



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos
Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

**Efecto del Uso de Películas Plásticas con Antioxidantes Sobre la
Calidad del Músculo de Sierra (*Scomberomorus sierra*)
Durante su Almacenamiento en Congelación**

TESIS

que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Wilfrido Torres Arreola

CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN.....	ii
DEL AUTOR.....	iii
DEDICATORIAS.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	5
Objetivos Específicos.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
La Pesca en Sonora.....	6
Características de la Sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>).....	8
Composición Química del Músculo de Pescado.....	8
Lípidos Presentes en el Músculo de pescado.....	11
Proteínas Presentes en el Músculo de Pescado.....	12
Proteínas Sarcoplásmicas.....	12
Proteínas Miofibrilares.....	13
Miosina.....	14
Actina.....	14
Proteínas del Estroma.....	15
Estructura del Músculo de Pescado.....	15
Cambios Post Mortem en el Músculo de Pescado.....	17
Congelación como Método de Preservación de Alimentos....	19
Velocidad de Congelación y Calidad.....	20
Utilización de Materiales de Envase como Métodos Alternativos para la Protección de Alimentos Procesados.....	21

Reacciones Bioquímicas en Músculo de Pescado Durante el Almacenamiento en Congelación.....	24
Hidrólisis de Lípidos.....	24
Oxidación de Lípidos.....	25
Mecanismo Básico del Proceso de Oxidación Lipídica.....	26
Influencia de las Propiedades Físicas en la Oxidación de Lípidos.....	27
Temperatura.....	28
Actividad Acuosa.....	29
Área Superficial y Solubilidad al Oxígeno.....	29
Influencia de la Composición Química en la Oxidación de Lípidos.....	30
Fuentes de Iniciación Enzimática.....	30
Fuentes de Iniciación no Enzimática.....	31
Consecuencias de la Oxidación Lipídica.....	32
Deterioro en la Calidad del Sabor.....	32
Deterioro en la Calidad del Color.....	33
Funcionalidad de la Proteína.....	33
Utilización de Antioxidantes para Prevenir la Oxidación Lipídica en Alimentos Procesados.....	34
MATERIALES Y METODOS.....	36
Materia Prima.....	36
Análisis Proximal.....	36
Congelación por Inmersión.....	37
Determinación del pH.....	37
Análisis de Firmeza.....	38
Obtención del Extracto Lipídico.....	38

Ácidos Grasos Libres.....	39
Índice de Peróxido.....	40
Ácidos Dienoicos Conjugados.....	40
Prueba del Ácido Tiobarbitúrico.....	41
Electroforesis en Gel de SDS-poliacrilamida.....	42
Estudio Histológico.....	44
Análisis de Datos.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
Análisis Proximal del Músculo de Sierra.....	48
Determinación de pH.....	52
Obtención del Extracto Lipídico.....	55
Ácidos Grasos Libres.....	57
Índice de Peroxido.....	59
Ácidos Dienoicos Conjugados.....	63
Prueba del Ácido Tiobarbitúrico.....	65
Análisis de Firmeza.....	69
Análisis Electroforético.....	73
Análisis Histológico.....	79
CONCLUSIONES.....	90
RECOMENDACIONES.....	91
BIBLIOGRAFÍA.....	92

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
1. Volumen de la producción pesquera en peso vivo por entidad en el litoral del Pacífico durante el periodo 1992-2003.....	7
2. Volumen de producción anual de sierra en el estado de Sonora, litoral del Pacífico y a nivel nacional.....	9
3. Propiedades físicas y químicas de los materiales utilizados en envases de alimentos.....	23
4. Protocolo de deshidratación en el músculo de sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>).....	45
5. Protocolo de tinción de Hematoxilina y Eosina de Harris.....	47
6. Composición proximal del músculo de sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>) fresco.....	49
7. Extracción en frío de lípidos del músculo de sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>) mediante la técnica de Bligh-Dyer (1959)...	56
8. Formación de dienos conjugados en el músculo de sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>) durante su almacenamiento en congelación.....	64
9. Resistencia al corte por parte del músculo de sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>) durante su almacenamiento en congelación.....	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Anatomía Externa de la Sierra del Golfo de California (<i>Scomberomorus sierra</i>).....	9
2. Modelo de la molécula de miosina.....	15
3. Estructura de la Fibra Muscular y del Sarcómero del pescado.....	18
4. Curva de congelación por inmersión con mezcla frigorífica (acetona-dióxido de carbono sólido) de músculo de sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>).....	51
5. Cambios de pH en músculo de sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>) durante su almacenamiento en congelación.....	54
6. Formación de ácidos grasos libres en músculo de Sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>) durante su almacenamiento en congelación.....	58
7. Formación de peróxidos en músculo de sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>) durante su almacenamiento en congelación.....	61
8. Desarrollo del índice de ácido tiobarbitúrico en músculo de sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>) durante su almacenamiento en congelación. Los resultados son valores promedio de 3 determinaciones.....	67
9. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de las proteínas del músculo de Sierra almacenado 4 meses en congelación.....	75
10. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y reductoras de las proteínas del músculo de Sierra almacenado 4 meses en congelación.....	76

11.	Corte histológico de músculo de Sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>) sin congelar, fijado en formaldehído al 10% inmediatamente después de su captura (100X).....	80
12.	Corte histológico de músculo de Sierra fijado en formaldehído al 10% después de 1 mes de almacenamiento en congelación sometido a los dos diferentes tratamientos. (A): envase testigo (100X); (B): envase con antioxidante (100X).....	81
13.	Corte histológico de músculo de Sierra fijado en formaldehído al 10% después de 2 meses de almacenamiento en congelación sometido a los dos diferentes tratamientos. (A): envase testigo (100X); (B): envase con antioxidante (100X).....	83
14.	Corte histológico de músculo de Sierra fijado en formaldehído al 10% después de 3 meses de almacenamiento en congelación sometido a los dos diferentes tratamientos. (A): envase testigo (100X); (B): envase con antioxidante (100X).....	85
15.	Corte histológico de músculo de Sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>) fijado en formaldehído al 10% después de 4 meses de almacenamiento en congelación sometido a los dos diferentes tratamientos. (A): envase testigo (100X); (B): envase con antioxidante (100X).....	87

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar el efecto de una película plástica con antioxidantes sobre la calidad química y bioquímica del músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*), en el presente estudio se determinó el grado de oxidación lipídica así como su efecto sobre la calidad de las proteínas miofibrilares presentes en el músculo almacenado por cuatro meses en congelación.

El grado de hidrólisis y oxidación de lípidos presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los dos tratamientos evaluados en este estudio. Los filetes almacenados en los envases plásticos con antioxidantes presentaron un menor grado de hidrólisis y oxidación lipídica durante el periodo de almacenamiento en comparación con los filetes almacenados en los envases testigo.

La resistencia al corte del músculo de sierra no mostró claras diferencias entre los dos métodos utilizados, ni con respecto al tiempo de almacenamiento en congelación. Sin embargo los patrones electroforéticos mostraron un incremento en la desnaturalización y agregación proteica durante el almacenamiento de las muestras. Los filetes almacenados en las películas plásticas con antioxidantes mostraron en menor grado este fenómeno al compararlos con los filetes almacenados en los envases testigo.

Después de un mes de almacenamiento en congelación los filetes almacenados en los envases plásticos con antioxidantes mostraron un menor daño en la morfología de sus fibras musculares y conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento la alteración de las fibras aumentó.

Bajo las condiciones aplicadas en este estudio se demostró que el uso de películas plásticas con antioxidantes retarda al menos por dos meses el deterioro en la calidad química y bioquímica del músculo de sierra durante su almacenamiento en congelación por 4 meses a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Este tipo de estudios son de gran relevancia dentro de la industria pesquera, sobre todo en nuestra región, ya que abre un campo de estudio que podría tener un gran impacto en la conservación de pescados destinados a exportación.

INTRODUCCIÓN

La actividad pesquera en el ámbito mundial representa un importante dinamismo, su importancia, como actividad económica radica en su capacidad de generar alimentos, empleo y divisas que contribuyen a satisfacer las necesidades de la sociedad, siendo un valioso instrumento para impulsar el desarrollo. Dentro de esta actividad, a nivel nacional el estado de Sonora es considerado el mayor productor pesquero (SEMARNAP, 2000).

Desde el punto de vista nutritivo, el músculo de pescado puede compararse favorablemente con otros alimentos de origen animal como la carne de res, el huevo y la leche. Pero desde el punto de vista de obtención, conservación y procesado, los productos marinos difieren de los organismos terrestres, ya que llevan consigo una gran variedad de problemas relacionados con su dificultad de distribución debido a que son muy perecederos (SEMARNAP, 2000).

Una de las especies con mayor valor comercial en el estado de Sonora es la Sierra (*Scomberomorus sierra*), debido a su alto valor nutricional y demanda por el consumidor. Sin embargo, su alto contenido de lípidos (8-10%) lo hace susceptible a sufrir deterioro en su calidad aun cuando éste sea almacenado en congelación (Leland, 1997).

El deterioro del pescado comienza desde el momento de que este muere, y se ve afectado por una serie de cambios complejos que ocurren en el

tejido a consecuencia de sus propias enzimas, de las bacterias y de reacciones químicas, lo cual altera la calidad del producto (Haard, 1990). Cuando se habla de calidad se está refiriendo básicamente a la apariencia estética y fresca, o al grado de deterioro que ha sufrido el pescado (Huss, 1998).

Con el fin de evitar una alteración rápida de pescado se hace uso de técnicas para aumentar la vida de anaquel del producto como es el caso de la congelación, con la cual se puede conservar el producto por varios meses antes de que empiece a deteriorarse. Sin embargo, aún a temperaturas de congelación se puede presentar deterioro del producto. La utilidad del pescado crudo como material para fabricar productos puede verse limitada por una disminución en la funcionalidad de la proteína. La deterioración en el sabor del pescado congelado es debida principalmente a la oxidación de lípidos, y es probablemente influenciada por otras reacciones bioquímicas como la hidrólisis de lípidos, proteólisis y catabolismo nucleotídico, siendo la oxidación de lípidos el principal problema que se presenta en productos congelados, aún en especies con bajo contenido de grasa (Colomenero y Borderias, 1983).

Con la finalidad de prevenir las reacciones que degraden al alimento en congelación se puede recurrir al uso de otros métodos de conservación como el glaseado para evitar o disminuir una agregación proteica por efecto de la pérdida de humedad en el producto durante la congelación. Algunos compuestos que pueden actuar como agentes crioprotectantes en las proteínas del músculo de pescado son algunos polifosfatos, azúcares, polialcoholes,

aminoácidos, ácidos dicarboxílicos, etc. Mientras que para evitar deterioro del producto por efecto de la oxidación de lípidos se puede hacer uso de algunos agentes químicos, como los antioxidantes (Erickson, 1993,).

Los antioxidantes son compuestos que previenen o retardan la oxidación de grasas evitando que se de la formación de radicales libres. La utilización de estos compuestos aplicada directamente sobre el músculo de pescado esta regulada en los Estados Unidos por la FDA ya que altas concentraciones de antioxidantes como el Butil Hidroxitolueno (BHT) o Butil Hidroxianisol (BHA) pueden llegar a ser precursores de tumores cancerígenos, aunado a que su adición provocaría modificaciones en el sabor característico del pescado, por lo que se busca la adición de estos compuestos solo a concentraciones necesarias para evitar la oxidación lipídica (FDA, 1993).

Una alternativa para evitar el deterioro del alimento a temperaturas de congelación es la combinación de los antioxidantes con materiales de empaque adecuados, considerando el tipo de alimento, los cuales pueden ser adicionados durante la fabricación de las películas. Una de las funciones primarias del envasado de los alimentos es la protección y aseguramiento de la calidad del sabor. Dentro de dichas prioridades se puede mencionar: la protección contra el daño estructural que podría permitir la acción de enzimas cambiando así el sabor del alimento, prevenir la pérdida de compuestos del sabor por vaporización, protegerlo de la oxidación minimizando el contacto con

el oxígeno libre, e impedir la transferencia de olores externos del ambiente hacia dentro del alimento (Leland, 1997).

Chen y Yim. (1998) evaluaron el efecto de un antioxidante combinado con una película de empaque sobre la oxidación lipídica en músculo de pescado (tilapia, anguila y mero). Se detectó un efecto inhibitorio sobre dicha oxidación. Sin embargo, el estudio fue realizado incorporando el antioxidante (BHT) a la película de empaque (polietileno) sumergiéndolos en tolueno. Estudios donde el antioxidante se mezcle en la formulación de la película y se utilice en especies grasas del golfo de california, como la sierra, aún no se han llevado a cabo.

Actualmente se están realizando estudios en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo para evaluar el efecto de algunos antioxidantes presentes en los envases sobre la oxidación de aceites comerciales Sin embargo, como ya se mencionó no se han realizado trabajos en músculo de pescado, por lo que en base a la necesidad de obtener una mayor vida de anaquel en especies grasas de productos pesqueros es que se buscó establecer el efecto de una película plástica conteniendo un antioxidante durante el almacenamiento en congelación de la sierra.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la calidad química y bioquímica del músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*) envasado en un material plástico conteniendo un antioxidante, durante su almacenamiento en congelación.

Objetivos Específicos

Comparar el uso de dos películas plásticas con y sin antioxidante sobre la calidad física y química del músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*) almacenado en congelación.

Monitorear la formación de compuestos secundarios de la oxidación lipídica del músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*) durante su almacenamiento en congelación.

Determinar el efecto de la oxidación lipídica sobre la desnaturalización y agregación proteica en el músculo de sierra durante el periodo de almacenamiento en congelación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La Pesca en Sonora

La región mas importante en materia de pesca en nuestro país es la zona Noroccidental, la cual esta integrada territorialmente por las entidades de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit (INE, 2000).

Especialmente el estado de Sonora se encuentra ubicado en una de las zonas pesqueras más ricas del mundo debido a su diversidad climática, geológica y geográfica; gracias a estos factores en sus costas se encuentran una gran variedad de hábitats marinos. En las costas sonorenses se desarrolla una gran cantidad de especies comerciales, generando el 30% de la producción pesquera nacional y posicionándolas en el primer lugar de captura en el País. Sin embargo, la dieta en donde se incluye los pescados y mariscos no es común entre los sonorenses, inclinándose mas hacia las carnes rojas, por lo que el consumo del pescado no resalta en el ámbito nacional.

El Golfo de California presenta una gran riqueza en cuanto a especies marinas se refiere (SAGARPA, 2005), lo cual ha permitido que Sonora se haya caracterizado por ser uno de los principales estados con mayor producción pesquera en los últimos 20 años, ocupando en 2003 el primer lugar nacional en este renglón (Tabla 1). Este golfo cuenta con gran variedad de especies marinas, destacando principalmente en la producción de sardina, camarón de cultivo, macarela, calamar, sierra, jaiba y manta, entre otras. (SAGARPA, 2005).

Tabla 1. Volumen de la producción pesquera en peso vivo por entidad en el litoral del Pacífico durante el periodo 1992-2003.

<i>Entidad Federativa</i>	<i>1995</i>	<i>1996</i>	<i>1997</i>	<i>1998</i>	<i>1999</i>	<i>2000</i>	<i>2001</i>	<i>2002</i>	<i>2003*</i>
B.C.	183,004	162,077	201,546	185,445	173,839	172,591	135,877	122,293	114,756
B.C.S	130,461	199,509	201,846	105,658	121,517	145,228	168,166	190,943	186,809
Son.	358,919	408,756	371,542	239,503	301,033	369,110	514,098	538,838	547,042
Sin.	163,890	188,709	237,081	184,914	200,368	233,642	235,874	258,252	231,139
Nay.	14,592	14,298	17,943	17,729	17,444	17,288	17,886	19,353	30,219
Jal.	19,313	15,839	15,248	15,367	11,797	11,263	11,884	11,050	11,129
Col.	27,856	29,142	41,369	39,067	35,877	30,059	30,785	37,515	38,296
Mich.	30,759	32,250	25,762	19,444	18,288	20,665	21,154	21,871	22,723
Gro	24,138	18,926	18,078	8,875	6,180	3,962	4,194	4,183	5,667
Oax.	13,019	13,507	9,737	9,852	8,872	9,988	9,675	11,012	11,530
Chis	18,981	20,959	19,463	24,573	25,019	26,350	28,642	28,663	30,433

* cifras preliminares.

Fuente: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, con datos de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (2005).

Características de la Sierra (*Scomberomorus sierra*)

La sierra (*Scomberomorus sierra*) (Figura 1) es una especie de la familia *Scombridae*, de cuerpo alargado, fuertemente comprimido, hocico mucho más corto que el resto de la cabeza, número de branquiespinas en el primer arco branquial: 4 a 8 en la rama superior, 15 a 20 en la inferior (FAO, 1995; California fish and game, 1949; citado por Olivas, 1999). Su peso llega a ser hasta de 3.6 kg, con una talla máxima de 76 cm de longitud de horquilla. Esta especie es abundante en los meses de invierno (noviembre a marzo y en ocasiones en abril), su captura anual en los últimos 10 años ha sido superior a las mil toneladas (Tabla 2) (SAGARPA, 2005).

Composición Química del Músculo de Pescado

Los principales constituyentes del músculo de pescado son el agua (66-84%), proteínas (15-24%), lípidos (0.1-22%) y minerales (0.8-2%). Esta composición puede variar debido a múltiples factores que pueden ser intrínsecos como genética, fisiología, morfología; o bien, a factores ajenos a la especie como el medio ambiente y alimentación entre otros (Sikorski y Pan, 1990). Antes del desove el valor nutricional del músculo es mayor, debido quizás a la poca actividad que se da en este período, aumentando principalmente su contenido de lípidos (Sikorski y Pan, 1990).



Figura 1. Anatomía externa de la sierra del Golfo de California (*Scomberomorus sierra*)

Fuente: www.mexfish.com/fish/srra/srra.htm

Tabla 2. Volumen de producción anual de sierra en el estado de Sonora, litoral del Pacífico y a nivel nacional.

<i>Entidad</i>	<i>1995</i>	<i>1996</i>	<i>1997</i>	<i>1998</i>	<i>1999</i>	<i>2000</i>	<i>2001</i>	<i>2002</i>	<i>2003</i>
Nacional	12810	16792	12794	11277	13647	11978	11279	10938	12416
Pacifico	5137	5742	5405	3896	5265	6261	5959	4815	5251
Sonora	1447	1509	1372	2037	2605	2300	2157	1983	2015

Fuente: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, con datos de la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (2005).

Lípidos Presentes en el Músculo de Pescado

La palabra lípido proviene del griego *lipos*, que significa grasa y cuya aplicación no ha sido bien establecida; originalmente, se definía como “una sustancia insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos. Sin embargo, algunos autores contemplan como lípido solo aquellas moléculas que son derivados reales o potenciales de los ácidos grasos y sustancias relacionadas, con lo cual se excluyen terpenos, carotenoides y colesterol, pero no los esterés de este último (Badui, 1993).

Los lípidos desempeñan muchas funciones en los tejidos; además de que son una fuente energética importante (cada gramo genera 9 kcal), muchos de ellos cumplen una actividad biológica. También actúan como aislantes naturales en el hombre y en los animales.

En los aceites vegetales y marinos los más abundantes son los ácidos grasos insaturados que debido a la presencia de dichas insaturaciones, tienen una gran reactividad química ya que están propensos a transformaciones oxidativas y de isomerización. Su temperatura de fusión disminuye con el aumento de las dobles ligaduras y ésta es siempre menor que la de los saturados para una misma longitud de cadena (Badui, 1993). Los que contienen sólo una insaturación se llaman monoenoicos o monoinsaturados, a los de más de una se les denomina polienoicos o poliinsaturados.

Proteínas Presentes en el Músculo de Pescado

Las proteínas son polímeros altamente complejos, constituidos por veinte diferentes aminoácidos. En la gran importancia que tienen estas a nivel biológico está implícito en su nombre, que deriva del griego *proteois* que significa “ser primero” (Badui, 1993). Resulta de fundamental importancia el entender las propiedades físicas, químicas, nutricionales y funcionales de las proteínas, así como los cambios que experimentan sus propiedades durante el procesamiento de alimentos con la finalidad de mejorar la calidad de los productos terminados (Srinivasan, 1996).

Todos los organismos marinos, como el pescado, crustáceos y moluscos son importante fuente de proteína para el ser humano (Shahidi y col, 1992). El músculo de pescado contiene diferentes tipos de proteínas y además presenta otros compuestos que contienen nitrógeno a los cuales se les llama nitrógeno no proteico (Haard, 1995).

Las proteínas del músculo de pescado, al igual que las de otro tipo de músculo, pueden ser clasificadas en miofibrilares, sarcoplásmicas y del estroma (Shahidi, 1992).

Proteínas Sarcoplásmicas. Este grupo lo constituyen las proteínas de la célula muscular que no están asociadas al aparato contráctil. Tienen la propiedad de ser solubles en agua y en soluciones salinas diluidas y se componen principalmente por mioglobina, cientos de enzimas y otras albúminas (Shahidi,

1992; Haard, 1995). El contenido de proteínas sarcoplasmicas es regularmente más alto en especies de peces pelágicos al compararlos con peces demersales. Por otro lado el músculo oscuro de algunas especies de pescado contiene menos proteínas sarcoplásmicas que el músculo blanco (Suzuki, 1987).

Se sabe que las enzimas que forman parte de las proteínas sarcoplásmicas son responsables del deterioro en la calidad *post-mortem* del pescado. Los principales grupos de enzimas que están involucrados en esta pérdida de calidad son las hidrolasas, oxidoreductasas y transferasas (Haard, 1995).

Proteínas Miofibrilares. Las proteínas miofibrilares forman parte del aparato contráctil o miofibrilla en la célula muscular (Haard, 1995). Las proteínas miofibrilares que se encuentran en mayor proporción en el músculo de organismos marinos son la miosina, actina, tropomiosina y troponinas C, I y T (Suzuki, 1981). Este tipo de proteínas pueden ser extraídas del músculo de pescado con soluciones salinas concentradas como el KCl 0.6 M (Shahidi, 1992).

La proporción de proteína miofibrilar en el músculo de pescado es más alta que en el músculo de animales terrestres, sin embargo las cantidades en cuanto a componentes individuales son muy similares (Haard, 1995). Es sabido que dichas proteínas experimentan cambios durante el proceso y resolución del *rigor mortis*, así como también durante un almacenamiento prolongado en

congelación; dichos cambios tienen un efecto en la textura de los organismos marinos, por lo que es importante su estudio (Shahidi, 1992).

Miosina. La miosina es la proteína miofibrilar más abundante en el músculo de pescado y se encuentra entre el 50 y 60% de la cantidad total de proteína de este tipo (Figura 2). Su molécula consiste en dos subunidades llamadas cadenas pesadas, cada una con un peso molecular de 200 kDa y de otras cuatro pequeñas subunidades llamadas cadenas ligeras con un peso molecular entre 16 y 30 kDa (Haard, 1995). El peso molecular de la miosina nativa es alrededor de 480 kDa (Hamoir, 1975). Sus cadenas pesadas se enrollan una con otra en la mayor parte de su longitud en una conformación de hélice alfa. Su extremo NH₂ terminal posee una estructura globular a la cual se le llama cabeza (Figura 2); las cadenas ligeras se unen a las pesadas al nivel de la cabeza (Brandon y Tooze, 1999).

Actina. La actina es la segunda proteína miofibrilar más abundante en el músculo de pescado, constituye aproximadamente el 20% del total de este tipo de proteínas (Shahidi, 1992).

La estructura de la actina (G-actina) es globular y está constituida por una cadena polipeptídica simple que contiene un nucleótido (ATP o ADP) y un catión divalente, calcio o magnesio (Hamoir, 1975). La G-actina polimeriza

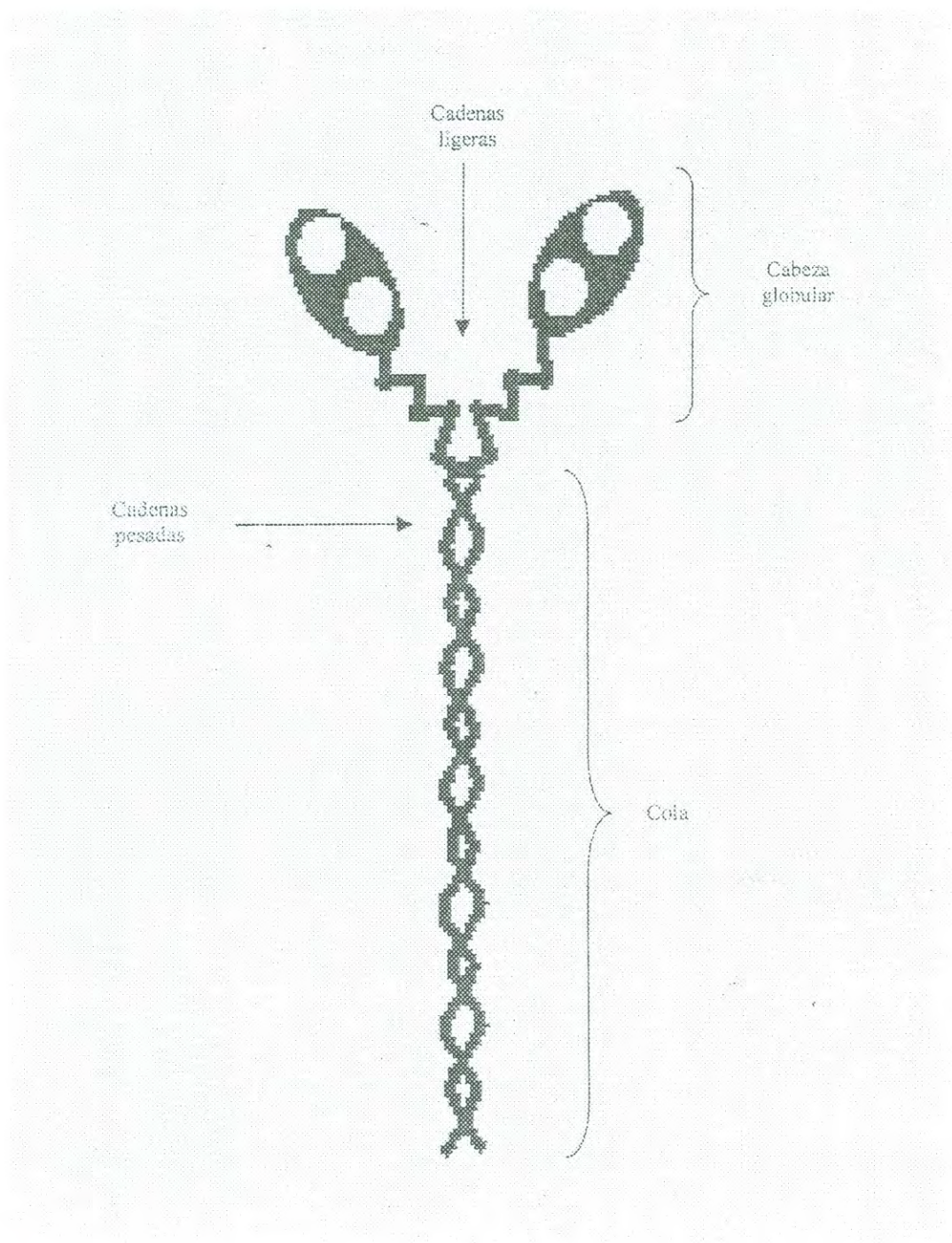


Figura 2. Modelo de la molécula de miosina
Fuente: Suzuki (1987)

a concentraciones salinas fisiológicas para formar filamentos llamados F-actina; algunos estudios han encontrado que las actinas provenientes de calamar, carpa y tilapia tienen un peso molecular similar a la actina proveniente del músculo de conejo (Seki y col., 1973; Tsuchiya y col., 1977).

Proteínas del Estroma

El residuo insoluble que queda después de remover las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares del músculo es conocido como estroma; los principales tipos de proteína encontrados en esta fracción son el colágeno y la elastina, las cuales son proteínas pertenecientes al tejido conectivo. Son solubles en soluciones diluidas de HCl y NaOH y contribuyen en un 10% de la proteína total del músculo de pescado (Shahidi, 1992).

Estructura del Músculo de Pescado

Se sabe que las fibras musculares del pescado son similares a las fibras del músculo estriado de animales terrestres (Howgate, 1979). Se ha establecido que las fibras del músculo esquelético son enormes células individuales formadas durante el desarrollo embrionario, resultantes de la fusión de células individuales. El núcleo de las células integrantes permanece en esta gran célula y se dispone justo debajo de la membrana plasmática (Alberts y col., 1983).

La mayor parte del citoplasma, una o dos terceras partes de su masa está formada por miofibrillas, las cuales son los elementos contráctiles de la fibra muscular. Las miofibrillas son estructuras cilíndricas que frecuentemente son tan largas como la célula muscular (Figura 3a). A su vez, cada miofibrilla esta formada por una cadena de minúsculas unidades contráctiles, llamadas sarcómeros, los cuales confieren a la miofibrilla su apariencia estriada. A gran aumento, en cada sarcómero puede verse una serie de bandas claras y oscuras (bandas A y bandas I).

Cada sarcómero esta separado del siguiente por una línea situada en el centro de cada banda clara, denominada línea o disco Z y además contienen un ensamblaje de filamentos parcialmente superpuestos y paralelos; los filamentos delgados están formados por actina, con proteínas asociadas que están unidas a los discos Z en uno de los extremos del sarcómero. Dichos filamentos (Figura 3b). Se superponen con los filamentos gruesos que se forman principalmente por miosina (Howgate, 1979; Alberts y col., 1983).

Cambios Post Mortem en el Músculo de Pescado

El pescado es un producto altamente perecedero debido a sus propiedades físicas y químicas. Debido a su alto contenido de agua, al tipo de proteínas y lípidos es altamente susceptible al deterioro una vez que es capturado.

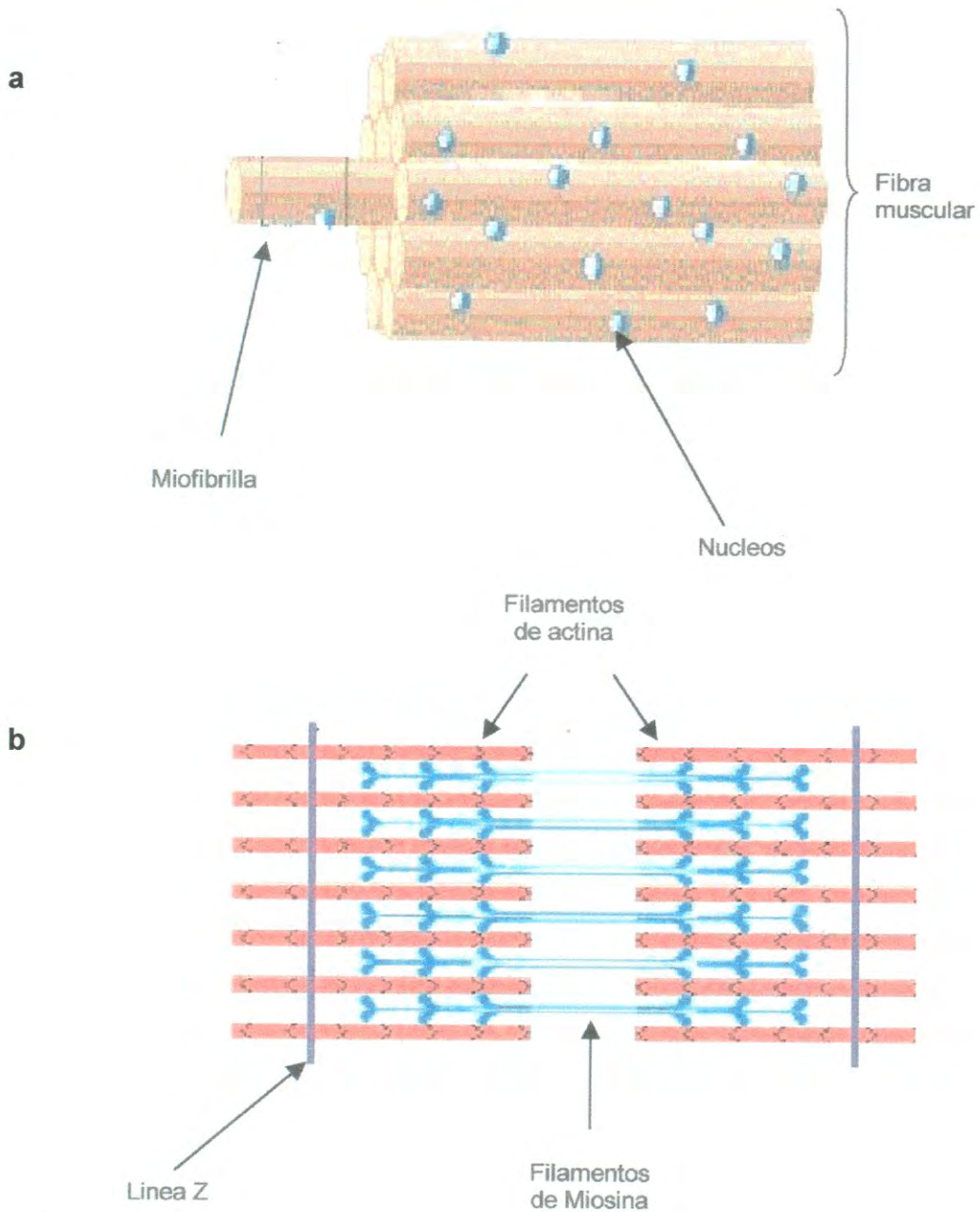


Figura 3. (a) Estructura de la Fibra Muscular. (b) Estructura del Sarcómero
Fuente: Alberts y col., (1983).

La alteración del pescado comienza desde el momento en que este muere, y se ve afectado por una serie compleja de cambios que ocurren en el tejido del pescado muerto a consecuencia de sus propias enzimas, de las bacterias y de reacciones químicas (Burges, 1987). Un factor crítico para controlar el deterioro del pescado es la temperatura, de ahí que se recomienda el uso de bajas temperaturas para conservar a los productos marinos.

Congelación como Método de Preservación de Alimentos

El fin de toda técnica de preservación de los productos alimenticios es prolongar el tiempo de conservación de los mismos, ya sea destruyendo microorganismos o inhibiendo su actividad y multiplicación (Gomez-Pastrana, 2002).

La congelación es una técnica de preservación de alimentos que provee una larga vida de anaquel a los mismos, y ha sido utilizada en una gran variedad de productos alimenticios (Rahman, 1999). Esta técnica de conservación no detiene por completo las reacciones físicas y químicas que gobiernan el deterioro de los alimentos, pero disminuye la velocidad de dichas reacciones (George., 1993).

Durante el proceso de congelación el agua disponible o congelable del alimento sufre un cambio de estado de líquido a sólido, convirtiendo la mayoría del agua en hielo; este cambio de estado se lleva a cabo debido a la remoción de calor latente del alimento (Rahman, 1999).

La disminución de temperatura alcanzada durante la congelación provoca que las velocidades de las reacciones de deterioro disminuyan y a su vez conforme la mayoría del agua se convierte en hielo, se lleva a cabo una disminución en la actividad de agua del alimento. Esto provoca una disminución en el crecimiento microbiano. Con relación a lo anterior, se puede decir que la congelación preserva a los alimentos a través de la combinación de reducción de temperatura y disminución en la actividad de agua (Garthwaite, 1997; Rahman, 1999).

Velocidad de Congelación y Calidad

Un factor importante en la calidad de los alimentos congelados es la velocidad de congelación. Generalmente cuando es rápida, se obtiene un alimento de mejor calidad que cuando es lenta. Esto se atribuye principalmente a las diferencias en el número y tamaño de los cristales formados durante el proceso de congelación. Es sabido que durante la congelación lenta, se producen cristales de hielo de mayor tamaño y en menor número al compararlos con un proceso de congelación rápida, lo que causa que dichos cristales ocasionen una mayor ruptura de las paredes celulares y pérdida de fluidos del alimento. En contraste con lo anterior, la congelación rápida produce un gran número de cristales de hielo de menor tamaño, por lo que la posibilidad de rompimiento de las paredes celulares se disminuye (Garthwaite, 1997).

Reacciones Bioquímicas en Músculo de Pescado Durante el Almacenamiento en Congelación

Durante el almacenamiento en congelación del pescado, el deterioro en la calidad debida a los microorganismos y a algunos procesos bioquímicos es disminuida. Buena calidad, pescado magro que ha estado correctamente congelado y empacado puede normalmente mantenerse entre -20 y -30 °C por mas de 1 año sin apreciable disminución en la aceptabilidad del consumidor (Mackie y col, 1986). Sin embargo, medidas organolépticas, cambios químicos y físicos han demostrado que la calidad del pescado se deteriora durante el almacenamiento en congelación. El deterioro en el sabor del pescado congelado es debida principalmente a la oxidación de lípidos, y es probablemente influenciada por otras reacciones bioquímicas como la hidrólisis de lípidos, proteólisis y catabolismo nucleotídico (Colomenero y Borderias, 1983).

Hidrólisis de Lípidos

Una extensa hidrólisis de fosfolípidos, basada en la formación de ácidos grasos libres y pérdida de fosfolípidos, fue reconocida por varios años. La descomposición enzimática de fosfolípidos en músculo de pescado puede ocurrir en un período más rápido durante el almacenamiento en congelación que por encima de su punto de congelación. El más rápido rango de reacción

bajo el punto de congelación aparece debido a la descompartimentalización más que a la deshidratación o efectos de concentración (Hanaoka y Toyomizu, 1979).

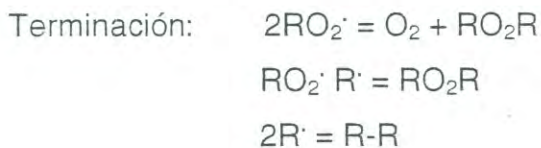
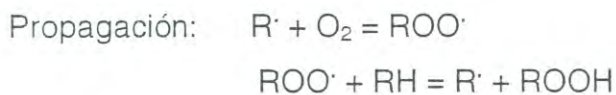
La formación de ácidos grasos puede contribuir al endurecimiento de la textura influenciando la desnaturalización proteíca y el deterioro del sabor por un aumento del deterioro lipídico. Esto sugiere que las grasas y las proteínas interactúan por reacciones hidrofóbicas (Matsumoto, 1980). Por ejemplo Oshima y col. (1984) mostraron que la adición de fosfolipasa A₂ al surimi de bacalao promueve disminución en las proteínas solubles en la sal durante el almacenamiento a -16°C.

Oxidación de Lípidos

La oxidación de lípidos es la principal causa del mal olor y es implicada en los cambios en textura. La oxidación de ácidos grasos insaturados en alimentos marinos involucra la formación de radicales libres e hidroperóxidos. La oxidación lipídica no enzimática inducida por iones metálicos como hierro, cobalto, y cobre (Ladikos y Lougovois, 1990). La oxidación lipídica en pescado congelado tiende a ocurrir en periodos más cortos en músculo y piel oscuros, la cual es estimulada por el tejido picado. De acuerdo a Yamaguchi y Nakamura (1984), el grado de oxidación lipídica en músculo se relaciona directamente con el contenido de grasa.

Diversos estudios han indicado que las reacciones catalizadas por enzimas pueden contribuir a la oxidación de lípidos en productos pesqueros, particularmente durante las primeras etapas de congelación (Frankel, 1984).

Mecanismo Básico del proceso de Oxidación Lipídica. La formación de radicales libres es el mecanismo básico sobre el cual se basa la oxidación de lípidos. Las siguientes tres etapas caracterizan este proceso:



Durante la iniciación el hidrógeno es abstraído del ácido graso, al irse el radical alquil del ácido graso. Combinado rápidamente con oxígeno, este ácido graso radical alquil es convertido a un radical hidropéroxido. La interrupción del hidropéroxido, en turno, es responsable de la futura propagación del proceso de radicales libres. Dada la energía de disociación del enlace LOO-H (aproximadamente 90 kcal/mol) y LO-OH (aproximadamente 44 kcal/mol), la descomposición espontánea es inverosímil a temperaturas de congelación (Terao, 1990). El rompimiento de los hidropéroxidos durante el almacenamiento en congelación es dominado por un electrón transferido de iones metálicos:



En alimentos y sistemas biológicos, el principal contribuyente de la descomposición de lípidos hidroperóxidos es el hierro de grupos heme y no hemes; las reacciones que involucran al ión ferroso son mucho más rápidas que con ión férrico. Finalmente cuando el contenido de radicales libres llega a ser bastante grande, se pueden combinar dos radicales libres para terminar el proceso. La oxidación de lípidos es un proceso muy complejo, en particular por que las reacciones de iniciación, propagación y terminación no son separadas por tiempos. La reacción de iniciación existe durante toda la vida de anaquel del producto. Que estas reacciones químicas y enzimáticas existen en tejido vivo es evidenciado por la ocurrencia en organismos aeróbicos de enzimas que pueden eliminar o detoxificar estos compuestos (peróxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc.). Por lo tanto, dichos compuestos es posible que estén presentes en el músculo de pescado desde antes de la cosecha (Marlyn y col., 1997).

Influencia de las Propiedades Físicas en la Oxidación de Lípidos. La oxidación de lípidos, si ocurre mediante caminos enzimáticos o no enzimáticos es influenciada por un gran número de factores físicos. Estos factores incluyen temperatura, actividad de agua, pH, luz y solubilidad del oxígeno. De estos, cambios en temperatura, actividad de agua y solubilidad del oxígeno son los que tienen mayor impacto en alimentos congelados (Erickson, 1997).

Temperatura. En general, a bajas temperaturas, la velocidad de reacciones químicas y enzimáticas disminuye. Las reacciones asociadas con la oxidación de lípidos no es la excepción aunque cambios conformacionales en las proteínas heme catalíticas pueden jugar un papel importante (Valpuesta y col., 1986).

Para "menhaden", almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se retarda fuertemente la oxidación lipídica comparada con el almacenamiento de la muestra a $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Hwang y Regenstein, 1988). Sin embargo, la estabilidad oxidativa es notada en el rango de 0 a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. En este rango, la desaceleración inducida por la temperatura es compensada por los efectos en el incremento de concentración de reactantes cuando el agua es removida en forma de hielo puro (Sanderson y col., 1993).

En el estudio de Tomas y Anon (1990), se congeló pechuga de pollo y músculo de salmón usando las técnicas de congelación rápida y lenta a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y almacenados a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 83 y 47 días, respectivamente. Mientras que hubo un pequeño pero significativo incremento en el valor de TBA durante el almacenamiento, no hubo diferencias significativas entre la congelación rápida y lenta a cualquiera de los tiempos de almacenamiento. Estos resultados demuestran que la temperatura de almacenamiento tiene un mayor efecto en la estabilidad oxidativa que el índice de congelación, esto particularmente cuando ocurre fluctuación de la temperatura durante el almacenamiento (Bilinski y col., 1981).

Actividad Acuosa. El agua puede tener efecto pro- y antioxidante en las reacciones oxidativas de los lípidos. Mientras que el agua puede actuar como antioxidante por la hidratación de los catalizadores metálicos a muy bajos contenidos de agua, el rango de actividad de agua encontrado en alimentos congelados promueve la oxidación con la solubilización de los catalizadores metálicos. El rango de actividad de agua encontrado en la porción líquida de atún congelado es de 0.810 a 0.968 (Ohta y Tanaka, 1978). Por consiguiente, una disminución en el contenido de humedad sirve sólo para concentrar los catalizadores.

Área Superficial y Solubilidad al Oxígeno. El oxígeno es un componente esencial en la oxidación lipídica. Como tal, los sistemas de alimento congelados son particularmente susceptibles a la oxidación lipídica debido a que la competencia y otras reacciones que requieren oxígeno son inhibidas (Gray, 1978). Esto respalda la idea de que retirar el oxígeno de la superficie de los alimentos puede disminuir las reacciones de oxidación lipídica. Numerosos estudios han demostrado que los empaques al vacío retardan la oxidación de los lípidos, el glaseado del producto también ha sido aplicado para actuar como barrera, esto potencialmente reduce el contacto del oxígeno con el alimento (Erickson, 1997).

Influencia de la Composición Química en la Oxidación de Lípidos. La composición química en alimentos congelados ha tenido un impacto directo sobre el rango y extensión de la oxidación de lípidos que ocurre en el producto. El más notable componente es el substrato lípido pero otros también juegan un papel significativo, incluyendo iniciadores, catalizadores e inhibidores. Dentro de cada una de estas categorías, un amplio rango de componentes tiene varios impactos en los procesos de oxidación existentes (Erickson, 1997, 1997).

Los mecanismos enzimáticos y no enzimáticos han sido identificados como potenciales causas de la iniciación de la oxidación de los lípidos en alimentos. La relativa importancia de estas fuentes en productos alimenticios va a ser dependiente no solo de aquella concentración inicial pero puede ser afectada por la exposición de producto a procesos de tratamiento como el calor antes del almacenamiento.

Fuentes de Iniciación Enzimática. Una de las enzimas relacionadas a menudo con la iniciación de la oxidación lipídica es la lipoxigenasa. Específicamente, esta clase de enzimas catalizan la adición del oxígeno molecular al *cis-cis*-4-pentadieno contenido en el ácido graso insaturado convirtiéndolo en un dieno conjugado estereoespecífico producto del ácido graso hidroperóxido (Kanner y col., 1987).

Fuentes de Iniciación no Enzimática. La transición de metales activada por Redox es el principal factor que cataliza la oxidación de lípidos en sistemas biológicos. Particularmente el hierro es bien conocido como catalizador de la oxidación lipídica. En su forma no heme, participa en la producción de especies de oxígeno reactivo, el hidroxil radical ($\text{OH}\cdot$), por la vía de la reacción clásica de Fenton:



Y es particularmente efectivo cuando Fe^{3+} puede ser reciclado a Fe^{2+} por varios agentes reductores.

La habilidad de las proteínas heme para promover la peroxidación de los lípidos ha sido demostrada por varios investigadores. Un mecanismo de esta activación involucra la descomposición del ácido graso hidroperóxido preformado a radical peróxido los cuales en la presencia de oxígeno propagan la peroxidación de lípidos (Tappel, 1953).

El segundo mecanismo por el cual las proteínas heme activan el proceso oxidativo por la generación de un hidrógeno peróxido activado intermediario capaz de iniciar la oxidación de lípidos. Seguida de una oxidación mas extensiva, sin embargo, un incremento del grupo hierro no heme de la mioglobina y hemoglobina ha sido demostrado que su exposición tiene un efecto sobre el peróxido de hidrógeno. Esas condiciones pueden acentuar la participación del hierro vía generación de especies oxígeno activo tales como el radical hidroxilo (Erickson, 1997).

Consecuencias de la Oxidación Lipídica. La oxidación de lípidos en alimentos congelados conduce a una disminución en la calidad. Mientras las pérdidas pueden no ser evidentes en primeras etapas de la oxidación, en las siguientes etapas las pérdidas pueden ser vistas en el sabor, apariencia, valor nutricional o funcionalidad de la proteína (Erickson, 1997).

Deterioro en la Calidad del Sabor. Los hidroperóxidos de los ácidos grasos producidos durante la propagación no tienen un efecto adverso directo sobre el sabor y el aroma de los alimentos. La descomposición de los hidroperóxidos a aldehídos y cetonas es responsable de los sabores y olores característicos que colectivamente son a menudo descritos por el término "rancidez". Mientras la descomposición procede lentamente a temperaturas de congelación, calentando el producto se acelera el rompimiento de estos hidroperóxidos formados durante el almacenamiento (Erickson, 1997).

El deterioro oxidativo del sabor puede ocurrir tanto en productos vegetales como animales durante el almacenamiento en congelación. Es más frecuente identificarlos con el músculo de productos alimenticios congelados que los vegetales debido a que son sometidos a procesos de escaldado antes de congelarse para inactivar enzimas peroxidasa y lipoxigenasa. Cuando no son sometidos a estos procesos, se presenta una alta actividad lipoxigenasa asociada con el desarrollo de mal sabor de productos congelados como maíz, frijol y chícharo (Erickson, 1997).

Deterioro en la Calidad del Color. La degradación de pigmentos asociada con pérdidas de color es otra manifestación de la oxidación lipídica. Esta degradación es de mayor importancia por que la primera impresión que el consumidor tiene sobre la aceptación del producto es la visual. En la carne roja y en productos pesqueros, los principales pigmento de preocupación son los pigmentos heme, y el color es dictado por la relativa concentración de mioglobina púrpura (Mb), oximioglobina rojo brillante (MbO₂) y metamioglobina café (MetMb). Mientras la decoloración va ocurrir durante el almacenamiento en refrigeración, es conocido que el congelado/descongelado acelera la autooxidación de la mioglobina (Lanari y Zaritzky, 1991).

Funcionalidad de la Proteína. Los procesos oxidativos continúan desnaturalizando en las proteínas en muchos materiales biológicos durante el almacenamiento en congelación. Esta es particularmente en músculo o tejidos en plantas y en suspensiones celulares que contienen lípidos y peroxidante. Las proteínas expuestas a un medio oxidante son muy susceptibles a modificaciones químicas, como la destrucción de aminoácidos, péptidos y formación de complejo lípido-proteína. La cantidad de varios agentes oxidantes son enzimas, grupo heme, y la transmisión de metales que pueden ser liberados por organelos celulares o derivados de componentes inactivos durante la congelación y el almacenado de igual manera. Estos agentes

oxidantes pueden reaccionar con cualquier proteína directa o indirectamente con los lípidos o radicales libre no lípidos, provocando alteraciones en las proteínas. Muchos de los productos de la degradación de lípidos, incluyendo malonaldehído, son capaces de crear un entrecruzamiento con los polipéptidos y también de generar la agregación de proteínas (Erickson, 1997).

Utilización de Antioxidantes para Prevenir la Oxidación Lipídica en Alimentos Procesados

Los antioxidantes son generalmente clasificados en dos distintas categorías:

1. Antioxidantes primarios que reaccionan directamente con los radicales libres, inhibiendo así la propagación.
2. Antioxidantes secundarios que inhiben la iniciación y reacciones de ramificación.

La función predominante de los antioxidantes primarios es la donación de hidrógenos al radical libre del lípido convirtiéndose en radical libre ($\text{LOO}\cdot + \text{AH} = \text{LOOH} + \text{A}\cdot$). El radical libre del antioxidante puede combinarse con otro radical peróxido del lípido o con otro radical antioxidante para terminar la reacción. Ejemplos de antioxidantes primarios encontrados endógenos en sistemas alimentarios incluyen a los tocoferoles, ácido ascórbico, flavonoides, carnosita y glutathione.

La efectividad de los antioxidantes primarios es dependiente de su estructura química, incluyendo la habilidad para donar electrones, su estabilidad de radical antioxidante, y su carga (Buettner, 1993).

Los antioxidantes secundarios incluyen liberadores y secuestrantes de oxígeno ejemplos de liberadores que disminuyen el nivel de oxígeno activo incluyen superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y carotenoides. Ejemplos de agentes quelantes incluyen citratos, fosfatos, ceruloplasmina y algunos de los aminoácidos libres. Al igual que para los radicales liberadores, concentraciones o reactividades de varios de los liberadores de oxígeno, han sido encontrado que disminuyen durante el almacenamiento en hielo (Bjerken y Johnsen, 1995).

Los antioxidantes se adicionan directamente al alimento. Sin embargo, las regulaciones sanitarias están restringiendo su uso de forma directa en algunos alimentos, de ahí el interés de tenerlos en los envases donde se coloque el producto.

Utilización de Materiales de Envase como Métodos Alternativos para la Protección de Alimentos Procesados

Además de la congelación, uno de los métodos mas sencillos y versátiles para proteger los alimentos procesados es el uso de envases adecuados, considerando el tipo de alimento. La selección del material de envase y

condiciones del mismo generalmente están en función del costo y los aspectos de la calidad que se desea proteger (Biradar y col., 1995).

La utilización de los plásticos para el envasado de alimentos comenzó por los años 50, adquiriendo una importancia creciente y desplazando de forma progresiva para algunos usos a otros materiales clásicos. Los polímeros aportan ligereza, flexibilidad y versatilidad adaptables a las necesidades que plantea el envasado de todo tipo de alimentos (Catalá, 2000).

Además de las ventajas anteriormente expresadas, los polímeros tienen limitaciones específicas como las interacciones entre el material de envase, el ambiente y el producto alimentario. Sin embargo, dichas limitaciones pueden llegar a ser usadas de una manera que favorezca la conservación del alimento como es el caso de los envases "activos". Los plásticos más empleados en la industria alimentaria son: polietilenos, polipropilenos, poliésteres y los derivados de vinilo (Chao y Rizui, 1998).

Una de las funciones primarias del envasado de los alimentos es la protección y el aseguramiento de la calidad del sabor. Dentro de las prioridades del aseguramiento del alimento se puede mencionar: protección contra el daño estructural que podría permitir la acción de enzimas que cambian el sabor, pérdida de compuestos del sabor por vaporización, proteger la pérdida por oxidación minimizando el contacto con el oxígeno libre e impedir la transferencia de olores externos del ambiente hacia el alimento (Leland, 1997).

Las propiedades de los plásticos son determinadas por la naturaleza química y física de los polímeros utilizados en su fabricación, estas dependen de su estructura química, peso molecular y grado de cristalinidad; además existen factores que afectan la densidad de los polímeros y la temperatura a la cual sufren cambios físicos.

En la tabla 3 se presenta un condensado de las propiedades más importantes para los plásticos utilizados en alimentos. Las propiedades térmicas [(temperatura de fusión o ablandamiento (T_m), temperatura de transición vítrea (T_g)] determinan si el material es adecuado para aplicar un tratamiento térmico al alimento.

Tabla 3. Propiedades físicas y químicas de los materiales utilizados en envases de alimentos

Polímero	Tm (°C)	Mecánicas	Químicas	Permeabilidad al O ₂ (mL/mil/m ² /día)	Ópticas
	Tg (°C)			Permeabilidad al vapor de agua (g/mil/m ² /día)	
PEBD	95-105	Muy flexible, estirable	Sensible a grasas y solventes orgánicos	3900-13000	Transparente
	-25			2.0-3.2	
PEAD	130-135	Flexible	Sensible a grasas y solventes orgánicos	2850	Translúcido
	-55			2.1	
BOPP	140	Rígido, resistente	Inerte	1450-1940	Transparente en películas delgadas
	-20			1.0-1.7	
PS	240	Rígido, frágil	Sensible a grasas	5690	Transparente, excepto expandido
	100			110	
PVC	80	Rígido en tarros, blando en películas	Inerte	620-2248	Transparente
	172			140-171	
PVd C	172	Rígido y resistente, flexible en películas	Inerte	15.5	Transparente en películas
				3.1	
PET	250	Rígido y resistente	Inerte	52-130	Transparente
	100			27.5	
PA	210-260	Rígido y resistente	Sensible a humedad	15.5 (seco)	Transparente en películas, translucido en tarros
	50-60			126	
PC	172	Rígido, resistente y duro	Sensible a humedad	13950-14725	Transparente
	140-150			10.9-17.1	
EVOH	60	Rígido, resistente y duro	Muy sensible a humedad	0.5 (seco)	Transparente
				87	
EVA	105	Muy elástico, adherible	Inerte	3984 Intermedia	Transparente

Fuente: Soto-Valdez y col., 2002; citado por Dorado-Rodelo, 2004

MATERIALES Y METODOS

Materia Prima

Se utilizó músculo de Sierra (*Scomberomorus sierra*) la cual fue capturada en el Golfo de California a bordo de una panga con red agallera (mes de noviembre del 2004). Se aplicó un eviscerado, lavado y fileteado del músculo para posteriormente envasarse individualmente en las películas con y sin antioxidante (PCA y PSA), los productos se congelaron a -40°C y posteriormente se almacenaron en una cámara de congelación a -25°C por un periodo de 4 meses. Las determinaciones experimentales en las muestras de músculo para establecer el comportamiento de la calidad *posmortem* de la especie se realizaron cada mes durante su almacenamiento.

Análisis Proximal

Para el análisis proximal se emplearon 3 organismos, realizándose las determinaciones correspondientes por triplicado. El contenido de lípidos proteína y humedad se realizaron de acuerdo a lo establecido por Woyewoda en 1986. Para la determinación de proteína se utilizó un factor de conversión de 6.25 y un equipo Micro-kjeldhal (Rapad Destillation Unit, LABCONCO).

Congelación por Inmersión

Para llevar a cabo este proceso, se utilizó una mezcla frigorífica compuesta por acetona y dióxido de carbono sólido. La temperatura de dicha mezcla durante el proceso de congelación fue de -40°C . El proceso de congelación llegó a su fin cuando el centro del filete alcanzó -25°C ; dicha temperatura se midió utilizando un termopar (Corning Inc, Big Flags, NY). Una vez congelado el producto, se almacenó a $-25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ empacado en los envases (con y sin antioxidante) sellados.

Determinación del pH

El pH es uno de los métodos más utilizados para determinar la calidad en músculo de pescado ya sea por acción bacteriana o por actividad enzimática endógena. Sin embargo, a temperaturas de congelación (-25°C) es poco probable que se presenten estos fenómenos. Modificaciones en el pH a dichas temperaturas pueden presentarse por efecto de la formación de peróxidos durante la oxidación lipídica. Las mediciones se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Woyewoda y col. (1986). Se homogenizaron 10 g de músculo con 20 mL de agua destilada por 1 min. La determinación se llevó a cabo en un potenciómetro digital CORNING modelo 430.

Análisis de Firmeza

Durante el almacenamiento en congelación del músculo de pescado se presentan varios fenómenos, entre ellos el entrecruzamiento de proteínas gracias al formaldehído presente en el músculo o liberado durante la oxidación lipídica, lo cual provoca una mayor rigidez en la textura del producto. La medición de firmeza, expresada como resistencia al corte, se realizó utilizando el texturómetro Instron modelo 4465 con una celda Warner–Bratzler de 500 Kg, y una velocidad de 50 mm/ min. Los filetes se dividieron con un grosor de 1 cm cada uno de ellos utilizando una cantidad de 10 para cada uno de los filetes. La firmeza se reportó como Newtons/mm².

Obtención del Extracto Lipídico

Algunas determinaciones químicas como la cuantificación de peróxidos o de dienos conjugados requieren ser cuantificados directamente sobre el aceite puro de pescado, es por ello que se realizó una extracción en frío de dichos compuestos por medio de la técnica de Bligh y Dyer (1959). 50 gr de músculo fueron homogenizados durante 1 min con metanol/cloroformo/agua (100/50/30 mL) y se dejaron en reposo por 20 min, posteriormente se adicionaron 50 mL de cloroformo y se dejó reposar por 15 min. Se adicionaron 50 mL de agua y se filtró a un embudo de separación (reposar por 2 h). Se tomó una alícuota de 5

mL para cálculo de lípidos totales. Por último, el solvente se evaporó en un rotavapor para obtener el extracto lipídico final.

Ácidos Grasos Libres

Las primeras reacciones que se llevan a cabo durante la oxidación de lípidos es la hidrólisis de los triacilglicéridos para formar los ácidos grasos libres. La cuantificación de dichos compuestos presentes en el músculo se realizó siguiendo la técnica descrita por Woyewoda en 1986, donde se mezclaron 10 gr de muestra molida con 50 mL de cloroformo y 50 mL de metanol y se agitó durante 1 min. La mezcla se filtró en un embudo Buchner con papel filtro #4 y se aclaró con una cantidad pequeña de cloroformo. Se adicionaron 45 mL de agua destilada al filtrado, posteriormente se pasaron a un embudo de separación y se dejó reposar de 2 a 3 h. Después del equilibrio usando un embudo normal se filtró lentamente para separar la capa de cloroformo en un matraz volumétrico de 100 mL con sulfato de amonio y se aforó con cloroformo. Posteriormente se pipeteó 10 mL del cloroformo filtrado en un platillo de aluminio y se evaporó el solvente para determinar el porcentaje de grasa extraída. Al resto de la solución se le adicionó 70 mL de 2-propanol, 35 mL de metanol y 8 gotas de púrpura de meta-cresol como indicador. Por último se tituló con NaOH 0.05 N hasta que la muestra perdió el color violeta. Se corrió un blanco en las mismas condiciones que la muestra; el índice de ácidos grasos libres se reporta como porcentaje de ácido oleico.

Índice de Peróxido

Durante la oxidación lipídica se produce una serie de metabolitos intermedios (radicales peróxidos) por efecto de la interacción de los lípidos con el oxígeno, los cuales indican que el producto ya empieza a deteriorarse. Para cuantificar el contenido de dichos compuestos se recurrió a la determinación del Índice de Peróxido, la cual se llevó a cabo según la técnica descrita por Woyewoda y col. (1986). Se utilizaron 3 g de la muestra obtenida durante la determinación de grasa y se colocaron en un matraz de 250 mL. Posteriormente se le agregaron 30 mL de solución 3:2 de ácido acético-cloroformo y 0.5 mL de KI saturado. La mezcla se dejó reposar por 2 min con agitaciones eventuales.

Posterior a la agitación se le agregaron 30 mL de agua destilada y 1 mL de almidón como agente colorante (la mezcla se torna azul). Por último, la solución se tituló con tiosulfato de sodio 0.1 N hasta que se perdió el color; el índice de peróxido se reportó como meq de peróxidos por kg de lípido.

Ácidos Dienólicos Conjugados

Debido a que los radicales peróxido son metabolitos altamente inestables, lo cual dificulta su cuantificación en músculo de pescado, además de que no son los únicos compuestos formados durante las etapas intermedias de la oxidación es que se recurre a la cuantificación de dienos conjugados formados como productos intermedios y precursores de los productos finales

durante la oxidación lipídica; para lo cual se realizó la determinación espectrofotométrica de ácido dienólico conjugado descrita por la A.O.C.S. (1997) donde se pesaron de 90 a 130 mg de la muestra (extracto lipídico) en un matraz volumétrico de 100 mL disueltos con iso-octano puro (calentar si es necesario). Se enfrió a temperatura ambiente, y se dejó reposar por 15 min. Por último se midió la absorbancia de la solución a 233 nm, usando el solvente como blanco.

$$\% \text{ Ácidos dienólicos conjugados} = 0.84 \left(\frac{A_s - K_o}{bc} \right)$$

Donde:

K_o = Absorbancia de los grupos ácidos o ésteres

= 0.07 para ésteres

= 0.03 para ácidos

A_s = Absorbancia a 233 nm

b = longitud de la celda en cm

c = concentración de la muestra en gramos por litro

Prueba del Ácido Tiobarbitúrico

Una vez que la oxidación lipídica esta en sus etapas finales se produce una serie de productos, los cuales son responsables del mal olor y sabor en los alimentos; dichos compuestos son principalmente aldehídos y cetonas. Para cuantificar estos metabolitos secundarios es que se hace uso de la prueba de ácido tiobarbiturico (TBA) descrita por Woyewoda y col. (1986). Se mezclaron 10 gr de muestra con 35 mL de agua destilada y se homogenizó por 2 min. Se

transfirió la muestra homogénea a un vaso de 250 mL y se agregó agua hasta llegar a 110 g. Posteriormente se ajustó el pH a 1.5 con HCl 4N, este pH se debe mantener por lo menos 3 minutos. El pH debe estar cuidadosamente estandarizado con solución buffer a pH de 1 y 2. Después se transfirió la muestra a un matraz bola de 500 mL con 100 mg de ácido etilendiamino tetracético (EDTA) y propilgalato. Posteriormente se destilaron 50 mL en un aparato de destilación (35 min o menos).

Se agregaron 5 mL de la muestra destilada en tubos con tapón de rosca, al mismo tiempo se preparó un blanco con 5 mL de agua destilada. Posteriormente se agregaron 5 mL del reactivo de TBA y se agitaron firmemente, después se calentaron los tubos con las muestras por 45 min en un baño de agua caliente. Por último se determinó absorbancia a 538 nm después de media hora de enfriamiento al aire libre; el índice de TBA se reportó como mg de malonaldehído por kg de muestra.

Electroforesis en Gel de SDS-poliacrilamida

Con la finalidad de establecer el perfil electroforético de las proteínas del músculo de sierra sometido a los dos diferentes tratamientos de conservación (envases con y sin antioxidantes) se utilizó un sistema de extracción de proteínas con urea 8M, fenilmetil-sulfonil fluoruro 0.1mM, EDTA 0.1mM, azida de sodio 0.01% y KCl 0.6M. Para la extracción de proteínas se mezclaron 3 gr de muestra con 30 mL de solución de urea, y fue homogenizada por 2 min en

un homogenizador de tejido Biospec modelo 133 (Biospec Co, Bartlesville, OK), registrándose el volumen del extracto.

Una vez que se obtuvo el extracto de urea, éste se mezcló con una solución amortiguadora en condiciones desnaturalizantes y reductoras [presencia de mercaptoetanol (ME)] y en condiciones desnaturalizantes [ausencia de mercaptoetanol (ME)], en una proporción 1:3 (muestra:solución amortiguadora). La mezcla se calentó durante 4 minutos en agua a ebullición y se almacenó en congelación para su posterior análisis. La composición de la solución amortiguadora de la muestra fue la siguiente:

Para condiciones desnaturalizantes y reductoras: 25% de TRIS-HCl 0.5 M, pH 6.8, 20% de glicerol, 40% SDS al 10%, 10% de ME, 5% de agua deionizada y 0.03% azul de bromofenol.

Para condiciones desnaturalizantes: 25% de TRIS-HCl 0.5 M, pH 6.8, 20% de glicerol, 40% SDS al 10%, 15% de agua deionizada y 0.03% azul de bromofenol.

Los análisis electroforéticos se realizaron de acuerdo al método de Laemmli (1970), utilizando un equipo MINIPROTEAN III (Biorad Laboratorios Chemical, Hercules, CA). Los geles superior y concentrador se prepararon al 4 y 10% de acrilamida respectivamente. Se aplicaron 100 µg de proteína presentes en el extracto con urea. La corrida de electroforesis se llevó a cabo a temperatura de refrigeración con un voltaje de 120. Las bandas fueron teñidas con azul de Comassie al 0.1 % (p/v).

Estudio Histológico

El tejido del músculo de sierra sin congelar y el sometido a los 2 diferentes tratamientos se observó a través de microscopía óptica con la finalidad de observar los cambios en la estructura muscular. El músculo de sierra se fijó en solución de formol al 10% para posteriormente ser deshidratado en un procesador de tejidos (TISSUE-TEK 11, Mishawaka, IN). El proceso de deshidratación utilizado se realizó de acuerdo a lo propuesto por Prophet y Milis, (1992). El protocolo de deshidratación se muestra en la Tabla 3. Posteriormente, los tejidos provenientes de la deshidratación se colocaron en un inclusor de parafina (HistoEmbedder, leica Nussloch, Germany) para obtener bloques con el tejido en parafina. A partir de dichos bloques se prepararon secciones (5 micras de grosor) con un microtomo (AG, Scientific Instruments, Bufalo, NY), para después teñir dichas secciones. En este estudio se utilizó la tinción diferencial de hematoxilina y eosina (Prophet y Milis, 1992) (Tabla 4), la cual permite elucidar la estructura general del músculo de sierra.

Tabla 4. Protocolo de deshidratación en el músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*).

Reactivo	Tiempo (horas)
Etanol 70%	2
Etanol + butanol 70%	3
Etanol + butanol 83%	3
Etanol + butanol 95%	1.5
Etanol + butanol 95%	1.5
Etanol + butanol 100%	2
Etanol 100%	2
Alcohol xileno	1
Xileno	1
Xileno	1
Parafina	1
Parafina	1

Tabla 5. Protocolo de tinción de hematoxilina y eosina de Harris.

Reactivo	Tiempo o Zambullidas
Xileno 1	5 minutos
Xileno 2	5 minutos
Etanol 100%	32 zambullidas
Etanol 95%	32 zambullidas
Etanol 70%	32 zambullidas
Etanol 50%	32 zambullidas
Agua destilada	32 zambullidas
Hematoxilina de Harris	15 minutos
Agua destilada	5 minutos
Alcohol ácido 1%	1 a 2 zambullidas
Lavar en agua destilada	
Agua amoniacal	3 minutos
Agua destilada	10 minutos
Etanol 80%	2 minutos
Solución eosina	2 minutos
Agua destilada	32 zambullidas
Etanol 50%	32 zambullidas
Etanol 70%	32 zambullidas
Etanol 95%	32 zambullidas
Etanol 100%	32 zambullidas
Xileno 2	5 minutos
Xileno 1	5 minutos

Análisis de Datos

La unidad experimental consistió en un envase experimental con un filete en su interior. El diseño experimental estadístico consistió en un arreglo factorial de dos factores, con un diseño completamente al azar, donde los factores fueron: tratamiento (dos niveles, el envase de polietileno PCA y el envase de polietileno PSA) y almacenamiento en congelación (cinco niveles, tiempo cero y cuatro meses). Los muestreos se llevaron a cabo cada mes durante el tiempo establecido. Todos los análisis y determinaciones se realizaron por triplicado.

Para los análisis se llevó a cabo un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, con una prueba de comparación de medias por el método de Tukey con un nivel de significancia del 5% en el paquete estadístico JMP versión 4.04.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Proximal del Músculo de Sierra

Se ha reportado que la composición química del músculo de pescado depende de factores tales como la especie, tamaño, madurez, sexo y actividad del espécimen. En muchas ocasiones se puede llegar a encontrar grandes diferencias en la composición proximal, inclusive entre organismos de una misma especie. Dichas diferencias por lo general son atribuidas al estado de desarrollo sexual del organismo y a las condiciones de alimentación (Dunajski, 1979). También se ha reportado que el músculo de pescado contiene diferentes tipos y tamaños de células, por lo que también se puede llegar a encontrar diferencias en un mismo organismo de acuerdo a la localización anatómica en el músculo. Se ha observado que la proporción del músculo blanco y oscuro difiere continuamente a lo largo del cuerpo, teniendo este último una mayor concentración de lípidos y menos proteínas a lo largo del tejido (Love, 1988; Dunajski., 1979).

La composición química proximal del músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*) obtenida en este estudio fue la esperada (Tabla 5) al compararla con lo reportado por otros autores para músculo oscuro de pescado (aprox. 70% agua, 10% lípidos y 20% proteínas)(Erickson, 1997).

Tabla 6. Composición proximal del músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*) fresco^a.

<i>Determinación</i>	<i>Contenido (%)</i>
Humedad	70.94 ± 0.79
Proteína	20.64 ± 1.55
Grasa	9.45 ± 1.05
Cenizas	2.17 ± 0.19

^aLos porcentajes son valores promedio de 3 determinaciones. Organismos capturados en el mes de noviembre del 2004.

Congelación por Inmersión

Un proceso de congelación rápida es aquel en que la temperatura del centro del pescado disminuye de 0 a -5°C en dos horas o menos. Lo anterior fue propuesto ya que se sabe que justo debajo de los 0°C es la zona crítica para el deterioro mediante la desnaturalización proteica. Después de librar esa zona crítica, se recomienda bajar la temperatura del centro del filete a -20°C , lo cual equivale a que la temperatura promedio del músculo alcanza los -30°C . El tiempo tomado para alcanzar la temperatura de -20°C en el centro térmico del pescado es lo que se llama normalmente tiempo de congelación (Garthwaite, 1997; Jhonston y col., 1994).

En los filetes de sierra congelados por inmersión con la mezcla frigorífica de acetona + dióxido de carbono sólido (-40°C) se observó que sus centros alcanzaron los -23°C en 4 minutos. Tomando en cuenta la definición expuesta anteriormente, en el presente trabajo se puede considerar que se alcanzó la temperatura de almacenamiento (-25°C) por un método rápido (inmersión con mezcla frigorífica), además de que el rango de temperatura de 0 a -5°C fue alcanzado en un tiempo menor a 2 horas (Figura 3).

La importancia de asegurarse que los filetes de sierra alcanzaran la temperatura de almacenamiento (-25°C) por un método rápido radica principalmente en evitar la formación de grandes cristales de hielo durante el proceso de congelación.

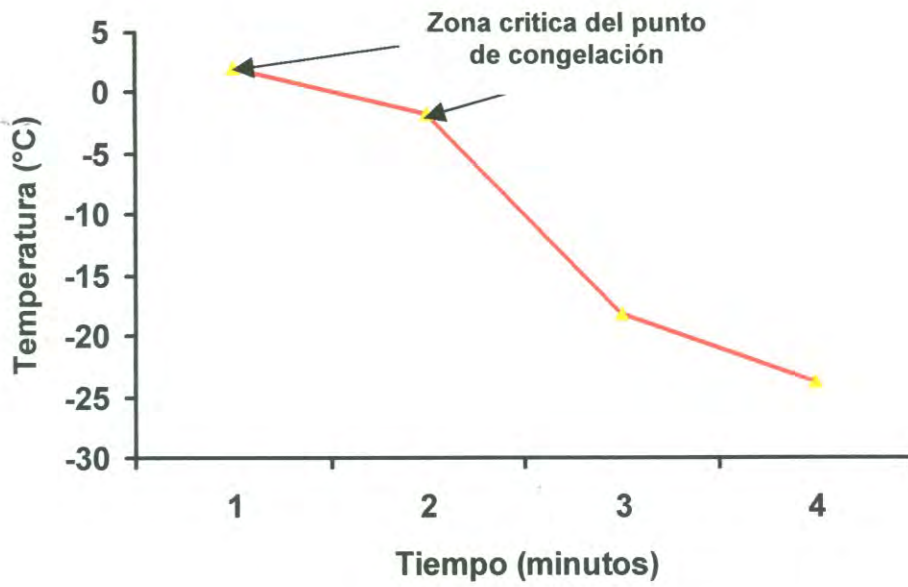


Figura 3. Curva de congelación por inmersión con mezcla frigorífica (acetona-dióxido de carbono sólido) de músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*). Los resultados son valores promedio de 3 repeticiones.

Dicha formación de cristales de mayor tamaño producto de una técnica de congelación lenta provocaría un aumento en la ruptura del tejido celular y por ende una mayor pérdida de estabilidad de las proteínas presentes en el músculo de pescado (De Man y col., 1980). El fenómeno anterior no es deseado ya que se busca evaluar la pérdida de dicha estabilidad en las proteínas del músculo de sierra por efecto de una interacción de metabolitos secundarios provenientes de la oxidación lipídica (Tironi y col., 2003).

pH

El descenso del pH a consecuencia de la producción de ácido láctico a partir de glucógeno en condiciones anaeróbicas es uno de los cambios postmortales más significativos que acontecen en el músculo de animales de abasto y productos marinos (Haard, 1992). El cambio en el pH también depende de la liberación de fósforo inorgánico debido a la degradación enzimática de ATP (Sikorski, 1990). La velocidad y los límites en los que desciende el pH son muy variables. En el caso de los organismos marinos, depende entre otros factores de la especie, método de captura y manejo postcaptura, así como del glucógeno de reserva, la cantidad de este compuesto al momento de la muerte determina el pH final y la calidad comestible del músculo (Haard, 1992).

La velocidad a la que cambia el pH después de la muerte depende de la temperatura de almacenamiento. Bilinski y col. (1983) reportaron que el pH del

pez perro almacenado a 10 °C, 5 °C y en hielo (0 °C) se incrementó desde un pH de 6.2 hasta valores de pH de 8.3 (10 °C), 7.2 (5 °C) y 6.5 (0 °C) en un tiempo de 7, 9 y 18 días, respectivamente.

En el caso del músculo de sierra los cambios de pH durante su almacenamiento en congelación se observan en la Figura 4. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras almacenadas en las PCA y PSA encontrándose un aumento gradual a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento, siendo significativo solo después de los 4 meses de almacenamiento para el músculo almacenado en los envases sin antioxidantes lo cual indica que el uso de películas plásticas probablemente retardó los cambios de pH durante el almacenamiento en congelación de las muestras, particularmente las almacenadas con antioxidantes, provocando con ello que el músculo de sierra mantenga su calidad por más tiempo.

Varios autores han reportado que un incremento en pH mayor de 0.4 unidades indica una pérdida significativa en la frescura de músculo de pescado, por lo que el pH final de 6.56 en los filetes almacenados sin antioxidantes por 4 meses comparados con el pH que se detectó en el músculo fresco (6.42) no sugiere dicho comportamiento, aun cuando estos dos tratamientos fueron estadísticamente diferentes.

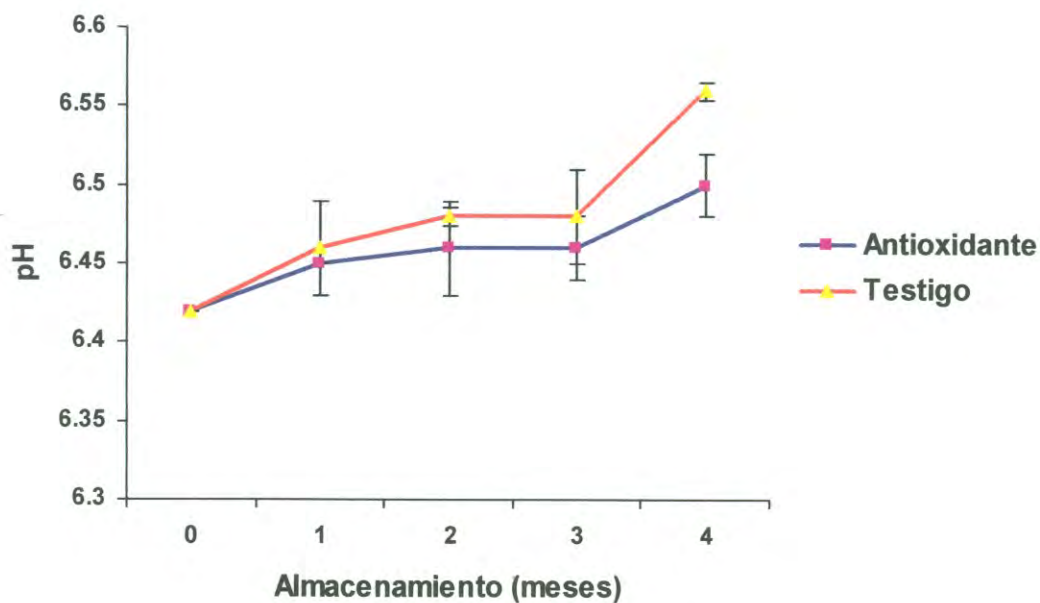


FIGURA 4. Cambios de pH en músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*) durante su almacenamiento en congelación. Los resultados son valores promedio de 5 determinaciones.

Obtención del Extracto Lipídico

Debido a la complejidad del músculo de pescado se hace difícil la cuantificación de algunos metabolitos o índices de deterioro de manera directa. Es por ello que se tiene que extraer al componente de mayor interés en el alimento, como es el caso de los lípidos en este estudio (Bligh y Dyer, 1959). Dicha extracción es con la finalidad de poder realizar mas eficientemente algunas evaluaciones del deterioro lipídico como la cuantificación de ácidos grasos libres, índice de peróxido y ácidos dienoicos conjugados. La susceptibilidad de los lípidos a las altas temperaturas hace más difícil su extracción del músculo de pescado, por lo que se controló este parámetro, ya que la temperatura de extracción nunca alcanzó los 40°C.

En este estudio se logró obtener un porcentaje de recuperación superior al 90% con respecto al contenido total de lípidos en el músculo de sierra, esto en cada mes de muestreo durante la etapa experimental (Tabla 6).

El comportamiento anterior sugiere que la estructura y conformación de los compuestos lipídicos y sus metabolitos formados no sufrió cambios significativos al momento de ser extraídos. Sin embargo, es necesario realizar otro tipo de determinaciones para asegurarse que los lípidos presentes en el músculo de pescado no sufren grandes cambios al momento de ser extraídos por este método.

Tabla 7. Extracción en frío de lípidos del músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*) mediante la técnica de Bligh-Dyer (1959).^a

<i>Tiempo de Almacenamiento (meses)</i>	<i>% de Recuperación de Lípidos</i>	
	<i>Película con antioxidante</i>	<i>Película sin antioxidante</i>
0	89.42 ± 0.42	88.31 ± 0.78
1	86.88 ± 0.68	87.23 ± 0.49
2	90.23 ± 1.02	87.36 ± 0.87
3	87.65 ± 0.74	89.44 ± 0.51
4	90.21 ± 0.49	87.27 ± 0.71

^a Los porcentajes de recuperación de lípidos están expresados con respecto al total de lípidos presentes en el músculo de sierra (9.45 g/100g). Los resultados son valores promedio de 3 determinaciones.

Letras diferentes, indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Ácidos Grasos Libres

Durante el almacenamiento en congelación, los lípidos del tejido muscular de pescado sufren cambios lipolíticos (enzimáticos) resultando en una acumulación de ácidos grasos libres (Woyewoda, 1986). La producción de ácidos grasos libres varía con la temperatura de almacenamiento, tipo de músculo, especie, contenido de grasa y temporada de captura.

Los ácidos grasos libres pueden ser producidos a partir de triglicéridos o de fosfolípidos dependiendo del tipo de músculo. La producción de dichos compuestos se ha reportado durante el almacenamiento en congelación de varias especies como bacalao, macarela, atún, arenque, sardina, trucha, salmón y calamar (Woyewoda, 1986).

En este estudio se logró detectar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los dos tratamientos después del periodo de almacenamiento (4 meses), encontrándose valores mayores para las muestras almacenadas en PSA. Sin embargo, se detectó también un incremento gradual y significativo después del segundo mes de almacenamiento para los filetes almacenados en PCA, aunque para la muestra testigo dicho incremento fue significativo desde el primer mes de almacenamiento (Figura 5). El comportamiento anterior sugiere que el uso de películas plásticas con antioxidantes retardó significativamente la formación de ácidos grasos libres por dos meses en comparación con la película testigo.

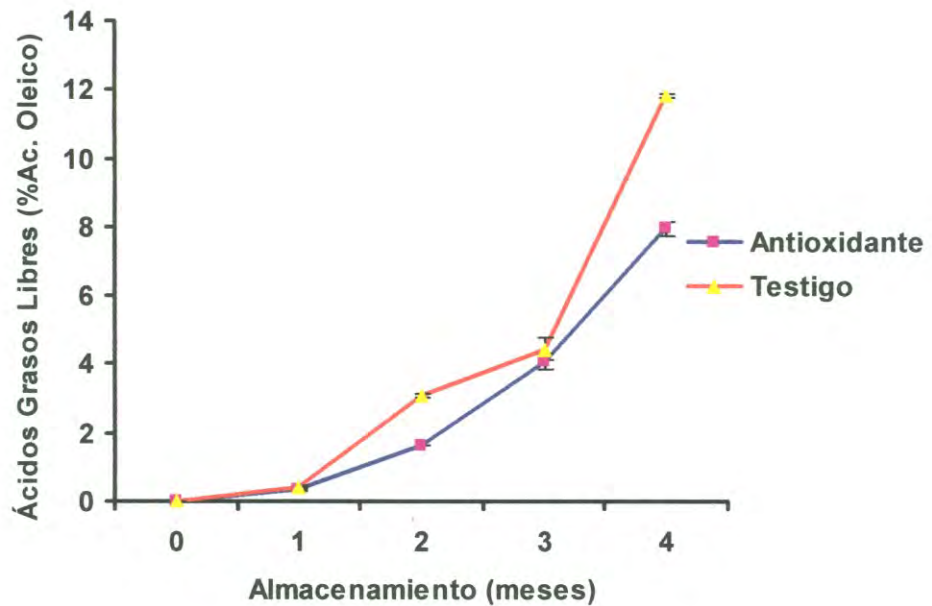


FIGURA 5. Formación de ácidos grasos libres en músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*) durante su almacenamiento en congelación. Los resultados son valores promedio de 3 determinaciones.

Se ha reportado que los principales causantes de la formación de ácidos grasos libres en músculo de pescado almacenado en congelación son las lipasas (Pearson, 1981; Woyewoda, 1986). Lo anterior sugiere que durante el almacenamiento en congelación del músculo de sierra se presentó actividad de alguna enzima lipolítica provocando así la formación de los ácidos grasos libres mencionados anteriormente. Sin embargo, una alta actividad de dichas enzimas en músculo de pescado congelado no es necesariamente un indicador de oxidación lipídica (Hwang y Regenstein., 1996).

Lo anterior se basa en los estudios reportados por Mazeud y Bilinski (1976), quienes encontraron que la adición de una fosfolipasa a un homogenizado de trucha arcoiris indujo un fuerte incremento en la formación de ácidos grasos libres, pero los niveles de oxidación fueron menores que las muestras tratadas sin la enzima, por lo que es necesario hacer otros análisis para establecer el efecto que tiene una alta actividad de lipasas en el músculo de sierra sobre la hidrólisis de lípidos.

Índice de Peróxido

Los productos marinos son altamente susceptibles a la rancidez causada por la oxidación de los lípidos presentes en el pescado que contienen una alta cantidad de ácidos grasos insaturados, los cuales son fácilmente atacados por radicales libres de oxígeno que proviene generalmente de la superficie del producto (Huang y Regenstein 1998).

Los peróxidos son los productos primarios de la oxidación. Sin embargo, tienen una vida relativamente corta, su utilidad como indicadores de oxidación es limitada a las primeras etapas del desarrollo de rancidez en el producto ya que este tipo de compuestos precede a la formación de aldehídos o se combinan con algunas proteínas, lo cual hace difícil su análisis (Woyewoda, 1986).

Se han reportado cambios en el valor de peróxido de aceite de sardina, macarela, aceite de salmón, aceite de macarela, salmón y arenque durante su almacenamiento a temperaturas de congelación (Woyewoda, 1986). La relación entre el valor de peróxido y el sabor en los alimentos oxidados depende del tipo de músculo y del proceso (Gray, 1978).

Los resultados reportados en este estudio arrojan un incremento significativo en los valores de peróxido para las muestras almacenadas en PSA a partir del primer mes de almacenamiento en congelación, alcanzando los valores máximos permitidos en el cuarto mes (10 meq/kg de lípido) (CodexStand-211, 1999). En contraste, las muestras almacenadas en PCA mostraron dicho incremento significativo ($p < 0.05$) a partir del segundo mes (Figura 6), y al cuarto mes presentó un valor de 7.2 meq/kg de lípido.

Lo anterior podría indicar que los envases antioxidantes retardaron un mes la aparición de los peróxidos durante el manejo en congelación del músculo de sierra.

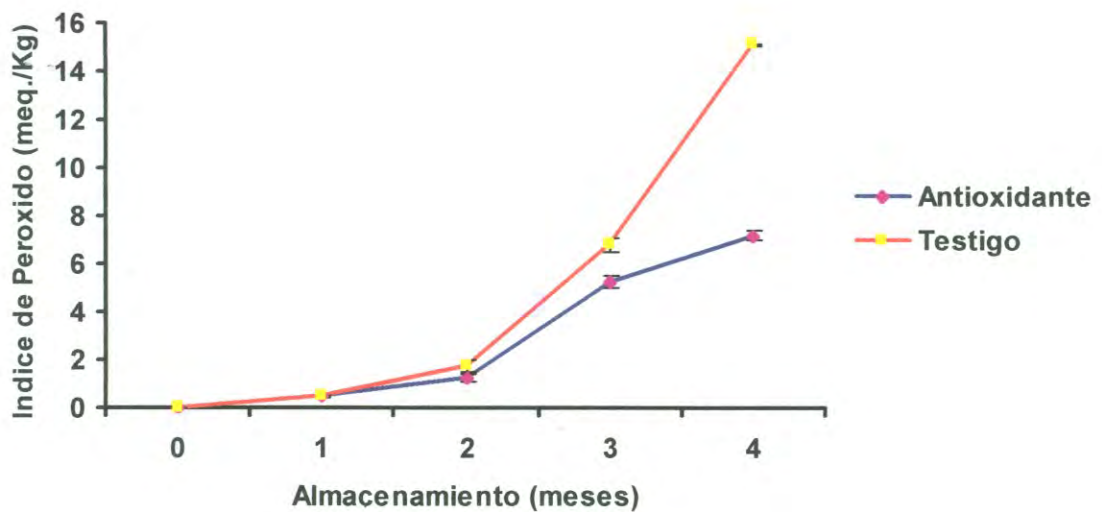


Figura 6. Formación de peróxidos en músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*) durante su almacenamiento en congelación. Los resultados son valores promedio de 3 determinaciones.

Se han reportado valores tentativos de peróxidos para músculo de pescado con buena calidad comestible, los cuales corresponden a un rango de 2 a 12 meq/kg de aceite en músculo de pescado congelado. Dichos valores fueron considerados en el límite de aceptabilidad (Ke y col., 1975; 1976).

Basándose en la información anterior se puede decir que ambos tratamientos mantuvieron los valores de peróxidos con una calidad comestible aceptable por 3 meses, detectándose un incremento muy significativo y considerable hasta el final de la etapa experimental (4^o mes) para el caso de las muestras almacenadas en PSA. En contraste con los valores reportados para los filetes almacenados en PCA (Figura 5).

Dicho incremento en la muestra testigo rebasa por mucho los límites máximos permitidos para este tipo de metabolitos primarios producto de la oxidación de lípidos. Sin embargo, no se puede asegurar que se logró mantener una calidad comestible de los filetes de sierra durante 3 meses de almacenamiento en congelación (en los dos tratamientos) ya que, como se mencionó en párrafos anteriores, este tipo de metabolitos son altamente inestables y susceptibles a interactuar con algunas proteínas presentes en el músculo de pescado o se convierten rápidamente a metabolitos secundarios de la oxidación de lípidos, como aldehídos o algunas cetonas, principalmente malonaldehído o formaldehído.

Por lo anterior es imposible hablar de calidad comestible en músculo de pescado congelado basándose únicamente en la determinación del índice de

peróxidos, para corroborar esto se realizaron las determinaciones de detección de metabolitos provenientes de la degradación de los peróxidos.

Ácidos Dienoicos Conjugados

Como se mencionó anteriormente, los metabolitos primarios formados a partir de las primeras etapas de oxidación de lípidos son altamente inestables y fácilmente reaccionan con otros componentes presentes en el músculo de pescado como las proteínas.

En este trabajo se determinó el porcentaje de ácidos dienoicos conjugados durante el periodo de almacenamiento del músculo de sierra encontrándose un comportamiento muy irregular (Tabla 7). El porcentaje de dienos conjugados presentó un incremento significativo después del primer mes de almacenamiento para los dos tratamientos. Sin embargo, después de dos meses de almacenamiento las muestras almacenadas en PCA disminuyeron notablemente su nivel de dienos conjugados (37.1%), mostrando posteriormente un incremento significativo al tercero y cuarto mes de almacenamiento. Por otro lado, los filetes almacenados en PSA mostraron un decremento significativamente menor en comparación con las muestras almacenadas en los envases con antioxidantes después del segundo mes; aun que también presentaron un posterior incremento (3er y 4to mes) durante su etapa de almacenamiento.

Tabla 8. Formación de dienos conjugados en el músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*) durante su almacenamiento en congelación.

Almacenamiento (meses)	Dienos Conjugados	
	antioxidante	testigo
0	30.47 ± 0.10 ^h	30.47 ± 0.10 ^h
1	84.12 ± 0.41 ^c	80.77 ± 0.01 ^d
2	37.1 ± 3.50 ^g	72.33 ± 2.92 ^e
3	64.67 ± 1.46 ^f	56.73 ± 2.07 ^g
4	93.53 ± 1.48 ^b	98.47 ± 0.66 ^a

Los resultados son valores promedio de 3 determinaciones.
Letras diferentes, indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

El comportamiento anterior no es comparable con lo reportado en la literatura. Aubourg y col. (2003) reportaron un incremento significativo en la concentración de dienos conjugados en músculo de "pomfret" del Atlántico durante su almacenamiento en frío (12 días). Sin embargo, después de ese tiempo de almacenamiento no se detectó variación en la concentración de dienos conjugados para dicha especie. Por otro lado Ingemansson y col. (1995) no encontraron diferencias significativas en la formación de dienos conjugados para músculo de trucha arcoiris almacenado 34 semanas en congelación.

La variación encontrada entre los estudios mencionados anteriormente (incluyendo este trabajo) fortalece la hipótesis descrita por Ericckson (1993) donde estableció que la medición de dienos conjugados por absorbancia UV en la fase lipídica es complicada debido a una alta absorbancia del blanco y por lo tanto reportó que no es un método muy sensible para monitorear la oxidación de lípidos en músculo de pescado, por lo que en este trabajo esta determinación no se consideró concluyente para establecer el efecto de la película con el antioxidante.

Prueba del Ácido Tiobarbitúrico

La oxidación es un proceso de formación de radicales libres a través de pasos de iniciación, propagación y terminación para formar aldehídos y cetonas como productos finales de dicha oxidación (Woyewoda, 1986). Sin embargo,

debido a que los productos finales son altamente inestables se dificulta la medición del grado de oxidación.

Durante el almacenamiento en congelación de pescado se le da particular importancia a la producción de formaldehído o malonaldehído y su implicación con la pérdida de calidad del producto (Aubourg y Medina, 1999).

Al determinar el índice de ácido tiobarbitúrico (TBA) en este trabajo se logró detectar un incremento significativo ($p < 0.05$) en ambos tratamientos a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento (Figura 7). Sin embargo, al comparar los resultados de las muestras almacenadas en PSA con las almacenadas en PCA resultaron ser significativamente mayor durante todas las etapas de muestreo (a partir del 1^{er} mes).

En la Figura 7 se puede apreciar como el valor de índice de ácido tiobarbitúrico incrementa drásticamente en el caso de las muestras almacenadas en PSA, esto después del segundo y tercer mes de almacenamiento, en contraste con los filetes almacenados en PCA donde, si bien es cierto se presentó un incremento significativo durante el periodo de almacenamiento, este fue mucho menor que para las muestras testigo.

Si comparamos los resultados obtenidos en este estudio (Figura 7) con los de índice de peróxidos presentados anteriormente (Figura 6) se podría pensar que la formación de metabolitos secundarios de la oxidación lipídica en

los filetes almacenados con los envases testigo se llevó a cabo mas rápidamente que la producción de radicales peróxido.

Lo anterior contrasta con el mecanismo básico de dicha oxidación reportado por varios autores (Terao, 1990; Woyewoda, 1986) donde los radicales peróxido son precursores de los metabolitos secundarios. Sin embargo, también en varios estudios, se ha reportado que el mecanismo básico de oxidación lipídica no sigue una secuencia lógica, es decir, que mientras se están llevando a cabo las etapas de iniciación o propagación también se pueden presentar las etapas de terminación. Además se ha establecido que la determinación de TBA es el mejor indicador de la oxidación lipídica en el caso de productos pesqueros (Woyewoda, 1986).

Varios autores han reportado un incremento en la formación de metabolitos secundarios de la oxidación lipídica para especies con alto contenido de grasa, después de 3 meses de almacenamiento en congelación (Woyewoda, 1986). Lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio para el caso de los filetes almacenados en los envases sin antioxidantes, mientras que para los filetes almacenados en los envases con antioxidantes no se muestra dicho incremento después de la etapa experimental.

Análisis de Firmeza

La oxidación de lípidos puede afectar varios componentes presentes en el músculo de pescado como lípidos, proteínas o vitaminas. Este tipo de deterioro oxidativo puede ser relacionado con cambios negativos en sabor, textura, apariencia, valor nutritivo y funcionalidad de las proteínas (Erickson, 1997, 1997).

Las reacciones de proteínas con lípidos oxidados pueden ocurrir por dos diferentes mecanismos: 1) reacciones con radicales libres producidos por productos primarios de oxidación, formando radicales libres de proteínas, y 2) reacciones de productos secundarios de la oxidación de lípidos (aldehídos, cetonas, epóxidos y compuestos carbonilos) con grupos α -amino causando entrecruzamiento de proteínas (Frankel, 1998).

Las proteínas miofibrilares son importantes componentes del músculo de pescado susceptibles a este tipo de reacciones oxidativas. Características funcionales (capacidad de retención de agua, propiedades de gelación y emulsificante) y de textura en el músculo dependen de estas proteínas; este factor es mas importante en músculo de pescado que en músculo de mamíferos debido al bajo contenido de colágeno en el músculo de peces (Hultin, 1985).

Durante la realización de este estudio, se evaluó resistencia al corte por parte de los filetes de sierra almacenados en los envases plásticos con y sin antioxidantes (PCA y PSA) detectándose un comportamiento muy irregular por

parte de ambos tratamientos. El músculo fresco de sierra presentó una resistencia al corte de 0.198 N/mm^2 . Después del primer mes de almacenamiento en congelación, la resistencia al corte tanto de los filetes en PCA como de los filetes en PSA mostró un incremento no significativo con respecto al músculo sin congelar (Figura 8). Además, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambos tratamientos.

En un estudio realizado por Salazar (2003) pero en cazón (*Mustelu lunulatus*), que es un elasmobranquio y es una especie magra, observó resultados similares a los aquí detectados. Dicho estudio reportó un incremento no significativo en la resistencia al corte por parte del músculo del pescado congelado rápidamente después de un mes de almacenamiento, utilizando el mismo instrumento de medición de firmeza. Sin embargo, una comparación con este trabajo no sería del todo correcta ya que el cazón es una especie baja en grasa, y el comportamiento de sus proteínas es muy diferente al de las proteínas presentes en el músculo de una especie grasa.

Después de dos meses de almacenamiento se detectó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la resistencia al corte en ambos tratamientos. Dicha disminución en la resistencia al corte puede ser atribuida a una desnaturalización de las proteínas presentes en el músculo de sierra, por efecto del crecimiento de los cristales de hielo formados durante la congelación del producto (Rahman, 1999), ya que ambos tratamientos presentaron dicho fenómeno. Sin embargo, después del tercer y cuarto mes de almacenamiento

Tabla 9. Resistencia al corte por parte del músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*) durante su almacenamiento en congelación.

Almacenamiento (meses)	Resistencia al corte (N/mm ²)	
	Antioxidante (PCA)	Testigo (PSA)
0	0.198± 0.077 ^b	0.198± 0.077 ^b
1	0.146± 0.033 ^b	0.192± 0.058 ^b
2	0.065± 0.018 ^a	0.076± 0.023 ^a
3	0.223± 0.068 ^b	0.192± 0.06 ^b
4	0.257± 0.117 ^b	0.223± 0.097 ^b

Los resultados son valores promedio de 15 determinaciones.
Letras diferentes, indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

se volvió a detectar un incremento en la resistencia al corte en ambos tratamientos, sin detectarse diferencias significativas entre ellos.

Con los datos de textura, obtenidos en este estudio, no se puede hablar de un efecto real sobre la resistencia al corte que ofrecen los filetes de sierra durante su almacenamiento en congelación por parte de las películas plásticas (con y sin antioxidantes) o por parte del tiempo de almacenamiento en si, ya que los valores son estadísticamente iguales, incluso al hacer las comparaciones con el producto fresco, los cuales son resultados contrarios a lo esperado.

Lo anterior puede ser atribuido a la gran variabilidad que hay en la firmeza del músculo de pescado, incluso tratándose del mismo organismo. Además de que la simplicidad de sus fibras musculares provoca que el pescado presente una textura mucho mas suave con respecto a la de otros animales, como la res o el puerco (Dunajski, 1979).

Dicha fragilidad y variabilidad en la textura del músculo de pescado dificulta su medición y exige que se utilicen aparatos más sensibles, como el texturómetro Instron utilizando principalmente las celdas de Warner-Bratzler y de Allo-Kramer. Esta última es la mas recomendada para este tipo de mediciones (Dunajski, 1979).

Como se mencionó en el apartado de materiales y métodos en este estudio se utilizó una celda de Warner-Bratzler, la cual posiblemente tuvo algún efecto sobre la amplia variabilidad de los resultados obtenidos con esta

determinación. Sin embargo, sería conveniente realizar más trabajos al respecto, para establecer con precisión, cual es, primero, la celda mas adecuada para evaluar la firmeza en este tipo de pescado, y por otro lado para determinar el comportamiento de la especie durante el almacenamiento en congelación.

Análisis Electroforético

Se han estudiado Interacciones entre las proteínas de diferentes tejidos animales con radicales libres provenientes de la oxidación de lípidos, determinando cambios físicos, químicos, funcionales y estructurales. Gracias a electroforesis en gel de poliacrilamida ha sido posible determinar la polimerización de la proteína y la escisión de la cadena polipeptídica (Decaer y col., 1993).

El malonaldehído y formaldehído son algunos de los principales productos secundarios de la oxidación de lípidos, los cuales puede interactuar con las proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos, produciendo enlaces covalentes y entrecruzamiento de moléculas grandes (Aubourg, 1993).

Debido a que después de tres meses de almacenamiento en congelación es cuando se observa el incremento más evidente en la oxidación de lípidos para los dos tratamientos evaluados en el músculo de sierra, se recurrió a analizar las proteínas después del tercero y cuarto mes de almacenamiento con la finalidad de obtener el perfil electroforético bajo condiciones

desnaturalizantes y reductoras y bajo condiciones desnaturalizantes. En la Figuras 9 y 10 se muestran los geles obtenidos en este estudio, donde se observa que se ubica la cadena pesada de la miosina en el rango de peso molecular de 200 kDa, (Haard, 1995), mientras que alrededor de los 45 kDa se encuentra la actina (Shahidi, 1992) y por debajo de ese rango las cadenas ligeras de miosina (Haard, 1995).

Al realizar el análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes para las muestras almacenadas en los envases testigo se puede observar como la intensidad de la banda (que presumiblemente es de miosina), tanto para los filetes empacados en las películas testigo (PSA) como los almacenados en las películas con antioxidantes (PCA), disminuye su intensidad después de tres meses de almacenamiento, (Figura 9; carriles C y D) al compararse con la del músculo fresco (Figura 9; carril B). Además, se presenta la aparición de bandas de peso molecular inferior a los 200 kDa indicando una posible desnaturalización de la miosina durante el periodo de almacenamiento de los filetes de sierra.

La disminución de dicha banda se puede observar de una manera más evidente para los filetes almacenados en PSA que para los filetes almacenados en PCA. Dicho comportamiento se mantuvo después de 4 meses de almacenamiento en congelación de los filetes de sierra.

Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones a las que se corrió esta electroforesis, la miosina que se encuentra en los filetes almacenados en

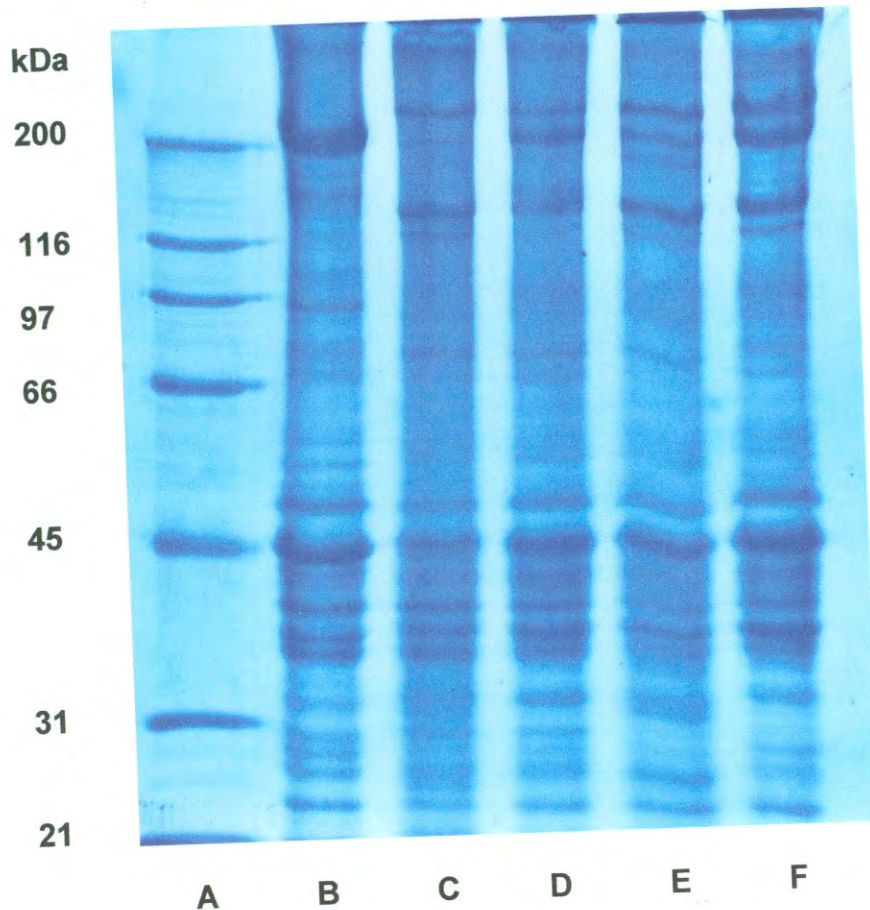


Figura 9. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de las proteínas del músculo de Sierra (*Scomberomorus sierra*) almacenado 4 meses en congelación. Carril A: marcador de peso molecular; B: músculo fresco; C: músculo almacenado 3 meses en PSA; D: músculo almacenado 3 meses en PCA; E: músculo almacenado 4 meses en PSA; F: músculo almacenado 4 meses en PCA.

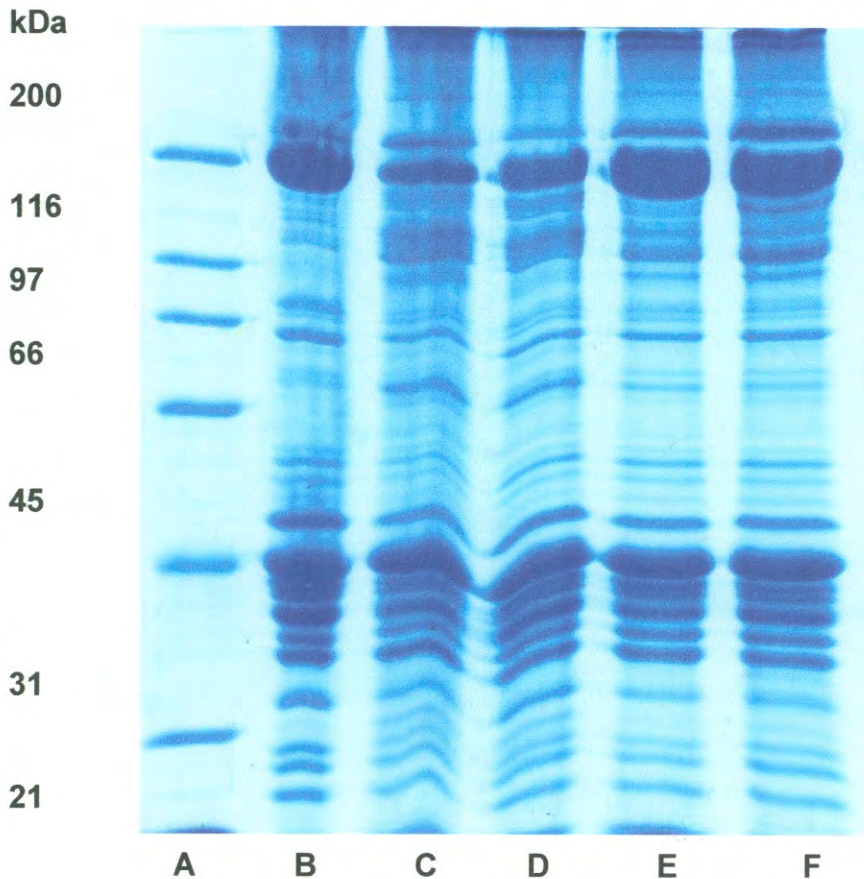


Figura 10. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras de las proteínas del músculo de Sierra (*Scomberomorus sierra*) almacenado 4 meses en congelación. Carril A: marcador de peso molecular; B: músculo fresco; C: músculo almacenado 3 meses en PSA; D: músculo almacenado 3 meses en PCA; E: músculo almacenado 4 meses en PSA; F: músculo almacenado 4 meses en PCA.

PSA mostraron un mayor grado de desnaturalización que la miosina presente en PCA después de la etapa experimental (4 meses en congelación).

Para el caso de la actina no se lograron detectar cambios evidentes con respecto a la desnaturalización de dicha proteína a medida que avanzó el tiempo de almacenamiento (Figura 9). Estos resultados fueron los esperados ya que varios autores han reportado que la actina es más estable que la miosina durante el almacenamiento de pescado en congelación. Reportaron por medio de análisis electroforeticos que la actina presente en músculo de bacalao (*Gadus morhua*) es mas estable durante el almacenamiento en congelación en comparación con la miosina (LeBlanc y LeBlanc, 1989; Tejada y col., 1996).

En la electroforesis de las muestras corridas bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, se observó que aparecen bandas de peso molecular inferior a los 200 kDa después de 3 meses de almacenamiento para ambos tratamientos (Figura 10; carriles C y D). La menor intensidad en la fracción correspondiente a la miosina de los filetes en PCA, con respecto a las almacenadas en PSA podría sugerir que esta proteína se ve protegida por la presencia del antioxidante. Sin embargo, no se logró detectar diferencias evidentes en la intensidad de las bandas formadas en ambos tratamientos después de 4 meses de almacenamiento, así como en las bandas formadas por debajo de los 200 kDa.

No se logró detectar una evidente alteración de las bandas a la altura de los 45 kDa (actina). Al igual que para las muestras almacenadas en los envases

testigo, concuerda con el comportamiento explicado anteriormente, donde la actina presenta una mayor estabilidad que la miosina durante el almacenamiento en congelación del pescado.

Con la información anterior no se puede hablar de una clara diferencia con respecto a la estabilidad de la miosina presente en los filetes almacenados en los envases con y sin antioxidantes. Es por ello que se hizo uso de otras técnicas como la determinación de textura explicada anteriormente, donde tampoco se logró establecer una clara diferencia entre ambos tratamientos.

Por otro lado, las proteínas miofibrilares, especialmente la miosina, son altamente susceptibles a la agregación, dependiendo de la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Badii y Howell (1996) compararon filetes congelados de una especie productora de formaldehído (bacalao) con arenque, el cual forma cantidades insignificantes de formaldehído durante su almacenamiento en congelación, y encontraron pequeñas diferencias en las propiedades fisicoquímicas y de textura; indicando que el formaldehído no es el principal factor causante de dureza en filetes de bacalao almacenados en congelación. Sin embargo, Tironi y col. (2002) detectaron un incremento en el grado de agregación en proteínas de salmón (*Pseudoperca semifasciata*) por efecto de una interacción con malonaldehído.

Análisis Histológico

El músculo de sierra (*Scomberomorus sierra*) almacenado en los dos diferentes envases plásticos (con y sin antioxidantes) fue analizado a través de microscopía óptica por medio de una tinción diferencial con hematoxilina y eosina con la finalidad de elucidar la estructura general del músculo.

En la Figura 11 se pueden observar los filamentos del músculo de sierra sin congelar, donde se aprecia un denso empaquetamiento de su estructura sin aparentes daños. Además se logra observar una banda clara (banda A) y una banda oscura (banda I), las cuales se sabe que forman parte del sarcómero, que es una unidad contráctil que confiere a las miofibrillas su apariencia estriada (Howgate, 1979, Alberts y col., 1983).

Después de un mes de almacenamiento, se observó como el músculo de sierra almacenado en las películas sin antioxidantes (PSA) presentó una clara fragmentación, así como deformación de sus fibras (Figura 12A). Por otro lado, el músculo de sierra almacenado en las películas con antioxidantes (PCA) presentó un empaquetamiento de sus fibras similar al del músculo fresco (Figura 12B). Sin embargo, se puede apreciar una ligera deformación de las fibras musculares, así como pequeñas rupturas del tejido, aun que en menor medida que las presentadas por los filetes en PSA.

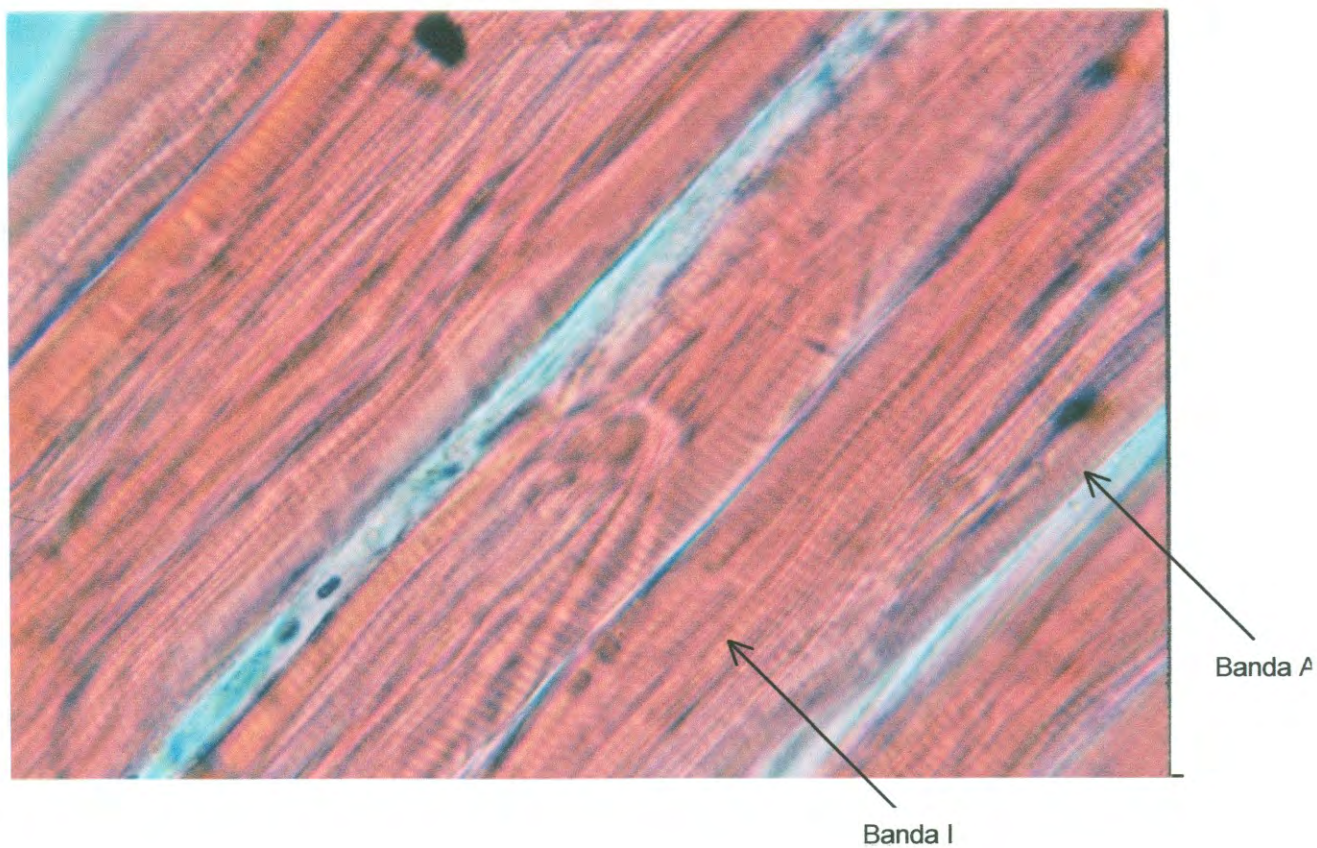


Figura 11. Corte histológico de músculo de Sierra (*Scomberomorus sierra*) sin congelar, fijado en formaldehído al 10% inmediatamente después de su captura (100X).

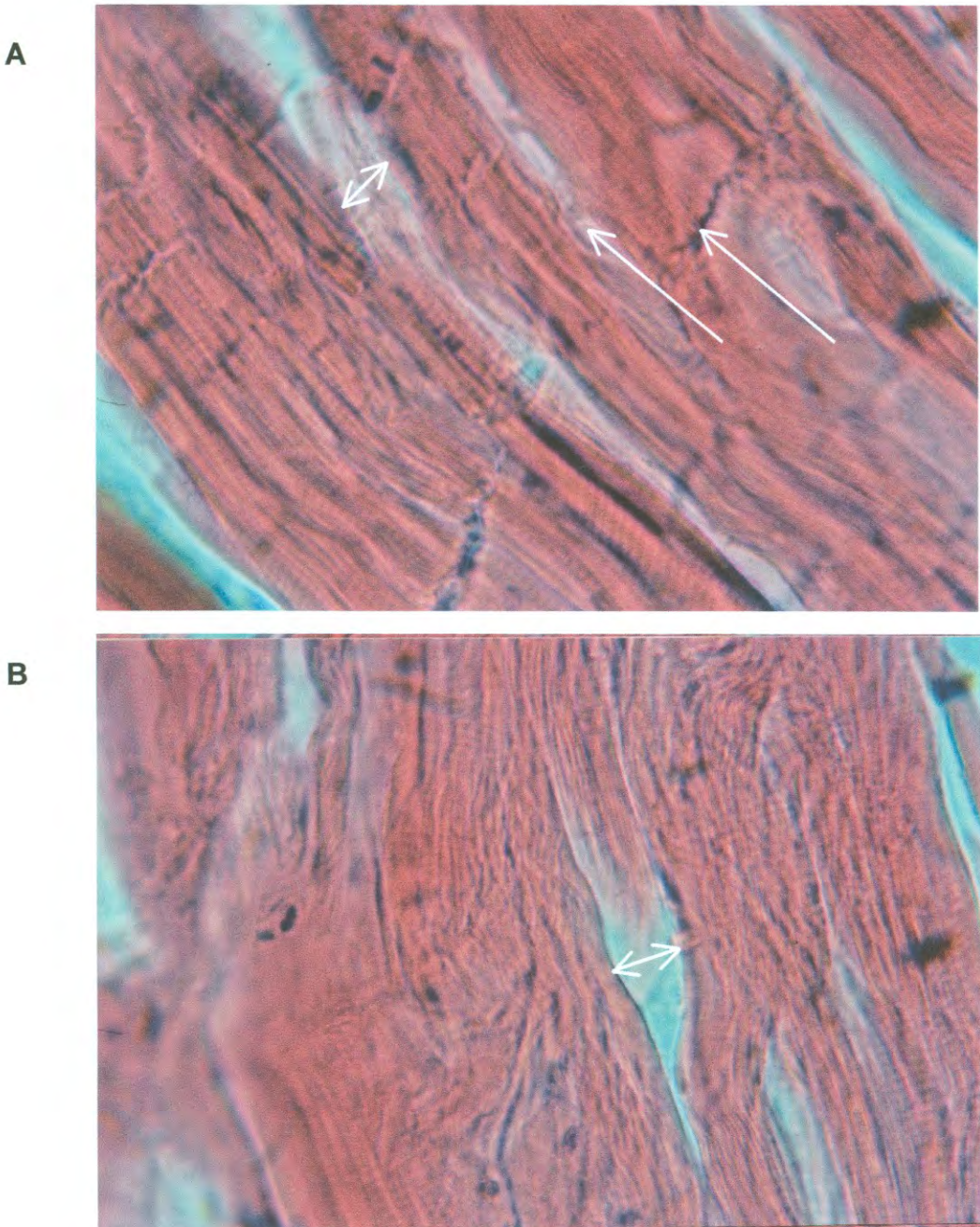


Figura 12. Corte histológico de músculo de Sierra (*Scomberomorus sierra*) fijado en formaldehído al 10% después de 1 mes de almacenamiento en congelación sometido a los dos diferentes tratamientos. (A): envase testigo (100X); (B): envase con antioxidante (100X).
Nota: Las flechas indican deformación y ruptura del tejido muscular.

Con base en lo anterior, después de un mes de almacenamiento se puede decir que existen pequeñas diferencias entre los dos tratamientos utilizados en este estudio. Sin embargo, dichas diferencias no se pueden atribuir a un efecto de la oxidación de lípidos sobre una posible agregación o desnaturalización de las proteínas miofibrilares presentes en el músculo de sierra, ya que después de este periodo de almacenamiento no se presentaron marcadas diferencias en los valores de índice de peróxidos, ácidos grasos libres o índice de ácido tiobarbitúrico para las muestras tratadas con y sin los envases antioxidantes. Tampoco se observaron diferencias en los patrones electroforeticos y determinación de textura entre ambos tratamientos después del mismo tiempo de almacenamiento.

Después del segundo mes de almacenamiento en congelación se apreció que tanto los filetes en PSA como los que se almacenaron en PCA (Figuras 13a y 13b) el daño en las fibras musculares es mas severo con respecto al primer mes de almacenamiento, detectándose daños mas marcados en el tejido de los filetes en PSA, en la cual se ha perdido la configuración longitudinal y hay mayor separación de las fibras musculares, es decir, mayor daño en el tejido. Este consiste en una marcada distorsión de las fibras, pérdida de la estructura fibrilar, además de una separación muy notoria de los paquetes musculares.

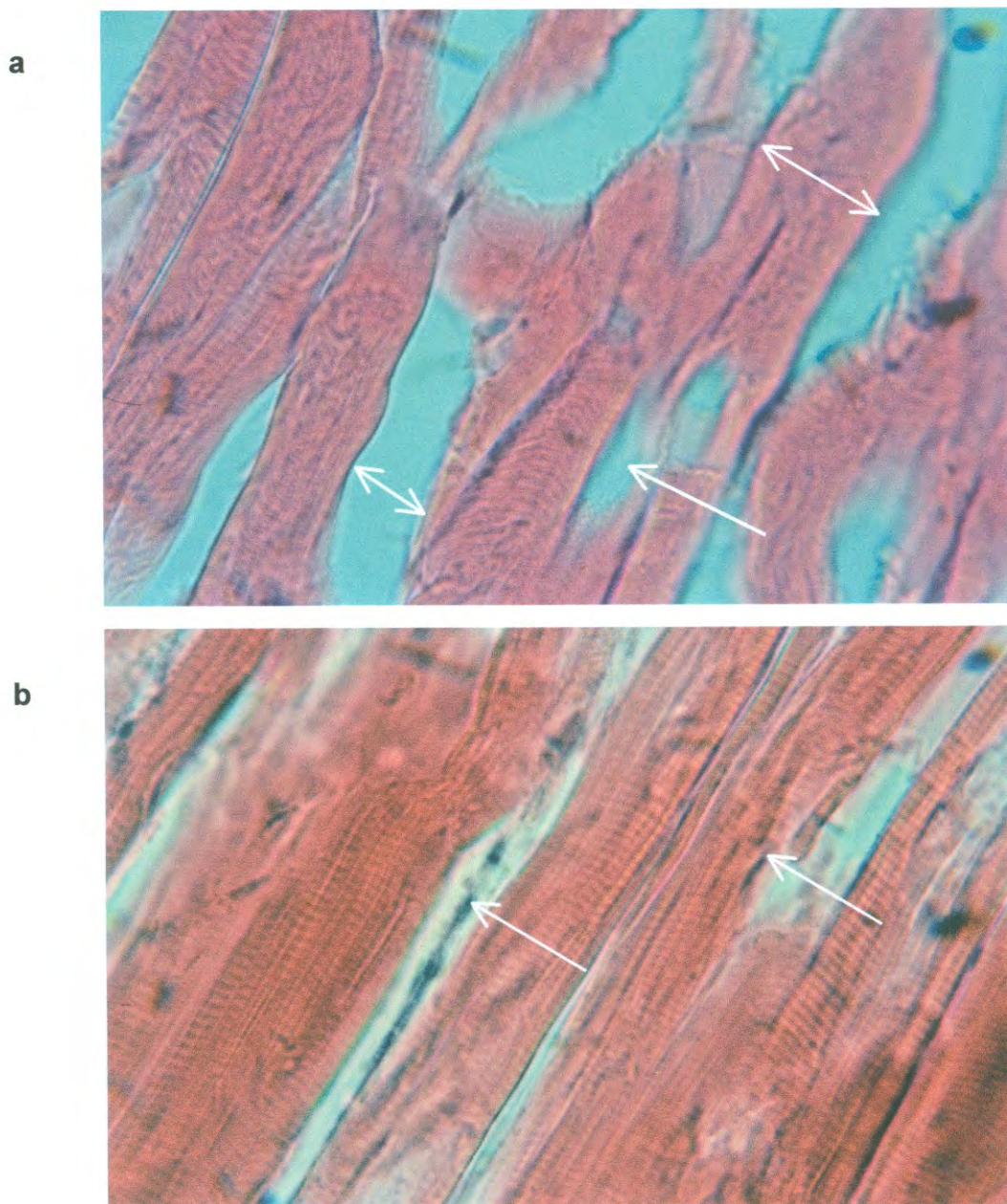


Figura 13. Corte histológico de músculo de Sierra (*Scomberomorus sierra*) fijado en formaldehído al 10% después de 2 meses de almacenamiento en congelación sometido a los dos diferentes tratamientos. (A): envase testigo (100X); (B): envase con antioxidante (100X).
Nota: Las flechas indican deformación y ruptura del tejido muscular.

Después de este periodo de almacenamiento también se presentó una disminución en la intensidad del color de las fibras musculares en PSA, con respecto a las tinciones de las fibras musculares en PCA. Dicha diferencia de color entre ambos tratamientos se mantuvo después del tercer y cuarto mes de almacenamiento. Tironi y col. (2004) reportaron en un estudio *in vitro* un efecto del malonaldehído sobre la estructura de las proteínas extraídas del músculo de Salmón (*Pseudoperca semifasciata*) provocando agregación entre ellas. Una alteración en las proteínas presentes en el músculo de sierra puede provocar una menor capacidad de retención del colorante por parte del tejido ya que el mecanismo de acción de los colorantes utilizados en este tipo de técnicas es la unión con las proteínas presentes en el músculo y por consiguiente, a mayor cantidad de proteína hidrolizada hay una menor capacidad de unirse al colorante (Stoscheck, 1990).

Por lo anterior se puede hablar de un posible efecto de la oxidación lipídica sobre la distorsión y rompimiento de las fibras musculares en PSA, ya que después de dos meses es cuando se presentó una marcada diferencia en los valores obtenidos para índice de peróxidos e índice de ácido tiobarbitúrico entre los dos tratamientos.

Al finalizar el tercer mes de almacenamiento en congelación se apreció una mayor alteración de las fibras musculares, manifestado por la torsión y ruptura de las fibras mas pronunciada con respecto al músculo sin congelar y a las muestras del primero y segundo mes de almacenamiento, tanto para los

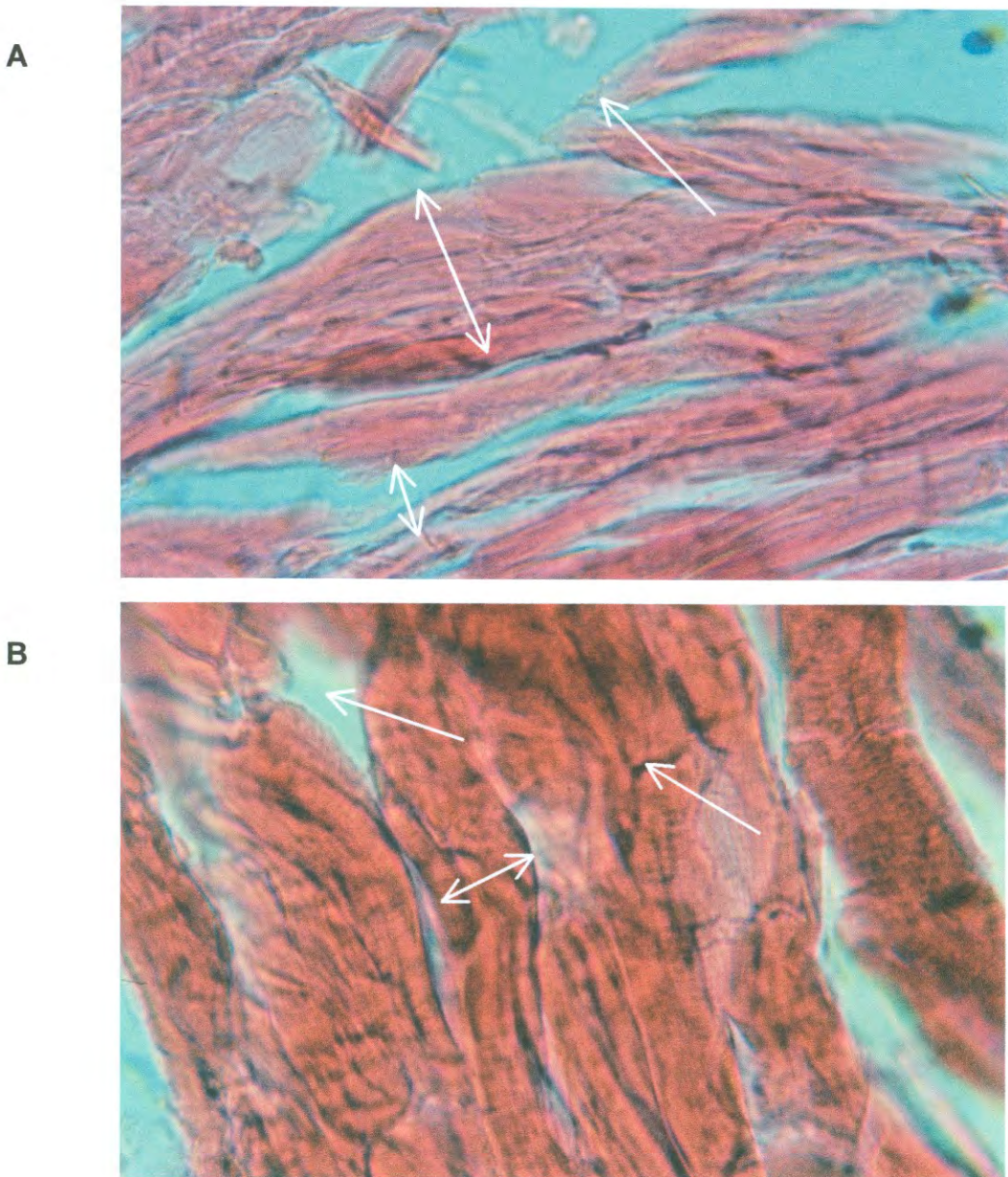


Figura 14. Corte histológico de músculo de Sierra (*Scomberomorus sierra*) fijado en formaldehído al 10% después de 3 meses de almacenamiento en congelación sometido a los dos diferentes tratamientos. (A): envase testigo (100X); (B): envase con antioxidante (100X).
Nota: Las flechas indican deformación y ruptura del tejido muscular.

filetes en PSA como para los almacenados en PCA (Figuras 14a y 14b). Hasta este periodo de muestreo, los filetes almacenados en PCA muestran fragmentación de los paquetes musculares, distorsión y separación de las fibras similares a los daños presentados por los filetes en PSA al mes de almacenamiento. Los filetes almacenados en PSA por tres meses, presentan un marcado incremento en la torsión y rompimiento de las fibras musculares, formando incluso unidades de fibras musculares más simples.

Al concluir la etapa de almacenamiento del músculo de sierra congelado (cuatro meses) se puede observar como los filetes en PCA presentan una aparente deformación y rompimiento de los tejidos (Figura 15b). Este aumento en la alteración de las fibras musculares con respecto al tiempo de almacenamiento podría estar relacionado con un posible crecimiento o recristalización del hielo en el músculo de sierra almacenado en congelación. Dicho fenómeno se puede presentar por las variaciones en las temperaturas que tienden a darse en los equipos durante el almacenamiento en congelación (Rahman, 1999).

La recristalización del hielo durante el almacenamiento en congelación puede llegar a influir en la calidad del producto de diversas maneras; aunque el producto se haya sometido a un proceso de congelación rápida, donde se obtienen cristales de menor tamaño, también se puede llevar a cabo el crecimiento de cristales, lo que provoca cierto rompimiento celular (Rahman, 1999).

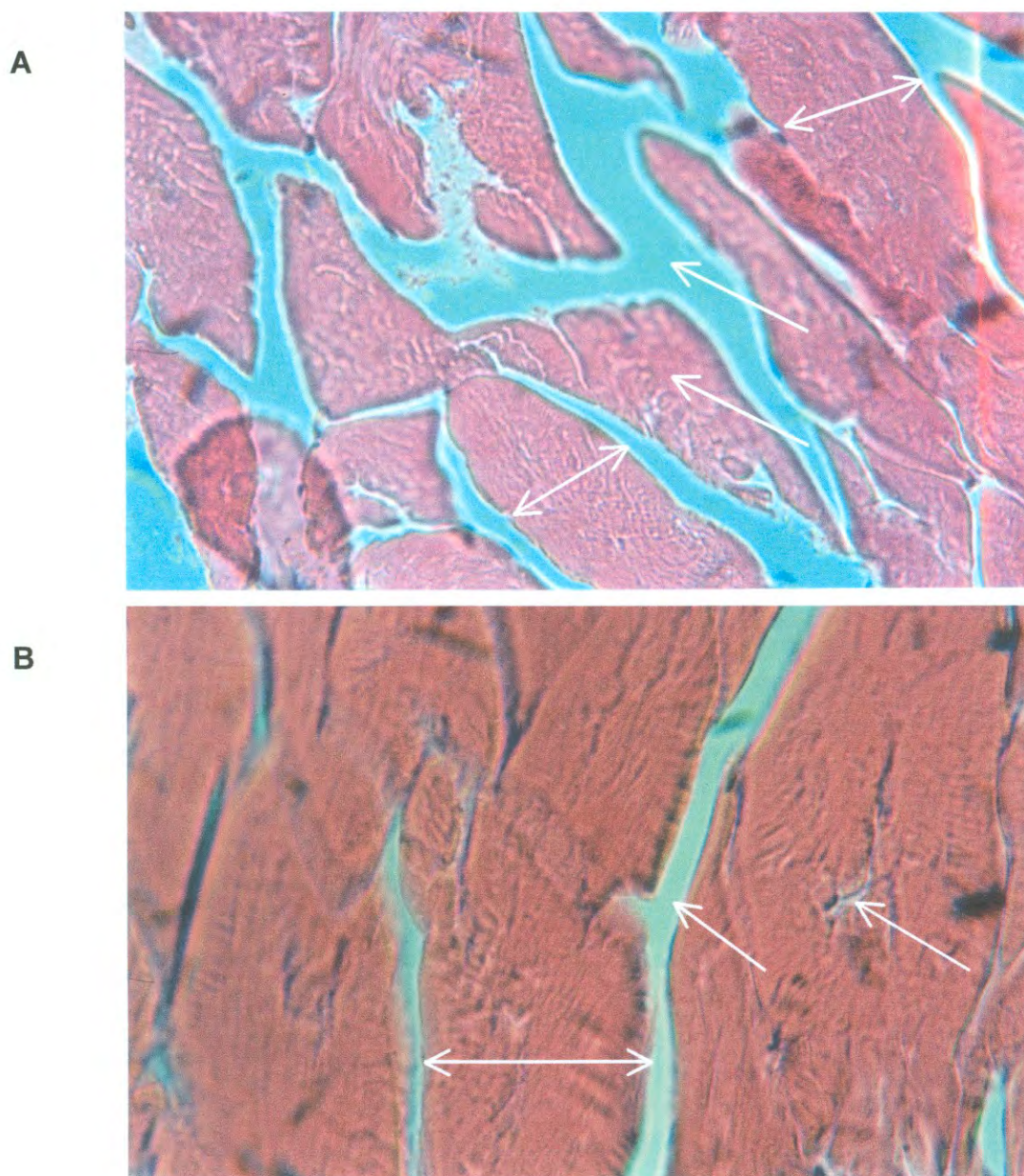


Figura 15. Corte histológico de músculo de Sierra (*Scomberomorus sierra*) fijado en formaldehído al 10% después de 4 meses de almacenamiento en congelación sometido a los dos diferentes tratamientos. (A): envase testigo (100X); (B): envase con antioxidante (100X).
Nota: Las flechas indican deformación y ruptura del tejido muscular.

En el músculo de trucha almacenado a -20°C las fibras musculares presentan un mayor daño en su morfología conforme aumenta el tiempo de almacenamiento, debido posiblemente, a un crecimiento de los cristales de hielo, lo que provoca un aumento en el volumen extracelular, y consecuentemente un mayor rompimiento y torsión de las fibras (Foucat y col., 2001).

Para el caso de los cortes histológicos de los filetes almacenados en PSA (Figura 15a), los cambios presentados con respecto al músculo sin congelar no pueden ser atribuidos al fenómeno de recristalización del hielo explicado anteriormente, ya que la magnitud del daño estructural sufrido por las fibras musculares en PCA después del mismo periodo de almacenamiento fue notoriamente menor al presentado por las presentes en PSA.

Este rompimiento de las fibras musculares en PSA puede ser atribuido a la presencia de metabolitos secundarios formados durante la oxidación de lípidos en el músculo de sierra durante su almacenamiento en congelación. Ya que, como se mencionó anteriormente, los productos formados de la oxidación de lípidos, principalmente malonaldehído y formaldehído pueden ser capaces de interactuar con las proteínas miofibrilares presentes en el músculo de pescado, provocando así, una alteración en el tejido (Tironi y col., 2004; Tironi y col., 2003; Tironi y col., 2002).

Este fenómeno podría explicar las marcadas diferencias entre las muestras almacenadas en los envases con y sin antioxidantes durante su almacenamiento, tomando en cuenta que después de este periodo de almacenamiento es donde se presentó una mayor oxidación de los lípidos en PSA.

CONCLUSIONES

Los filetes de sierra almacenados en PSA mostraron una mayor formación de ácidos grasos libres durante su almacenamiento en congelación en comparación con los filetes almacenado en PCA. Sin embargo no se puede hablar de una mayor hidrólisis de los lípidos por parte de las muestras almacenadas en PSA ya que no existen referencias sobre un posible efecto del antioxidante sobre la actividad lipolítica en el músculo de pescado.

La utilización de envases plásticos con antioxidantes durante el almacenamiento en congelación del músculo de sierra retarda el deterioro en la calidad de sus proteínas miofibrilares.

Bajo las condiciones aplicadas en este estudio, los envases plásticos con antioxidantes retardaron la oxidación lipídica del músculo de sierra por dos meses durante su almacenamiento en congelación en comparación con los envases testigo.

Por último, la utilización de envases plásticos con antioxidantes ayuda a conservar la calidad química y bioquímica del músculo de sierra durante su almacenamiento en congelación.

RECOMENDACIONES

Determinar actividad lipolítica endógena en el músculo de sierra durante su almacenamiento en congelación para establecer si las películas plásticas con antioxidantes tienen un efecto inhibitorio sobre dichas enzimas. Además de establecer el grado y tipo de inhibición que presenta el antioxidante.

Evaluar la utilización de diferentes concentraciones del antioxidante en los envases plásticos, con la finalidad de determinar la concentración adecuada.

Realizar el monitoreo de la formación de dienos conjugados por medio de técnicas alternas a las de absorbancia UV, como las de HPLC.

Utilizar otro tipo de equipo durante la determinación de firmeza, como la celda de Allo-Kramer con la finalidad de obtener un mayor grado de sensibilidad en los análisis.

Utilizar técnicas de análisis mas detalladas, como la de crio-fractura con la finalidad de observar al microscopio electrónico los cambios estructurales de las proteínas en el músculo de pescado durante su almacenamiento en congelación.

Llevar a cabo un análisis sensorial detallado sobre la aceptabilidad del consumidor, con la finalidad de establecer la posible influencia de los cambios sufridos a nivel bioquímico por efecto de la oxidación lipídica durante el almacenamiento en congelación.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Reff, M., Roberts, K. and Watson, J. 1983. Chapter 10. The Cytoskeleton. In: Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc. New York and London. pp. 550-561.
- A.O.C.S. 1997. Official Methods and Recommended Practices. Edited by D. Firestone. Fifth Edition. American Oil Chemists Society.
- Aubourg, S. 1993. Review: Interaction of Malonaldehyde with Biological Molecules-New Trends About Reactivity and Significance. Int. J. of Food Sci. and Technol. 28:323-335.
- Aubourg S. and Medina I. 1999. Influence of Storage Time and Temperature on Lipid Deterioration During Cod and Haddock Frozen Storage. J. Sci. Food Agric. 79:1943-1948.
- Aubourg S., Arias C. and Perez F. 2003. Lipid Deterioration During Chilled Storage of Atlantic Pomfret. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105:661-667.
- Badii, F and Howell, N. 2002. Effect of Antioxidants, Citrate and Cryoprotectants on Protein Denaturation and Texture of Frozen Cod (*Gadus morhua*). J. Agric. Food Chem. 50: 2053-2061.
- Badui S. 1993. Química de los Alimentos. 3^{ra}. Edición. Editorial Alambra Mexicana. México. pp 123-210

- Bilinski E., Jonas R. and Peters M. 1981. Treatments Affecting the Degradation of Lipids in Frozen Pacific Herring. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 14:123-127.
- Biradar V., Dev D. and Ingle U. 1995. Sep Flife Extensión of Pedha by Packaging. *J. Food Sci.* 50:51-55.
- Bjerkeng B. and Johnsen G. 1995. Frozen Storage Quality of Rainbow Trout as Affected by Oxygen, Illumination and Fillet Pigment. *J. Food Sci.* 60:284-288.
- Bligh E. and Dyer W. 1959. A Rapid Metod of Total Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Buettner G. 1993. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, Alpha-tocopherol and Ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300:535-543.
- Brandon, A. and Tooze, B. 1999. *Introduction to Protein Structure*. 2nd. Edition. Garland Publishing. Inc. USA. pp. 45-78.
- Burges, G. 1987. *El Pescado y las Industrias Derivadas de la Pesca*. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Catalá R. 2000. Migración de Envases de Materiales Plásticos. *Memorias II Congreso RISEA-2000*.
- Chao R. and Rizui H. 1988. Oxygen and Water Vapor Transport Through Polymeric Film. *American Chem. Soc. Chapter 18*.

- Chen H. and Yim M. 1998. Inhibition of Lipid Oxidation in Fish Muscle by Antioxidant Incorporated Polyethylene Film. *J. Food Processing and Preservation*. 22:199-209.
- Codex-stand 211. 1999. Codex Standard for named animal fat. Codex *Alimentarius*.FAO/WHO, food standard.
- Colomenero F. and Borderias A. 1983. A Study of the Effects of Frozen Storage on Certain Functional Properties of Meat and Fish Protein. *J. Food Technol*. 18:731.
- Decker, E., Xiong, Y., Calvert A., Crum A. and Blanchard S. 1993. Chemical, Physical and Functional Properties of Oxidized Turkey White Muscle Miofibrillar Proteins. *J. Agric. Food Chem*. 41:186-189.
- Dorado-Rodelo J. 2004. Elaboración de un Producto Horneado a Partir de Filetes de Pargo Colorado (*Lutjanus colorado*) Congelados-Envasados en Materiales Resistentes a Altas Temperaturas.
- Dunajski, E. 1979. Texture of Fish Muscle. *J. Text Studies*. 10:301-318.
- Erickson M. 1993. Ability of Chemical Measurements to Differentiate Oxidative Stabilities of Frozen Minced Muscle Tissue from Farm-raised Striped Bass and Hybrid Striped Bass. *Food Chem*. 48:381-385.
- Erickson M. 1997. Lipid Oxidation: Flavor and Nutritional Quality Deterioration in Frozen Foods. In: *Quality in Frozen Foods*. New York. USA. Chapman and Hall. pp. 141-173.
- FAO. 1995. Internet. Pacífico Centro Oriental. <http://apps.fao.org/default.com>.

- F.D.A. Food and Drug Administration. www.fda.gov
- Frankel E. 1984. Volatile Lipid Oxidation Products. *Prog. Lipid Research*. 22:1
- Frankel E. 1998. Foods. In: *Lipid Oxidation*. Dundee, Scotland. The Oily Press. pp. 199-201.
- George, R. 1993. Freezing Process Used in the Food Industry. *Trends Food Sci. Technol.* 4:134.
- Garthwaite, G. 1997. Chilling and Freezing of Fish. Chapter 4. In: *Fish Processing Technology*. Hall, G. (Ed). Blackie Academic and Professional. London, UK.
- Gomez-Pastrana Rubio, J.M. 2002. Congelación de Pescados y Factores que Influyen en su Calidad. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. 174: 71-73.
- Gray J. 1978. Measurement of Lipid Oxidation: a review. *J. Am. Oil chem. Soc.* 55:697-704.
- Haard, N. Biochemical Reactions in Fish Muscle during Frozen Storage. 1990. In: *Seafood Science and Technology Proceedings of the International Conference Seafood 2000*, in the Canadian Institute of Fisheries Technology of the Technical University of Nova Scotia. Halifax, Canada. Graham E. (Ed) Fishing News Books, Blackwell Scientific Publications Ltd. pp. 176-209.
- Haard N. 1992. Control of Chemical Composition and Food Quality Attributes of Cultured Fish. *Food Res. Int.* 25:289-307.

- Haard, N. 1995. Composition and Nutritive Value of Fish Proteins and Others Nitrogen Compounds. Chapter 3. In: Fish and Fishery Products. Composition, Nutritive Properties and Stability. Ruiter, A. (Ed). CAB International.
- Hamoir, G. 1975. Advances in Protein Chemistry. Academic Press. New York. pp 227-288.
- Hanaoka, K. and Toyomizu M. 1979. Acceleration of Phospholipid Decomposition of Fish Muscle by Freezing. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 45 :465.
- Howgate, P. 1979. Fish. Chapter 9. In: Food Microscopy. Vaughan, J. (Ed). Academic Press Inc. London. pp. 343-389.
- Hultin H. 1985. Characteristics of Muscle Tissue. In: Fennema O. (Ed). Food Chemistry. N.Y. Marcel Dekker. Inc. pp. 725-789.
- Huss H. 1998. El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad. FAO. Documento Técnico de Pesca 348. Roma.
- Hwang K. and Regenstein J. 1988. Protection of Menhaden Mince Lipid from Rancidity During Frozen Storage. J. Food Sci. 54:1120-1124.
- Hwang K. and Regenstein J. 1996. Lipid Hydrolysis and Oxidation of Mackerel (*Scomber scombrus*) Mince. J. of Aquatic Food Product Technol. 5:17-27.
- INE, 2000. Ordenamiento Ecológico del Mar de Cortéz. En: <http://www.ine.gob.mx/enautica>.

- Ingemansson T., Kaufmann P. and Ekstrand B. 1995. Multivariate Evaluation of Lipid Hydrolysis and Oxidation Data from Light and Dark Muscle of Frozen Stored Rainbow Trout. *J. Agric. Food Chem.* 43:2046-2052.
- Kanner J., German J. and Kinsella J. 1987. Initiation of Lipid Peroxidation in Biological Systems. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 25:317-364.
- Ke P., Woyewoda L. and Ackman R. 1976. An Improved Titrimetric Method for Determination of Free Fatty Acids in Fish Oils. Fisheries and Environment Canada. Curricular 61.
- Ke P., Ackman R., Linke B. and Nash D. 1977. Differential Lipid Oxidation in Various Parts of Frozen Mackerel. *J. Food Technol.* 12:37.
- Ladikos D. and Lougovois. 1990. Lipid Oxidation in Muscle Foods: A Review. *J. Food Chem.* 35:295.
- Laemmli, U. Most Commonly Used Discontinuous Buffer System for SDS Electrophoresis. *Nature.* 227:680.
- Lanari M. and Zaritzky N. 1991. Effect of Packaging and Frozen Storage Temperature on Beef Pigments. *Int. J. Food Sci. Technol.* 26:629-640.
- LeBlanc, E. and LeBlanc, R. 1989. Separation of Cod (*Gadus morua*) Fillet Proteins by Electrophoresis and HPLC After Various Storage Treatments. *J. Food Sci.* 54: 827-834.
- Leland J. 1997. Flavor Interactions: The Greater Whole. *J. Food Technol.* 51:75-80.

- Jhonston, W., Nicholson, F., Roger, A. and Stroud, G. 1994. Freezing and Refrigerated Storage in Fisheries. FAO Fisheries Technical Papers.
- Love, M. 1988. Aspects of Quality. Texture. Chapter 6. In: The Food Fishes. Their Intrinsic Variation and Practical Implications. Love M. (Ed). Farrand Press, London, UK.
- Mackie, I., Howgate, P., Craig A., Laird W. and Ritchie A. 1986. Acceptability of Frozen Stored Consumer Fish Products. Rev. Int. Froid. 9:169.
- Matsumoto, J. 1979. Denaturation of Fish Muscle Protein During Frozen Storage. In: Proteins at Low Temperatures. Fennema, O. (Ed). Advances in Chemistry Series. American Chemical Society. Washington D.C. pp. 205-224.
- Mazeaud F and Bilinski F. 1976. Free Fatty Acids and the Onset of Rancidity in Rainbow Trout Flesh. Effect of Phospholipen A. J. Fish. Board Can. 33:1297.
- Ohta F. and Tanaka K. 1978. Some Properties of the Liquid Proportion in the Frozen Fish Muscle Fluid. Bull. Jap. Soc. Sci Fish. 44:59-62.
- Olivas, H. 1999. Actividad Proteolítica del sistema Digestivo de la Sierra.
- Oshima, T., Wada, S. and Kouzimi, C. 1984. Effect of Accumulated Fatty Acid on Reduction of Salt Soluble Protein of Cod Flesh During Frozen Storage. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 50 :1567.
- Prophet, E. y Mills, B. 1992. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de América. pp. 27-35.

- Rahman, M. 1999. Food Preservation by Freezing. Chapter 8. In Handbook of Food Preservation. Rahman, M. (Ed). Marcel Dekker, Inc.
- SAGARPA. 2005. Secretaria de Agricultura Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. www.sagarpa.gob.mx.
- Salazar, J. 2003. Efecto de los Metodos de Congelación y Descongelacion Sobre las Proteinas Miofibrilares y Estructura del Músculo de Cazon (*Mustelus lunulatus*).
- Sanderson P., Williams W., Cunningham B., Wolf D. and Lis L. 1993. The Effect of Ice on Membrane Lipid Phase Behavior. Biochem. Biophys. Acta 1148:278-284.
- Seki, N., Kitao, M., Konno, K. and Arai, K. 1973. On the Purification of Actin From Fish Muscle. Jap. Soc. Sci. Fish. 39:1211-1219.
- SEMARNAP (2000). Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca.
- Shahidi, F. 1992. Seafood Proteins and Preparation of Protein Concentrates. In: Seafoods: Chemistry, Processing, Technology and Quality. Shahidi, F. and Botta, J. (Ed). pp 2-9.
- Sikorski, Z., Kalokowska, A. y Pan, B. 1990. The Nutritive Composition of the Major Groups of Marine Foods Organisms. In: Seafoods Resources, Nutrition, Composition and Preservation. Sikorski, Z. (Ed). CRC. Press Inc. Boca Raton, Florida. pp. 29-54.

- Soto-Valdez, H., Peralta E. y Munguía-Lóez M. 2002. Materiales Plásticos Utilizados en Envases de Alimentos. Memorias III Congreso de Ciencias Alimentarias y Biotecnología.
- Srinivasan, D. 1996. Amino Acids, Peptides and Proteins. Chapter 6. In: Food Chemistry. Fennema, O. (Ed). 3rd. Edition. Marcek Dekker Inc.N.Y. pp 321-431.
- Stoscheck, C. 1990 "Quantification of Protein" *Methods in Enzymology* , **182**:50-68.
- Suzuki, T. 1987. Tecnología de las Proteínas de Pescado y Krill. Editorial Acribia, S.A. pp 1-49.
- Tejada, M., Careche, M., Torrejon, P., Del Mazo, M., Solas, M., Garcia, M. and Barba, C. 1996. Protein Extracts and Aggregates Forming in Minced Cod (*Gadus morua*) During Frozen Storage. *J. Agric. Food Chem.* 44:3308-3314.
- Tappel A. 1953. The mechanism of the Oxidation of Unsaturated Fatty Acid Catalized by Hematin Compounds. *Arch. Biochem Biophys* 44:378-395.
- Terao J. 1990. Reaction of Lipid Hydroperoxides. In: Membrane Lipid Oxidation. pp. 219-238, CRC Press, Boca Raton Fla.
- Tironi, V., Tomás, M. and Añón, M. 2002 Structural and Functional Changes in Miofibrillar Proteins of Sea Salmon (*Pseudoperca semifasciata*) by Interaction with Malonaldehyde (RI). *J. Food Sci.* 67:930-935.

- Tironi, V., Tomás, M. and Añón, M. 2003. Effect of Malonaldehyde on the Gelation Properties of Miofibrillar Proteins of Sea Salmon. *J. Food Sci.* 68:42-47.
- Tironi, V., Lopez, B., Pellegrino, N., Añón, M. and Tomás, M. 2004. Malonaldehyde-induced Microstructural Modifications in Miofibrillar Proteins of Sea Salmon (*Pseudoperca semifasciata*). *J. Food Sci.* 69:519-523.
- Tomas M. and Anon m. 1990. Study of the Influence of Freezing Rate of Lipid Oxidation in Fish (Salmon) and Chicken Breast Muscle. *Int. J. Food Sci. Technol.* 25:718-721.
- Tsuchiya, T., Yamada, N. and Matsumoto, J. 1977. Extraction and Purification of Squid Myosin. *Jap Soc Sci. Fish.* 44 :175-179.
- Valpuesta J., Ondarroa M. and Goñi F. 1986. Temperature Dependence of Cytochrome C-induced Phospholipid Oxidation in Liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* 878:435-439.
- Woyewoda, A., Shaw, S., Ke, P. and Burns, B. 1986. Recommended Laboratory Methods for Assessment of Fish Quality. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences.
- www.mexfish.com/fish/srra.htm
- Yamaguchi K. and Nakamura T. 1984. Preferential Lipid Oxidation in the Skin of Round Fish. *Bull Jap. Soc. Sci. Fish.* 50:869.