la fase orgánica a otro tubo seco sobre 0,7 g de sulfato sódico anhidro, evitando la transferencia de gotas de la fase acuosa. Pasar a una cubeta de espectrofotómetro y medir la absorción a 431 nm frente a la disolución A. Realizar un blanco (1 ml de TCA 5 %), siguiendo todo el proceso. El resultado se expresa en mg N-DMA/100 g de muestra.

5. Determinación de trimetilamina por el método del picrato

El contenido de nitrógeno de bases volátiles que no reaccionan con el formaldehído se calcula como nitrógeno de TMA; su determinación se utiliza en la mayoría de los laboratorios siendo uno de los principales índices objetivos de calidad.

Principio del método

Las aminas y demás sustancias básicas que no reaccionan con el formaldehído se eliminan de un extracto tricloroacético por medio de un agente alcalino, extrayéndose posteriormente con tolueno. En el método original de DYER (1945) se utilizaba carbonato potásico como agente alcalino, pero TOZAWA *et al.* (1970) sugieren el empleo de hidróxido potásico que reduce la interferencia de la DMA, aunque no la elimina totalmente.

Esta modificación hace que el método sea mucho más aceptable que el original, y en ensayos realizados por nosotros así se ha demostrado.

La fase de tolueno que contiene la TMA, se separa y se seca, reaccionando con ácido pícrico para dar un complejo coloreado con la TMA, midiéndose la absorción a 410 nm.

Aparatos

Tubos de ensayo de 20 × 150 mm con tapón de polietileno.

Espectrofotómetro.

Baño termostático.

Reactivos

Ácido tricloroacético al 5 %.

Carbonato magnésico.

Sulfato sódico anhidro.

Tolueno. Grado reactivo. Para eliminar interferencias agitar con sulfúrico 1 N, destilar y secar sobre sulfato sódico anhidro.

Ácido clorhídrico al 25 % preparado según el punto 4.

Ácido sulfúrico 1 N. Se prepara diluyendo 27,8 ml de ácido sulfúrico concentrado ($d = 1,84$ y 96 %) con 972,2 ml de agua.

Formaldehído al 10 %. Agitar previamente formol comercial del 40 % con carbonato magnésico y filtrar. Diluir 25 ml de este formol a 100 ml con agua destilada. La proporción de carbonato magnésico es de 20 g por 100 ml de formaldehído comercial.

Hidróxido potásico al 25 % p/p. Disolver 25 g de hidróxido potásico en 75 g de agua destilada. La disolución se valora con ácido clorhídrico 4 N usando como indicador naranja de metilo.

Ácido clorhídrico 4 N. Se prepara diluyendo 322,6 ml de ácido clorhídrico concentrado ($d = 1,19$, 23°Bé) con 677,4 ml de agua destilada.

Disolución stock de ácido pícrico. Disolver 2 g de ácido pícrico seco en tolueno y diluir a 100 ml con tolueno exento de humedad.

Disolución standard de ácido pícrico. Llevar 1 ml de la disolución stock de ácido pícrico a 100 ml con tolueno exento de humedad.

Disolución stock de TMA. Disolver 0,686 g de clorhidrato de TMA en agua destilada, añadir 1 ml de ácido clorhídrico al 25 %, llevar a 100 ml con agua destilada. Esta disolución contiene 1,0 mg de nitrógeno de TMA por ml. El valor exacto de la concentración debe determinarse por microkjeldahl.

Disolución estándar de TMA. Diluir 1 ml de la disolución stock de TMA, añadiendo 1 ml de ácido clorhídrico al 25 %, a 100 ml con agua destilada. La concentración de esta disolución es de 0,010 mg de nitrógeno de TMA por ml.

Preparación del extracto

Se prepara un extracto en tricloroacético al 5 %, tal y como se indicó en el punto 3.

Procedimiento

Del extracto de pescado en TCA al 5 % tomar una alícuota de 1 a 5 ml, conteniendo 0,002-0,03 mg de N-TMA, completando hasta 5 ml con TCA al 5 % si fuera preciso. Adicionar 1 ml de formaldehído al 10 %, 10 ml de tolueno y 3 ml de hidróxido potásico al 25 % p/p. Tapar el tubo, calentar a 30°C en baño termostático durante 5 minutos, agitar enérgicamente 40 veces, dejar reposar 15 minutos; hasta que las dos fases estén completamente separadas. Transferir unos 8 ml de la fase orgánica a otro tubo limpio y seco en el que previamente se ha puesto 400 mg de sulfato sódico anhidro; este proceso ha de realizarse lentamente, evitando la transferen-

cia de gotas de la fase acuosa. Pasar 5 ml de la fase orgánica ya seca a un tercer tubo que contiene 5 ml de ácido pícrico estándar y mezclar. Transferir a una cubeta de espectrofotómetro y medir la absorción frente a tolueno a 410 nm. Realizar un blanco (5 ml de TCA al 5 %), siguiendo todo el proceso. El resultado se expresa en mg N-TMA/100 g de músculo de pescado.

6. Separación y determinación de aminas volátiles por cromatografía gas-líquido

Principio del método

El contenido en nitrógeno de las aminas volátiles se calcula como nitrógeno amínico.

Las aminas volátiles se extraen del pescado con ácido perclórico. Los extractos se alcalinizan con hidróxido sódico, recogiendo las aminas por destilación en arrastre de vapor sobre ácido clorhídrico. Las aminas se identifican y determinan cuantitativamente por cromatografía gas-líquido, siguiendo el esquema descrito por KEAY y HARDY (1972) y MACKIE y THOMSON (1974).

Aparatos

Macerador.

Aparato de destilación por arrastre de vapor.

Cromatógrafo de gas equipado con detector de llama.

Columnas de vidrio de 3 m × 3 mm de diámetro interior.

Reactivos

Ácido perclórico 0,6 N. Se prepara diluyendo 65,9 ml de ácido perclórico concentrado ($d = 1,53$, 60 %) en agua destilada y llevándolo a 1000 ml con agua destilada.

Hidróxido sódico al 20 %.

Ácido clorhídrico 0,06 N. Se prepara diluyendo 100 veces una disolución de ácido clorhídrico 6 N. Esta disolución 6 N se prepara diluyendo 485,43 ml de ácido clorhídrico concentrado ($d = 1,19$, 23° Bé) a 1 litro con agua destilada.

Terc-butilamina 0,25 %.

Chromosorb P 80/100 mallas.

Igepal CO-630.

Hidróxido potásico.

Cloruro de metileno.

Preparación del extracto

20 g de muestra se maceran con 60 ml de ácido perclórico 0,6 N durante 2 minutos en un Varing Blendor, se filtra y se diluye el filtrado transparente a 100 ml con ácido perclórico 0,6 N y se almacena a 0°C.

Preparación y calibrado de la columna cromatográfica

Para la separación de las aminas, se preparan dos materiales de relleno de la siguiente manera: uno conteniendo 3,5 % de hidróxido potásico y 10,6 % de Igepal CO-630 y otro con un 20 % de hidróxido potásico y 10,0 % de Igepal CO-630; para ello se disuelve el hidróxido potásico en 150 ml de agua destilada y se añade el Chromosorb P, se elimina el agua en el rotavapor y se añade el Igepal CO-630 en cloruro de metileno, se elimina el disolvente orgánico en el rotavapor, quedando el soporte impregnado con el Igepal CO-630.

Se rellena la columna de vidrio hasta unos 14 cm de la entrada con el material del primer relleno, que contiene el 3,5 % de hidróxido potásico; el resto de la columna se rellena con el segundo material de relleno, que contiene el 20 % de hidróxido potásico, aproximadamente unos 9 cm.

Preparar una disolución stock de TMA en ácido clorhídrico 0,06 N, conteniendo 10 mg/ml de N-TMA y preparar disoluciones estándar por dilución con clorhídrico 0,06 N, conteniendo 0,001-0,1 mg/ml; añadir 1 ml de terbutilamina, como patrón interno a cada disolución estándar. Inyectar 1 μ l de las disoluciones estándar operando con una temperatura de columna de 100°C.

Procedimiento

Introducir 25 ml del extracto de la muestra en ácido perclórico en el aparato de destilación, añadir 8,0 ml de hidróxido sódico al 20 % y destilar en arrastre de vapor, recogiendo el destilado sobre 5 ml de clorhídrico 0,06 N. Diluir a 50 ml con agua destilada. Aplicar posterior y directamente al cromatógrafo de gas porciones de 1 μ l conteniendo 3-300 μ g de aminas.

7. Determinación de hipoxantina. Oxidación a ácido úrico

Principio del método

La hipoxantina se extrae de la muestra por maceración con ácido perclórico, se neutraliza el extracto y se trata con una enzima específica que oxida la hipoxantina a ácido úrico, que se determina midiendo la absorción a 290 nm.

Aparatos

Macerador.

Espectrofotómetro U.V.

Reactivos

Ácido perclórico 0,6 N. Véase punto 6.

Hidróxido potásico 30 %.

Tampón fosfato 0,25 M, pH 7,6. Disolver 17,013 g de dihidrógeno fosfato potásico en 250 ml de agua destilada, añadir 107 ml de hidróxido sódico 1 M, llevar a 500 ml con agua destilada.

Xantina-oxidasa. La xantina-oxidasa tiene una concentración de 12,6 U.I. por ml. Diluir una alícuota con tampón fosfato 0,05 M a pH 7,6, preparado por dilución de 0,25 M, hasta alcanzar la concentración de 0,065 U.I./ml. La xantina-oxidasa debe ser preparada diariamente.

Preparación de la muestra

Debe tenerse en cuenta que hay diferencia en el contenido de hipoxantina de los tejidos como la piel y el músculo claro y oscuro, por lo que la elección de la muestra será la más idónea para el análisis.

Si se tratara de pescado congelado, antes de la extracción no debe descongelarse la muestra, manteniéndola a temperaturas de -30°C . La muestra pesada y troceada se coloca directamente en el frasco homogeneizador para ser mezclada con el ácido perclórico.

En el caso de que el pescado esté fresco, tomar la muestra rápidamente y mezclarla con ácido perclórico frío.

Tomar 25 g de muestra homogeneizada y macerar con 50 ml de ácido perclórico 0,6 M y filtrar a 0°C , añadir hidróxido potásico al 30 % y separar el perclorato potásico a 0°C , por centrifugación. Diluir a 200 ml. El pH final debe ser de 7,0.

Procedimiento

Transferir 2 ml del extracto neutralizado a un matraz aforado de 25 ml, adicionar 5 ml de tampón 0,25 M y 5 ml de la disolución de la enzima xantina-oxidasa, mezclar bien y diluir a 25 ml con agua destilada. Incubar a 37°C durante 30 minutos. Después medir a 290 nm. Hacer los blancos correspondientes. El contenido en hipoxantina se expresa en micromoles por gramo.

RESUMEN

En este trabajo se presenta una recopilación de métodos de análisis utilizados en el examen del pescado y productos pesqueros, para evaluar la calidad. Esta recopilación incluye la determinación de bases volátiles totales, trimetilamina, dimetilamina, metilaminas e hipoxantina, habiéndose omitido otros métodos.

SUMMARY

GENERAL METHODS UTILICED IN THE EXAMINATION OF FISH AND FISH PRODUCTS WITH RELATION TO SPOILAGE. — In this paper differents chemical tests of the quality of fish are described.

BIBLIOGRAFÍA

- ALLISON, A. A. — 1948. Review of methods for determining decomposition in fishery products. *U. S. Quarterly Bull.* 12: 129-139.
- ANTONACOPOULOS, N. — 1960. Verbesserte apparatur zur quantitativer destillation wasserdampfflüehtiger stoffe. 2. Lensmittel untersach. *U. Forsch.*, 113: 113-160.
- 1969 a. Principles of a simple method for sensory quality control of fish and fish products. *FAO Halifax*, FE: FIC/69/0/79.
- 1969 b. Comparison of sensory and objective methods for quality evaluation of fresh and frozen saltwater fish. *Ibidem*, FE: FIC/69/0/78.
- 1969 c. Simultaneous estimation of trimethylamine oxide and trimethylamine-nitrogen, and estimation of total volatile base nitrogen for testing the freshness of marine fish. *Ibidem*, FE: FIC/69/0/67.
- BEATTY, S. A., y N. E. GIBBONS. — 1936. The measurement of spoilage in fish. *J. Biol. Bd. Can.*, 3: 77-91.
- CASTELL, C. H. — 1970. Current status of the TMA test as a measure of spoilage in fish. *Fisheries of Canada*, 22 (9): 16-20.
- CASTELL, C. H., M. F. GREENOUGH, R. S. RODGERS y A. S. MACFARLANE. — 1958. Grading fish for quality. I. TMA values of fillets cut from graded fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 15: 701-716.
- CASTELL, C. H., y B. SMITH. — 1970. The relation between the production of dimethylamine and other changes taking place in stored frozen fish muscle. Trabajo presentado en el Atl. Fish. Technological Conference, Amherst, Massachusetts, octubre 4-6.
- CASTELL, C. H., B. SMITH y W. J. DYER. — 1973 b. Effects of formaldehyde on salt extractable proteins of gadoid muscle. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 30: 1205-1213.
- 1974. Simultaneous measurements of trimethylamine and dimethylamine in fish, and their use for estimating quality of frozen-stored gadoid fillets. *Ibidem*, 31: 383-389.
- CONWAY, E. J., y A. BYRNE. — 1933. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. I. The microdetermination of ammonia. *Biochem. J.*, 27: 419-429.
- DOWDEN, H. C. — 1938. The determination of small amounts of dimethylamine in biological fluids. *Ibidem*, 32: 455.
- DUGAL, L. C. — 1967. Hypoxanthine in iced freshwater fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 24: 2229-2239.
- DYER, W. J. — 1945. Amines in fish muscle. I. Colorimetric determination of TMA as the picrate salt. *Ibidem*, 6: 351-358.
- DYER, W. J., D. I. FRASER y E. G. BLIGH. — 1958. Fat hidrolisis in frozen fish. I. Free fatty

- acid formation. Fish. Res. Bd. Can. Progr. Rept. of the Atlantic Coasts sta. n° 71: 17-19.
- FAO/WHO. — 1968. Method for the determination of total volatile basic nitrogen (TVB) in fish muscle. Presented to Codex Committee on Fish and Fishery Products, 3rd session, Bergen, 7-11 October, as Codex Fish 1/7, 9 pp.
- FARBER, L. — 1965. Freshness tests. In «Fish as Food». Vol 4, Processing, Part II. G. Borgstrom, ed. Academic Press, N.Y., pp. 65-126.
- FRASER, D. I., S. G. SIMPSON y W. J. DYER. — 1968. Very rapid accumulation of hypoxanthine in the muscle of redfish stored in ice. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 25: 817-821.
- GALLARDO, J. M. — 1978. El contenido en hipoxantina como índice del grado de frescura del pescado y de los productos pesqueros. *Inf. Técn. Inst. Inv. Pesq.*, vol. 58.
- GALLARDO, J. M., M. LÓPEZ-BENITO, L. PASTORIZA y P. GONZÁLEZ. — 1979. Determinación de bases volátiles en productos pesqueros. *Ibidem*, vol. 65, 3-16.
- GOULD, E., y J. A. PETERS. — 1971. On testing the freshness of frozen fish. *Fishing News (Books) Ltd. London*. 80 pp.
- HUGHES, R. B., y N. R. JONES. — 1966. Measurement of Hypoxanthine concentration in canned herring as an index of the freshness of the raw material with a comment on flavor relations. *J. Sci. Food Agric.*, 17: 434-436.
- JONES, N. R. — 1964. Hypoxanthine and other purine containing fractions in fish muscle as indices of freshness. *Proceedings, FAO*. pp. 179-183.
- KEAY, J., y R. HARDY. — 1972. The separation of aliphatic amines in dilute aqueous solution by gas chromatography and application of this technique to the quantitative analysis of tri and dimethylamine in fish. *J. Sci. Food Agric.*, 23: 9.
- LÜCKE, F., y W. GEIDEL. — 1935. Bestimmung des flüchtigen basischen stickstoffs in fischen als Maßstab für ihren frischezustand. *Z. Untersuch. Lebensm.*, 70: 441-458.
- LUIJPEN, A. F. M. G. — 1958. Objective spoilage tests for fish stored under conditions other than normal chilling in ice. *J. Sci. Food Agric.*, 9: 410-417.
- MACKIE, I. M., y B. W. THOMPSON. — 1974. Decomposition of trimethylamine oxide during iced and frozen storage of whole and comminuted tissue of fish. *Proc. IV Int. Congress Food Sci. and Technol.*, vol. 1, 243-250.
- SAITO, T., K. I. ARAI y M. MATSUYOSHI. — 1959 a. A new method for estimating freshness of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 24: 749-750.
- SHEWAN, J. M. y N. R. JONES. — 1957. Chemical changes occurring in cod muscle during chill storage and their possible use as objective indices of quality. *J. Sci. Food Agric.*, 8: 491-498.
- SIGURDSSON, G. J. — 1947. Comparison of chemical tests of the quality of fish. *Ind. Eng. Chem. Analyt. Ed.*, 19: 892-902.
- STANSBY, M. E., R. VANCLEVE y J. A. STERN. — 1957. Review of objective tests for fish freshness. *Seattle Contract Rep., U.S.D.I. Bur. Comm. Fish.*
- TARR, H. L. A. — 1950. The acid-soluble phosphorus compounds of fish skeletal muscle. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 7: 608-612.
- TARR, H. L. A., y M. LEROUX. — 1962. Acid-soluble phosphorus compounds and free sugars in fish muscle and their origin. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 40: 571-589.
- TOZAWA, H., K. ENOKIBARA y K. AMANO. — 1970. Effect of dimethylamine on the value of trimethylamine determined by Dyer's method. *Bull. Jap. Sci. Fish.*, 36: 606-611.
- VALENCIA, M., y J. C. SANAHUJA. — 1968. Índices de calidad en pescados y productos de la pesca. I. Pescados enfiados. *Carpas; 4, Doc. Tec. 13. Rio Janeiro. Brasil.*
- VAN SPREEKENS, K. J. A. — 1969. Quality assessment of iced and prepackaged cod fillets. *FAO. Halifax. FE. FIC/69/0/48. Topic III.*
- VYNCKE, W. — 1970. Determination of the ammonia content of fish as an objective quality assessment method. *Mededelingen Fakulteit Landlouw-wetenschappen Gent*, 35 (4): 1033-1046.