

ANCHOAS EN SALAZON: PARAMETROS QUIMICOS DE CALIDAD

*M.^a Carmen de la Torre Boronat
Concepción Soler Segón*

*Departamento de Bromatología, Toxicología
y Análisis Químico Aplicado
Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona*

RESUM

Es fa una revisió bibliogràfica de l'anàlisi habitual en el peix i derivats, i davant el fet de la inexistència de referències específiques que jutgin la qualitat de les anxoves en salaó, s'ha realitzat un estudi dels paràmetres químics que permetin jutjar més objectivament la seva evolució.

Es proponen aquelles determinacions que podrien ser obligades per definir-ne la qualitat.

Noms clau: anxoves en salaó, analítica de les

RESUMEN

Después de hacer una revisión bibliográfica de la analítica habitual en pescados y derivados, y ante el hecho de que no existen referencias específicas que juzguen la calidad de las anchoas en salazón, se ha realizado un estudio de los parámetros químicos que mas objetivamente permitan enjuiciar

su evolución.

Se proponen aquellas determinaciones que podrían ser obligadas para definir la calidad de las mismas.

Nombres clave: anchoas en salazón, analítica de las

SUMMARY

Having undertaken a bibliographical revision of the analytical process for fish and by-products, and due to the lack of specific references for the evaluation of the quality of salted anchovies, a study has been done of the chemical parameters which permit the

most objective evaluation of their evolution.

We propose those factors which could be compulsory in defining their quality.

Key words: salted anchovies, analytical of

INTRODUCCION

Los productos de la pesca son una importante fuente de proteínas en nuestra dieta, de conocido valor biológico, pero también son un ejemplo de producto perecedero, debido a su composición. Por esta razón, desde siempre, se han ensayado métodos de conservación, muchos de los cuales continúan utilizándose hoy día.

Los métodos tradicionales de secado y salado consiguen productos conservados de características organolépticas muy diferentes a la materia de partida.

El uso de salmuera respeta hasta cierto punto la textura original del pescado. Las salmueras utilizadas pueden estar o no adicionadas de vinagre y/o especias. En castellano reciben el nombre de marinados en fresco o semiconservas.

Estos preparados poseen un tiempo de conservación no muy largo, por lo que su consumo no puede ser dilatado. En la salmuera, el pescado sufre un proceso de maduración y alcanza unas características apetecibles para su consumo, pero además ocurre una evolución degradativa que conviene conocer para asegurar la inocuidad del producto.

Lógicamente hay cambios que pronto trascienden, como el color, olor y sabor, pero de más interés es el estudio de los parámetros químicos que pueden juzgar con mayor imparcialidad la evolución de la maduración de estas semiconservas.

Como ejemplo a estudiar, se han escogido las llamadas «anchoas en salazón o salmuera», conocidas y apreciadas por determinados sectores del público.

El tema nos ha interesado por diferentes razones:

— Para poder conocer mejor los criterios químicos que juzgan estos productos y dar una opinión analítica más correcta, si es posible.

— Ofrecer pautas analíticas que sirvan para el control de estas conservas, muchas de las cuales se expenden sin demasiada atención en nuestros mercados, como es el caso de las anchoas a granel.

— Y porque en Cataluña, sobre todo en la parte norte de la costa de Gerona, existe una producción local típica que, si bien económicamente no es muy importante, merece la pena conocer, al ser un producto nuestro.

1. SITUACION LEGISLATIVA

El Real Decreto 1521/1977, de 3 de mayo, aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de los Productos de la Pesca con destino al consumo humano, en cuyo Título I, Artículo 3º define lo siguiente:

«3. Producto de la Pesca salada.- Es el sometido a la acción de la sal común, en forma sólida o en salmuera.

«4. Producto de la Pesca en salazón.- Es el sometido a la acción prolongada de la sal común, en forma sólida o en salmuera, acompañada o no de otros condimentos o especias.

«9. Producto de la Pesca en semiconserva.- Aunque en sentido general puedan considerarse semiconservas los productos definidos en los puntos 3 al 8 (Producto de la Pesca ahumado, Producto de la Pesca desecado, Producto de la Pesca seco-salado, además de los dos ya citados), a efectos de esta Reglamentación, se establece que es aquel que, con o sin adición de otras sustancias alimenticias autorizadas, se ha estabilizado para un tiempo limitado, por un tratamiento apropiado y se ha mantenido en recipientes impermeables al agua, a presión normal».

En esta Reglamentación también se habla de las características organolépticas del pes-

cado fresco y productos terminados (BOE nº 157, 1977).

El 1º de agosto de 1984, se ha aprobado el real Decreto 1521/1984, nueva Reglamentación Técnico-Sanitaria de los Establecimientos y Productos de la Pesca con destino al Consumo Humano (BOE nº 201, 1984).

Respecto a la anchoa, específicamente, tenemos la Orden del Ministerio de Comercio, de 7 de agosto de 1972, por la que se dictan normas técnicas y comerciales de calidad, que regulan su comercio exterior. En el Apartado II, punto 3.1., se determinan las condiciones mínimas de calidad para la materia prima y el producto terminado, refiriéndose a:

«a) Carne de consistencia suficientemente firme y sin que presente un grado avanzado de autólisis.

«b) Aroma y Sabor peculiares del producto.

«c) Carne de color blanco-rojizo o pardo-rojizo.

«d) El contenido mínimo de cloruros será del 15%, determinado según el método descrito en el anexo I» (Método de Volhard) (BOE nº 224, 1972; BOE nº 270, 1974)

2. ELABORACION DE LAS ANCHOAS EN SALAZON O SALMUERA

El salado es un método de conservación que se conoce de antiguo y es, aún hoy día, una técnica que se realiza de manera empírica y práctica.

La elaboración de la anchoa es aún una técnica artesanal, que la legislación española define de la siguiente manera:

«Se entiende por "anchoa en salazón" la denominada *Engraulis encrasicolus*, des-

provista de cabeza y vísceras, debidamente sazónada en sal común, prensada y madurada. Se presentará en envases herméticamente cerrados o en barriles, debiendo aparecer las anchoas seleccionadas por tamaños y empacadas en capas o camadas uniformes» (BOE nº 179, 1964).

El boquerón se pesca en casi toda la costa española, mediterránea y atlántica. A pesar

de la extensión de la pesca, podría decirse que cada productor elabora estas semiconservas a su estilo, como producciones artesanales y familiares que son. Así, pues, en L'Escala (Alt Empordà), provincia de Gerona, se elaboran de la siguiente manera:

Una vez el boquerón esta fuera del agua, se pone en salmuera; luego es preciso desca-bezarlo y extirparle la tripa, pero sin abrirlo en canal y conservando el hilo rojizo que va de la cabeza a la tripa. Posteriormente, se colocan en bidones, con capas alternativas de sal y pimienta, conservándose en los almacenes a una temperatura constante. Luego, cuando la maduración ya es patente, las anchoas se colocan en el bote a base de pisos sucesivos, separados por capas de salmuera y una capa final que las cubra totalmente, antes de cerrar herméticamente.

El fenómeno que tiene lugar, una vez entran en contacto con la salmuera, es la ma-

duración. Es el mecanismo bioquímico, no del todo conocido, que provoca la autólisis de la proteína. Numerosos autores están de acuerdo en que los microorganismos del pescado no participan en el proceso, y si existen alteraciones bacteriológicas serán debidas a la contaminación inicial del pescado en el momento de eviscerarlo o por lo escaso del cloruro sódico (Pirati, 1971).

Desde 1939 se admite que la catepsina interviene en la proteólisis y, posteriormente, también se mencionó la peptidasa (Baldrati, 1977).

El resultado es la disminución gradual de la rigidez del músculo, éste se torna blando y comestible. En la autólisis se produce la rotura de diferentes estructuras, apareciendo sustancias que inicialmente no estaban presentes y que pueden utilizarse como parámetros del estado de deterioro (Primo, 1979; Leandro, 1981).

3. EL BOQUERON

El boquerón, *Engraulis encrasicolus* L., es la materia prima en la elaboración de la anchoa; pertenece a la familia *Engraulidae* que agrupa los géneros *Engraulis*, *Stolephorus* y *Anchovia*.

El boquerón está ampliamente distribuido, principalmente en las zonas cercanas al ecuador terrestre, siendo Perú y Argentina grandes productores; respecto al mar Mediterráneo, hay gran dispersión.

Según Fage (1911), existen dos razas en nuestras latitudes, la atlántica y la mediterránea, que se distinguen por el número de vértebras, la posición de la aleta dorsal y el número de líneas en ellas.

Existen numerosos trabajos que recogen datos biológicos y biométricos para diferentes zonas de la costa española; nosotros nos referiremos al trabajo de Fage, L., ya que trata de manera muy completa el boquerón mediterráneo.

El boquerón es una especie no migratoria que, en determinadas épocas del año, aparece cerca de la costa. Esto es debido a las necesidades de su ciclo, de manera que cuando descienden las temperaturas, a principios de invierno, empiezan a sumergirse hacia las profundidades —100-150 m.— hasta encontrar una temperatura constante de 13°C. aproximadamente. Allí llevan una vida sedentaria alimentándose de diatomeas, desarrollando sus gónadas; cuando las temperaturas vuelven a aumentar, a principios de abril, ascienden a la superficie, cerca de la costa, donde llevan una vida pelágica, activa, alimentándose, y realizarán la freza.

La edad de los jóvenes se mide por centímetros, pero en los adultos está inscrita en las escamas, ya que cada descenso marca un tiempo de no desarrollo de las mismas, debido al cambio de hábitos que tiene lugar. También parece ser que los boquerones más

jóvenes se mantienen juntos en profundidad, mientras que los adultos se encuentran dispersos en el fondo.

El ciclo anual en nuestras latitudes repercute en cierta manera en la composición química, ya que varía en función de numerosos factores, como son la época de alimentación activa, acumulación de reservas,

edad, sexo, estado de madurez sexual, engrasamiento, etc.

Respecto a la grasa, se ha visto que la muscular tiene variaciones estacionales acusadas: en primavera-verano hay valores máximos y en otoño-invierno, mínimos, como refleja la Figura 1. A finales de marzo, el máximo empieza a descender, lo que coincide con la

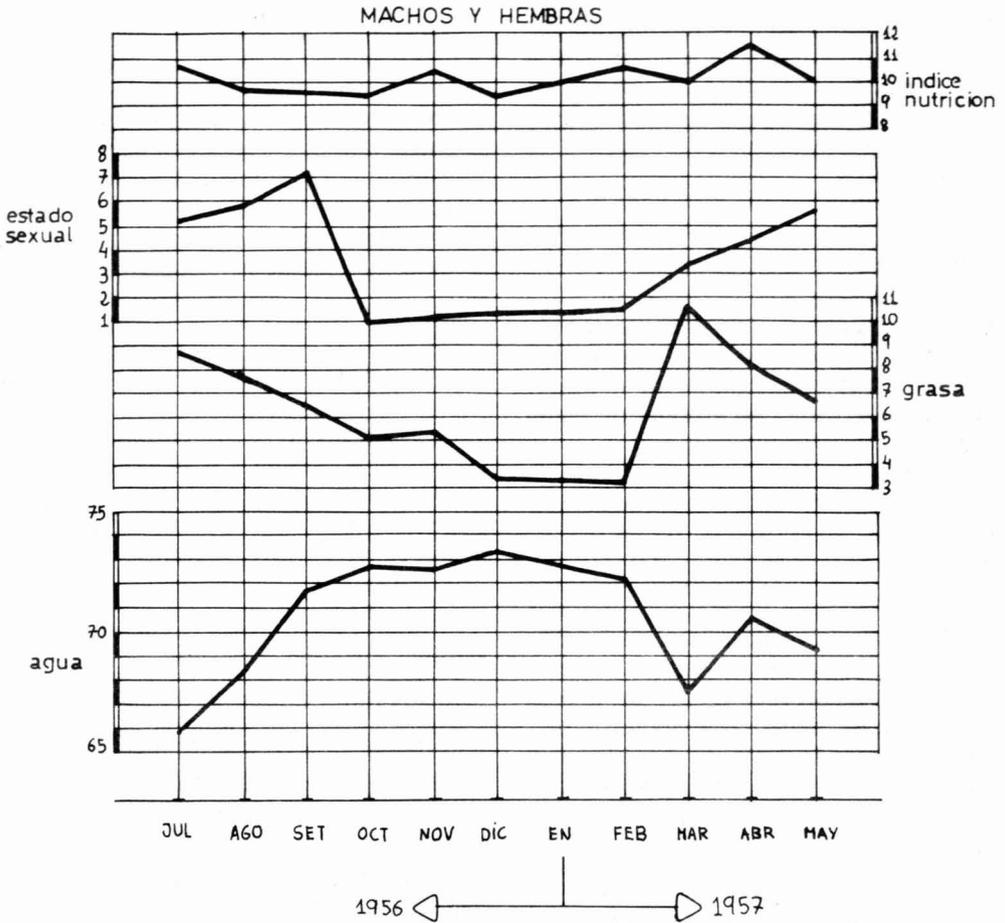


FIGURA 1. Variaciones estacionales (Fernández, 1960)

actividad sexual, descendiendo más al final del desove. La grasa visceral también disminuye en la misma época, pero se recupera antes que la muscular, durante el período de

reposo de las gónadas. La época de mayor peso coincide con la máxima grasa (Fernández, 1960).

4. EL MUSCULO DE PESCADO: COMPOSICION (Primo, 1979; Leandro, 1981; Hultin, 1984)

La composición del músculo interesa para saber el origen de una serie de sustancias que posteriormente se estudian. Diferenciamos tres grupos de sustancias para los pescados en general, y un cuarto grupo para los pescados grasos.

4.1. Proteínas

El pescado es un producto eminentemente proteico, las proteínas son de gran valor biológico por la existencia de aminoácidos esenciales, que varían en proporción según la especie.

Son las responsables de las propiedades físicas. Así, cualquier modificación en las mismas se refleja en sus características, que interesan tanto para el consumo como para su industrialización. Se dividen en:

— Proteínas sarcoplásmicas, en las que destacan los sistemas enzimáticos del metabolismo, que generalmente actúan a baja temperatura, de manera que cuando el pescado es refrigerado o puesto en hielo, acabado de pescar, pueden ocurrir grandes cambios, debido a que los sistemas enzimáticos continúan actuando.

— Proteínas miofibrilares, que incluyen las proteínas estructurales, actina y miosina principalmente. Son las responsables de la transformación de la energía química en energía mecánica durante los fenómenos de contracción y relajación muscular.

— Proteínas del estroma, que comprenden las proteínas contráctiles, como la desmina y la conectina, y las proteínas del tejido conectivo representado por el colágeno. El porcentaje de colágeno en el pescado es inferior al de los animales terrestres, al no necesitarlo como soporte. Es blando y frágil, inestable a elevadas temperaturas y se destruye fácilmente en la cocción.

4.2. Sustancias nitrogenadas no proteicas

Estas sustancias se encuentran, principalmente, en el plasma y el líquido intracelular. Con su presencia contribuyen al aroma y sabor del pescado, de manera que su alteración o deterioro nos indican su estado. Las principales son:

— Aminoácidos libres, como la glicerina, alanina, histidina, creatina.

— Péptidos, como la anserina.

— Bases púricas, principalmente la urea, que en grandes cantidades da mal sabor, como ocurre en los peces cartilagosos.

— Oxido de trimetilamina, que se obtiene de la ingesta de copécodos, pequeños crustáceos marinos.

— Bases volátiles, cuya concentración aumenta en el proceso de pérdida de frescor, por la acción bacteriana y enzimática durante el almacenamiento.

4.3. Lípidos (Fontaine, 1979; Stansby, 1979; Hultin, 1984)

El contenido graso de los peces magros es del orden del 1%, mientras que en los peces grasos puede ser del 5 al 70%.

Los lípidos presentes en los peces son los habituales en los vertebrados superiores. El porcentaje y clases de ácidos grasos dentro de una misma especie varían en función de varios factores, como son el individuo, edad, sexo, estado nutricional, temperatura ambiente, etc. Lo destacable es la presencia importante de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados, ocupando un segundo lugar los saturados. Por esta razón, los pescados grasos como la caballa, el arenque, el boquerón y otros se utilizan como fuente de ácidos grasos insaturados; los mayoritarios son el ácido oleico (n-9), palmitoleico (n-7), linoleico y linoléico (n-3), que es el mayoritario. Perú es el principal productor de aceite

de pescado (utiliza boquerón).

Se puede concluir respecto a la anchoa que la cantidad y calidad de sus ácidos grasos no se conocen del todo, ya que los datos existentes se refieren a muestras de pocos individuos en determinadas épocas, por lo tanto está sujeto a variaciones.

4.4. Otros componentes

Respecto a la anchoa, como producto elaborado, nos remitimos a los datos de las tablas de composición de alimentos existentes. Como ejemplo, citamos:

— «Tabla de composición de alimentos para uso en América Latina» (Woot-Tsuen, 1964).

— «Composition of Foods», U.S. Department of Agriculture» (Watt, 1975). (Ver Tabla 1).

5. TRANSFORMACION DEL MUSCULO (Primo, 1979; Leandro, 1981; Hultin, 1984)

Cuando el pescado muere, sus características organolépticas son diferentes a las existentes en el momento de consumo, debido a los cambios físicos y bioquímicos que tienen lugar durante este intervalo. (Figura 2).

«In vivo», la principal fuente de energía es la glucólisis. En momentos de actividad y aporte deficitario de oxígeno, el ácido pirúvico no se incorpora al ciclo de Krebs, y pasa a ácido láctico, que es eliminado por el sistema circulatorio.

Cuando ocurre la muerte, hay un cese del aporte nutritivo y de oxígeno, no se eliminan los metabolitos ni el anhídrido carbónico y aparece un desequilibrio que nos llevará al «rigor mortis».

Al inicio del «post mortem», se intenta

mantener el nivel de ATP por vías inmediatas como son:



Pero la principal vía de obtención es la glucólisis a partir de la glucosa aún existente y del glucógeno principalmente. La vía glucolítica produce ATP, pero también produce ácido láctico, que llegará a inactivar la vía. La cantidad de ácido láctico depende de la cantidad de glucógeno existente, que en determinados pescados puede ser baja, debido al esfuerzo realizado en la lucha de la captura; en estos casos el pH no disminuye

tanto y el «rigor mortis» que se instaure será alcalino.

Cuando disminuye el ATP, no regenerándose, ya no puede actuar en la unión actinmiosina, formándose de manera irreversible la actinmiosina, lo que da lugar a la no extensibilidad de las fibras y se instaure el «rigor mortis», de manera que al llegar a este estado se cumple:

- Disminución del pH
- Formación del ácido láctico, de manera que pH inicial 7.2-7.4 disminuye lentamente hasta 6.6 aproximadamente, y a partir de aquí baja rápidamente hasta 5.5-5.4. La velocidad de acidificación depende de la especie.

En el pescado, el «rigor mortis» se instaure entre una y siete horas después de su captura, más rápidamente que en los mamíferos. Es dependiente de la especie, edad, sexo, estado de madurez, músculo utilizado en particular, manufacturación y temperatura.

La principal característica de este estado es la pérdida de extensibilidad de las fibras musculares, considerándose una contracción análoga a la que tiene lugar «in vivo», pero irreversible. También se caracteriza por la inactividad bacteriana.

Posteriormente al «rigor mortis», la rigidez muscular disminuye gradualmente y comienza la llamada fase de «maduración».

Esta disminución gradual es debida a la actividad proteolítica de las enzimas celulares; posteriormente, ya se inicia la putrefacción.

La fracción de sustancias que más contribuye a alterar sanitaria y organolépticamente al pescado son las sustancias nitrogenadas no proteicas, que, degradadas, dan lugar a sustancias no presentes inicialmente y que podrían utilizarse como parámetros del estado de deterioro. Destacan:

- Oxido de trimetilamina, abundante en los peces marinos, que es reducido a trimetilamina, dimetilamina y formaldehído.

- Urea, que da lugar a amoníaco como producto final.

- Ciertos aminoácidos, como:

- histidina que, por medio de la histidin Descarboxilasa pasa a histamina; esta sustancia puede encontrarse en cantidades relativamente altas en determinadas especies, produciendo cuadros toxicológicos (Gallardo, 1983).

- leucina y valina que, transformados pasan a ácido isovaleriánico, aldehído isovaleriánico y ácido α -cetovaleeriánico.

- Nucleótidos, principalmente la degradación del ATP, que da lugar a una serie de sustancias como la hipoxantina (ver Figura 3).

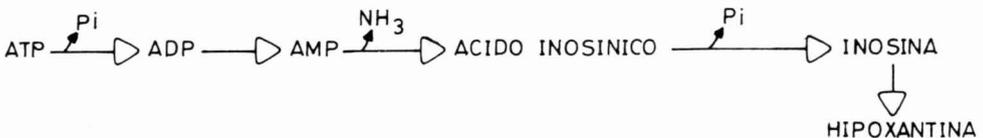


FIGURA 3. Degradación del ATP (Jones, 1964)

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Descriptiva y preparación de las muestras

Se ha trabajado con dos tipos de muestras:

— Anchoas en salazón, envasadas en bote de vidrio, adquiridas en marzo. Del mismo bote se tomaron tres muestras, una en el momento de abrirlo, otra a los quince días, y la tercera, transcurrido un mes. Se enumeraron como M1, M2 y M3.

— Anchoas en salazón, de venta a granel, adquiridas en junio. Se tomó una muestra en el momento, y otra a los quince días. Se numeraron como JN1 y JN2.

Las anchoas se trataron de manera similar a la práctica casera. Se comienza por lavar las anchoas, bajo el grifo, eliminando, con el paso sucesivo de los dedos, la sal impregnada, las escamas y aletas que aún conserven, prosiguiendo, con más presión de los dedos, la piel —de tacto aceitoso— y trozos del filete que se desprenden. Ahora, con la ayuda de los dedos, se abre la anchoa por la mitad, quedándonos dos filetes, uno de ellos con la espina, que separamos. A continuación mantenemos los filetes, durante 10 o 15 minutos, en remojo, para desalarlos y, posteriormente, se escurren durante 5 o 10 minutos sobre papel de filtro. A partir de los filetes así lavados, se prepara una pasta homogénea, que se conserva en recipientes cerrados, en nevera.

6.2. Parámetros

Hemos considerado los parámetros analíticos en tres grupos:

A) PRIMER GRUPO

6.2.1. Determinación de humedad: según las pautas convencionales, utilizando 2g. de la muestra, pasta homogeneizada. Se expresa

en g de agua por 100 g de muestra (de la Torre, 1983).

6.2.2. Determinación de cenizas: incinerando 2 g de muestra, a 450°C, para evitar la pérdida de cloruros (de la Torre, 1983).

6.2.3. Determinación de cloruros: se realiza a partir de las cenizas tratándolas con agua destilada y filtrando hasta un volumen conocido; en una alícuota de él se determinan los cloruros por el método de Mohr. Se expresa en g NaCl por 100 g de muestra.

6.2.4. Determinación de pH: se maceran 2-4 g de pasta con agua destilada, y al cabo de un tiempo, lectura el el pH-metro (Tejada, 1979; Tejada, 1980).

B) SEGUNDO GRUPO: fracción nitrogenada

6.2.5. Determinación de nitrógeno total: se determina por el método de Kjeldahl, utilizando 0,5 g de muestra. Se expresa en g de nitrógeno por 100 g de muestra. A partir de este dato también se puede calcular el porcentaje de proteína, al multiplicarlo por 6,25 (de la Torre, 1983).

6.2.6. Determinación del nitrógeno volátil (NBV): sobre la base del desplazamiento de la fracción volátil con un álcali fijo, a lo largo del tiempo, se han hecho muchas precisiones sobre la metodología más adecuada. Por esta razón ha parecido interesante hacer un breve repaso bibliográfico:

a) Método de Hilling. Este método no utiliza alcalinizante, evitándose los problemas de hidrólisis de compuestos nitrogenados, que pueden interferir en las determinaciones. Utiliza 20 g de músculo que es triturado y macerado con agua destilada. Se centrifuga, decanta, y el extracto se lleva a 100 ml. Una alícuota se destila en corriente de vapor a través de una suspensión de hidróxido cálcico. Se recoge sobre

10 ml de agua y se valora con HCl 0,01 N hasta pH 5,5 (Gallardo, 1979).

b) Método de precipitación tricloroacética. Utiliza 20 g de músculo triturado, macerado con ácido tricloroacético al 5%, se agita, se deja reposar, y el filtrado de lleva a 100 ml; 25 ml son destilados en presencia de NaOH 5% y el destilado se recoge en HCl 0,05 N y se valora con NaOH 0,05 N hasta pH 5,5 (Gallardo, 1979; Gallardo, 1982). Gallardo & al. (1979) utilizan óxido magnésico para evitar la hidrólisis producida por el hidróxido sódico, modificando la técnica, como se puede ver en la Tabla 2.

c) Método de Lücke y Geidel, modificado por Antonacopoulos. La técnica de Lücke y Geidel consiste en la destilación de las bases volátiles del músculo del pescado en presencia de óxido magnésico. Utiliza 5-10 g de pescado triturado destilándolo adicionando 1-2 g de óxido magnésico. El destilado se recoge en ácido sulfúrico 0,1 N añadido de indicador Tashiro (Merck, 1976). El resultado se expresa en mg de nitrógeno por 100 g de muestra, y considera válidos los valores:

Buen estado	30 mg N/100 g M
Aún comestible	40 mg N/100 g M
Descomposición rápida	más de 40 mg N/100 g M

Antonacopoulos (1960) modificó esta técnica, diseñando un aparato de destilación en corriente de vapor (Ver Tabla 2) (Baythien, 1957; Gallardo, 1982).

6.2.6.1. Método utilizado. Se ha utilizado la destilación directa con óxido de magnesio. Se parte de 1-2 g de pasta homogénea y se procede a la destilación, con adición de 4 ml. de suspensión de óxido magnésico al 2%, sobre 10 ml. de ácido sulfúrico 0,1 N en presencia del indicador Tashiro. Se recogen unos 150 ml. del destilado y se valora con NaOH 0,1 N, al retroceso. El resultado se

expresa en mg de N por 100 g de muestra.

6.2.7. *Determinación de trimetilamina.* El pescado fresco tiene un peculiar aroma que se torna, durante la descomposición, en otro persistente, intenso y pútrido. La trimetilamina (TMA) y la dimetilamina (DMA) son los principales responsables del aroma alterado. Por eso nos interesa su determinación. (Ver Tabla 3).

El método de Dyer (1945) utiliza un extracto tricloroacético al que añade formol, tolueno y solución de carbonato potásico. Se agita enérgicamente y se deja reposar. Se pipetea cinco mililitros de la capa orgánica que reacciona con ácido pícrico. Se lee a 410 nm frente tolueno.

Esta pauta ha sido modificada por diferentes autores:

- Hilling & al. (1965) sustituye el extracto por el destilado;
- Tozowa & al. (1970) sugiere el hidróxido potásico como alcalinizante;
- Castell, Dyer & al. (1974) proponen la determinación simultánea de TMA y DMA, ya que según ellos el TMA indica la deterioración microbiana, mientras que la DMA indica la deterioración enzimática en la conservación.

Nosotros hemos utilizado la pauta propuesta por Gallardo & al. (1982), modificación de la de Dyer.

6.2.8. *Determinación de dimetilamina (DMA).* Método espectrofotométrico de Dowden (1938), del ditiocarbamato, basado en la reacción de DMA con S_2C y solución de sulfato cúprico. Se forma un complejo de cobre, amarillo, del ácido ditiocarbámico, insoluble en agua y extraíble con disolventes orgánicos. Las aminas primarias y secundarias no interfieren (Gallardo, 1982).

6.2.9. *Determinación de aminas volátiles por cromatografía de gases.* La trimetilamina y la dimetilamina han sido un tema de estudio durante varias décadas, debido a su re-

lación con la alteración y efectos de la alteración bacteriana en pescado fresco durante el almacenamiento, y en los últimos años se han detectado, sin ser cuantificadas, otras aminas primarias, secundarias y terciarias, que sería importante conocer, ya que se creen precursoras de nitrosaminas carcinogénicas. Parece obvio que la cromatografía de gases podría resolver la analítica cualitativa y cuantitativa de esta mezcla compleja de aminas.

De los trabajos de Keay & al. (1972), Gruger (1972) y Gallardo & al. (1979) entresacamos los puntos fundamentales que se refieren a los detalles de preparación de la muestra y columna cromatográfica que emplean:

- Se parte de un extracto ácido del pescado que se alcaliniza (NaOH o MgO) y se destila (en corriente de vapor o directa) sobre ácido.
- Las soluciones patrón de aminas, por razón de su volatilidad, se valoran por microKjeldahl.
- Los destilados ácidos se emplean ya para su inyección directa en el cromatógrafo, ya por previo lavado con disolventes orgánicos que se desechan.
- Las columnas ensayadas, respectivamente son:
 - .Columna de vidrio, con Silocell C22 (80-100 mallas), Dowfax 9N9, KOH.
 - .Columna de vidrio, con Chromosorb 103 (80-100 mallas).
 - .Columna de vidrio, con Igepal CO-630.

De la discusión de las condiciones cromatográficas se concluye que hay criterios diversos y confrontados respecto a la baja concentración de los destilados, contaminación de las columnas (vida de las mismas) y del bloque de inyección; todo ello nos lleva a comentar que, aunque se hayan propuesto métodos, éstos no son fáciles ni están libres de crítica, por lo que su práctica compleja desborda el interés real del propósito del análisis. Otros parámetros más fáciles de reali-

zar nos pueden llevar a conclusiones muy parecidas para juzgar la evolución de la fracción nitrogenada de los pescados.

6.2.10. Determinación de hipoxantina (Hx). Al morir el pescado se inicia la degradación «post mortem» y con ello el ATP da lugar a 5-monofosfato de inosina (IMP). Esta sustancia contribuye al agradable olor de «pescado fresco», pero posteriormente, en el almacenamiento, prosigue su degradación hacia hipoxantina, con lo que disminuye aquel agradable aroma. El proceso que se supone tiene lugar en el indicado en la Figura 4.

La validez de este parámetro en las determinaciones de calidad es patente en la búsqueda de una técnica rápida de aplicación comercial. Para su valoración se han utilizado métodos por cromatografía en papel, intercambio iónico, precipitación como sal de plata, pero, finalmente, se ha propuesto un método enzimático basado en la oxidación de la hipoxantina (Hx) a ácido úrico (AU), mediante el enzima xantinoxidasa y posterior lectura a 290 nm. (Ver Fig. 5).

La pauta propuesta por Jones-Murray (1964) es la seguida por nosotros. El resultado se expresa en μ mol Hx por g de muestra.

C. TERCER GRUPO: fracción lipídica

6.2.11. Determinación de grasa total. Se emplea la técnica de extracción continua de Soxhlet usando 2-3 g de muestra interponiéndola con sulfato sódico anhidro, hasta conseguir un polvo suelto. El resultado se expresa en g de grasa por 100 g de muestra (de la Torre, 1983).

6.2.12. Determinación de grasa «sin alterar». La grasa extraída por el método Soxhlet no es utilizable para la determinación de ciertos parámetros de calidad, ya que este proceso de extracción supone una calefacción y posible oxidación de la grasa extraída.

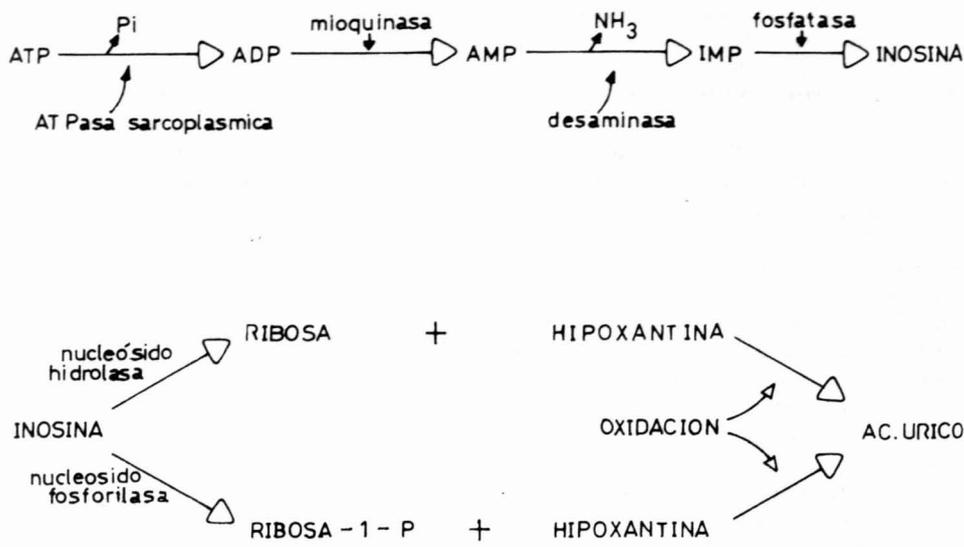


FIGURA 4. Formación de Hipoxantina (Eskin, 1971)

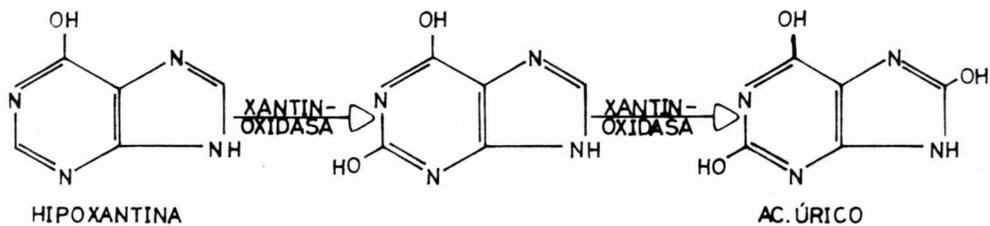


FIGURA 5. Base de método enzimático (Jones, 1964)

Para evitar estos inconvenientes, se procede a una extracción en frío, a partir de 6 g de muestra previamente desecados con 60 g de sulfato sódico anhidro, dispuestos en una columna. Se consigue una buena extracción con la mezcla clorofórmo-metanol 2 ÷ 1, según Folch (1951).

El extracto orgánico, 300 ml, se lavará con 3×100 ml de solución acuosa saturada de cloruro sódico, que facilita la separación de fases. El extracto clorofórmo se recoge en matraz aforado de 200 ml, previa filtración a través de sulfato sódico anhidro.

Esta solución clorofórmo, cuya riqueza se determina en casa caso, expresándose en g de grasa por 100 ml de solución, es la solución de trabajo para cualquier determinación analítica posterior.

Nos ha parecido interesante la determinación de los parámetros siguientes:

- Índice de peróxidos
- Absorción al U.V. o K_{270}
- Índice de Kreiss
- Índice del ácido tiobarbitúrico (TBA).

Ante el hecho de la elevada insaturación de los ácidos grasos de la grasa de esta espe-

cie animal, es lógico presumir que los procesos de autoxidación se pueden instaurar fácilmente, máxime teniendo en cuenta la tecnología que supone la preparación de las anchoas y los períodos prolongados de almacenamiento industrial e inclusive de consumo casero. Por esta razón, los dos parámetros iniciales más usados y conocidos en el control de las grasas oxidadas creemos que deben complementarse con otros, como son el Índice de Kreiss y el Índice de TBA, que nos informan de fases posteriores de la oxidación.

6.2.12.1. Índice de Peróxidos. Determinación según la norma UNE-55.023.

6.2.12.2. Absorción al U.V. o K_{270} . Determinación según la norma UNE-55.047.

6.2.12.3. Índice de Kreiss. Es una reacción conocida de antiguo (1902), que se basa en la formación de un compuesto coloreado, entre el floroglucinol y los productos de oxidación de los cuerpos grasos, en medio ácido. (Ver figura 6).

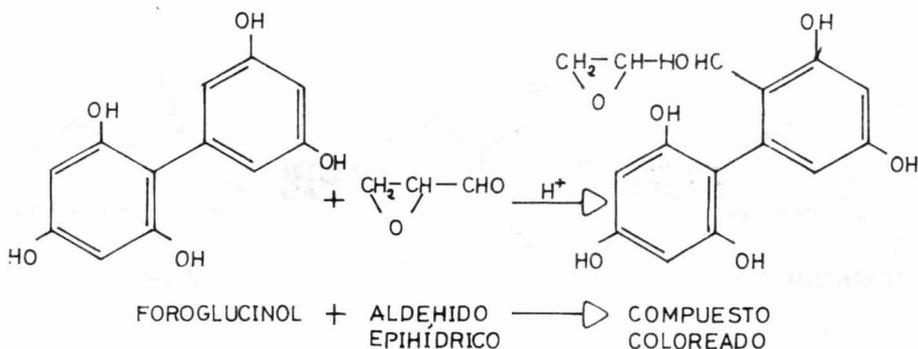


FIGURA 6. Reacción de Kreiss (Pirati, 1971)

Es específico para el aldehído epihídrico; los componentes responsables de la reacción corresponden a los epóxidos o sus acetales, aunque el aldehído malónico también dé positivo, al existir isomería entre él y el 2,3 epoxipropanal.

Es una reacción sensible pero no aplicable a cuantitativa. Hemos seguido la técnica propuesta por K. Taüfel y P. Sadler, en (Beythien, 1957; Olias, 1971).

6.2.12.4. Índice del TBA. Este índice se ha desarrollado para determinar el estado de conservación o evidenciar el desarrollo del enranciamiento de las grasas en los productos alimentarios, más en los elaborados que en los frescos.

Se basa en la reacción del ácido 2-tiobarbitúrico con el aldehído malónico, producto de oxidación de los lípidos muy insaturados, produciendo una coloración anaranjada que se lee a 530 nm. La Figura 7 nos muestra la reacción que tiene lugar según Sunhuber-Yu (1977).

Esta coloración consta de dos componentes, rojo y amarillo, luego hay dos máximos de absorción, a 534 nm y 450 nm respectivamente; pero la mayoría de los autores propone la lectura a 530 nm al ser más estable. (Asakawa, 1975).

El método seguido es el propuesto por Gutiérrez y Vargas (1957). El resultado se expresa en mg de aldehído malónico por Kg de muestra, es decir ppm.

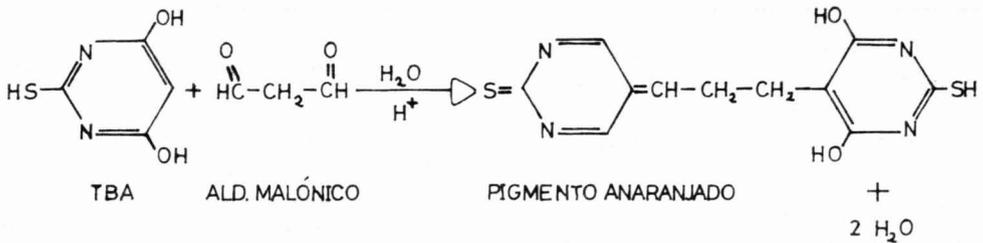


FIGURA 7. Reacción del TBA (Sinhuber, 1977)

7. COMENTARIOS

Los valores de los parámetros estudiados están agrupados en la Tabla 4. Para el primer grupo de parámetros cabe comentar que la determinación de cloruros, tal como se in-

dica, sólo tiene interés para el elaborador, que debe atender a unas concentraciones mínimas en el producto acabado, pero, en el momento de consumo, según se haya mani-

pulado (desalado), los cloruros serán siempre diferentes. El valor del pH es indicativo de la estabilidad del producto.

En cuanto al segundo grupo, se observa que el nitrógeno volátil evoluciona, con el tiempo, a valores superiores. El valor de trimetilamina hallado para las diferentes muestras es bajo, pero se observa que aumenta con el tiempo. La hipoxantina evoluciona paralelamente al nitrógeno volátil y a la TMA.

En el tercer grupo, los valores de Índice de Peróxidos no permiten enjuiciar la evolución de la muestra al ser arbitrarios. Si éste se considera junto con el valor de K_{270} , es fácil interpretar la evolución, ya que los productos de oxidación van disminuyendo y van pasando a secundarios, detectados a 270 nm, lo que nos indica una fase avanzada del deterioro de la grasa. El valor de TBA, en general, disminuye, por la pérdida de sustancias volátiles, lo que es corroborado por el Índice de Kreiss.

De todo esto se concluye:

— De la revisión de la legislación existente sobre semiconservas, no se ha concretado hasta la fecha ninguna Norma de Calidad que defina y regule las anchoas en salazón.

— Los parámetros químicos que juzgan la calidad de los pescados y derivados son vagos, y aunque se deben tomar como punto de referencia, no se adaptan a las particularidades del producto estudiado.

— La tecnología del producto varía según la zona de producción (por ejemplo, la costa cantábrica y la zona de Levante); ello conduce a que el producto que se consigue deba ser diferente, no sólo en su aspecto, sino también en su contenido graso.

— El proceso de maduración supone una evolución muy profunda del material nitrogenado (proteico o no) y de la fracción de

grasa, ésta por su naturaleza tan insaturada.

— Hemos observado que se presta mucha atención a la evolución de la fracción nitrogenada. Si bien ésta es interesante, se debería prestar igual atención a la fracción grasa.

— Entendemos que un estudio profundo que llegue a un detalle muy pormenorizado de los cambios, sin que por ello se deba subestimar, no tiene finalidad práctica para llevar un control periódico de calidad.

— Por estas razones, concluimos respecto a la fracción nitrogenada, que es válida la determinación de nitrógeno volátil y trimetilamina, acompañado del dato de la hipoxantina, ya que supone una fase de alteración diferente, pero relacionada con la transformación del músculo.

— Respecto a la fracción grasa, deben destacarse los parámetros referentes al estudio de la absorción de U.V e índice de TBA, para detectar los productos secundarios de oxidación, tan fácil de generarse en este tipo de grasa.

— El índice convencional de calidad, el de peróxidos, nos parece poco significativo, pues como sabemos un valor bajo puede llevar a conclusiones totalmente falsas sobre el estado de alteración.

— Una Norma de Calidad no debería olvidar las determinaciones:

- pH
- Nitrógeno de bases volátiles
- Trimetilamina
- Hipoxantina
- Índice de Peróxidos junto con absorción al U.V
- Y finalmente, para marcar valores de referencia, se debería realizar un seguimiento real de una misma partida e igual procedencia.

TABLA 1
Composición de la anchoa

	H ₂ O %	Energía Cal	Proteína g	Grasa g	CH g total-fibra	Cenizas g	Ca y P mg
ANCHOA no muy salada con y sin aceite, en escabeche (a)	58,6	176	19,2	10,3	0,3 —	11,6	168 210
ANCHOA fresca (b)	76,4	95	21,5	0,4	— —	2,1	101 272

a. «Composition of food» U.S. Department of Agriculture (Watt, 1972)

b. «Tabla de compensación de alimentos de uso en América Latina (Woot-Tsuen, 1964)

TABLA 2
Métodos para la determinación de N-BV

METODOS	PREPARACION MUESTRA g M volumen final	DESTILACION			RECOLECCION	VALORACION
		Alicuota	Alcali	Condiciones		
HILLING & al (Gallardo, 1979)	Extracto acuoso 20 g 80ml H ₂ O 100ml	Alicuota	Destilación por corriente de vapor a través de Ca (OH) ₂		En 10ml de H ₂ O	HCl 0,01 N hasta pH5,5
Precipitación Tricloroacética (Gallardo, 1979 y 1982)	Extracto tricloroacético 20g 100ml 80ml TCA 5%	25ml	NaOH	Destilación directa	en HCl 0,05 N	NaOH 0,05 N hasta pH 5,5
Variación de GALLARDO & al.(1982)	ídem	25ml 2g	MgO	Destilación directa Destilar 10'	Recoger 40ml en 5ml de ac. bórico al 4% con Tashiro	HCl 0,01 N
LÜCKE-GEIDEL (Beythien, 1957)	Sin extracto	5-10g	M 1-2g	MgO Destilación directa Inicio 10' Destilar 25'	En ac. sulfúrico 0,1 N con Tashiro	NaOH 0,1 N
Variación de ANTONACO-POULOS (Gallardo, 1982)	Sin extracto	10g	M 2g	MgO Destilación directa Destilar 10'	Recoger 120ml en ac. bórico al 4% con Tashiro	HCl 0,01 N

TABLA 3
Métodos para la determinación del TMA y DMA

METODOS TMA	Preparación muestra g M Volumen final	Procedimiento	Longitud de onda
DYER (1959)	Extracto tricloroacético 100 ml	A 1 ml del extracto, diluido a 4 ml se añaden 1 ml de formol al 10%, 10 ml de tolueno y 3 ml de solución saturada de K_2CO_3 . A una alícuota se añade ac. pícrico.	Lectura a 410 nm
Variación HILLIG & al. (1965)	Sustitución del extracto tricloroacético por el destilado		
Variación TOZOWA & al. (1970)	Sugiere el KOH como alcalinizante para disminuir la interferencia la DMA		
Variación CASTELL & al. (1974)	Determinación simultánea de TMA y DMA		
Variación GALLARDO & al. (1982)	ídem	Utiliza KOH al 30% como alcalinizante. Calienta la mezcla de reactivos a 30°C	ídem
METODOS DMA			
DITICARBAMATO (Gallardo, 1982)	ídem	A 1 ml de extracto se añade 1 ml de sulfato cúprico amoniacal y 10 ml de S_2 :Etanol: Cl_3CH . Calentar, agitar y añadir ac. acético al 30%	Lectura a 431 nm

TABLA 4
Evolución de los parámetros analíticos en las muestras estudiadas

	M 1	M 2	M 3	JN 1	JN 2
HUMEDAD %	13,11	31,61	30,01	35,34	33,75
CENIZAS %	8,41	8,85	6,29	7,94	7,10
CLORURO SODICO %	7,30	7,73	5,49	7,28	6,91
pH	5,65	5,6	5,6	5,5	5,4
N - total %	3,05	3,27	3,39	3,41	3,61
PROTEINA %	19,09	20,43	21,18	21,31	22,56
N-BV mg/100g	25,82	26,03	32,19	53,36	60,17
TMA mgN/100g	—	0,4	0,91	0,72	2,6
HIPOXANTINA mol/g	0,19	0,299	0,249	0,376	0,281
GRASA %	2,15	2,12	2,11	2,87	3,16
I*	0,054	0,094	0,056	0,148	0,08
II**					
INDICE meq./Kg PERÓXIDOS	110,2	23,96	19,05	165,94	146,19
K ₂₇₀	5,69	4,38	7,57	8,74	8,18
KREISS	+	+ -	+ -	+ +	+ +
TBA mg al. malónico/Kg	26,56	6,69	12,04	44,0	36,23

* = Extracción Soxlet

** = Extracción Cloroformo-metanol 2:1

8. BIBLIOGRAFIA

- ASAKAWA, Torumi, Yukihiko, Matsuhita, Tetsuro, Noruma.- *Yukugaku*, 1975, 24(2), 88-93
- BALBRATI, G., Guidi, G.; Pirazzoli, P; Porrette, A.- *Tecnologia di trasformazione delle acciughe. B. Influenza della pressatura sulla maturazione delle acciughe sotto sale*. Industria Conserve. 1977, 52, 221-229.
- BEYTHIEN, A., Dieimair, W.- *Laboratoriumsbuch für den Lebensmittelchemiker*. 1957, Verlag Von Theodor Steinkoff, Dresden- Leipzig.
- B.O.E. n.º 179 del 27 de julio de 1964.- *Orden del Ministerio de Comercio de 1 de julio de 1964 por la que se regulan las condiciones que, a efectos de exportación, deben reunir la salazón, la semiconserva y la conserva de pescado*.
- B.O.E. n.º 224 del 18 de octubre de 1972.- *Orden del Ministerio de Comercio de 7 de agosto de 1972 por la que se dictan normas técnicas y comerciales de calidad que regulan el comercio exterior de la anchoa*.
- B.O.E. n.º 270 del 11 de noviembre de 1974.- *Resolución de la Dirección General de Exportación del Ministerio de Comercio de 5 de noviembre de 1974 sobre modificación de la norma anterior*.
- B.O.E. n.º 157 del 2 de julio de 1977.- *Real Decreto 1521/1977, de 3 de mayo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria de los Productos de la Pesca con destino al consumo humano*.
- B.O.E. n.º 201 del 22 de agosto de 1984.- *Real Decreto 1521/1984 del 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria de los Establecimientos y Productos de la Pesca con destino al consumo humano*.
- CASTELL, C.H., Smith, C.; Dyer, W.J.- *Simultaneous measurements of trimethylamine and dimethylamine in fish, and their use for estimations quality of frozen stored gaidoid filets*. J. Fisher. Res. Board Can., 1974, 31, 383-389.
- DYER, W.J.- *Report on trimethylamine in fish*. J. Ass. Off. Anal. Chem., 1959, 42(2), 292-294.
- ESKIN, N.A.M. & al.- *Biochemistry of Foods*, 1971, Academic Press. New York-London.
- FAGE, L.- *Recherches sur la biologie de l'anchoie*. Ann. Inst. Oceanogr., 1911, Tomo II, Fasc. 4, 1-18.
- FERNANDEZ, C., del Valcórdon, M.J.- *Estudio preliminar sobre la biometría, biología y variación del contenido graso del boquerón (Engraulis encrasicolus) de Málaga*. Bol. Inst. Esp. Oceanogr., 1960, 99, 1-28.
- FOLCH, J., Ascoli, A.; Lees, M.; Meath, J.A.; Lebaron, F.N.- *Preparation of lipids extracts from brain*. J. Biol. Chem., 1951, 191, 833-841.
- FONTAINE, M.- *Nutrition des poissons*. 1981, Ed. CNRS, Actes du College CNERNA, Paris, Mai 1979.
- GALLARDO, J.M. & al.- *Determinación de bases volátiles en productos pesqueros*. Inf. Tec. Inst. Inv. pesq. CSIC n.º 65, 1979.
- GALLARDO, J.M., Montemayor, M.I.- *Métodos generales de análisis utilizados en el examen del pescado y productos pesqueros con referencia a su alteración*. Inf. Tec. Ins. Inv. Pesq. CSIC n.º 95, 1982.
- GALLARDO, J.M., Montemayor, M.I.; Pérez-Marín, R.- *Determinación de histidina e histamina por cromatografía bidimensional de capa fina y densitometría*. Agroquim. Tecnol. Aliment., 1983, 23,(1), 132.
- GRUGER, E.H. jr.- *Cromatographic analysis of volatile amine in marine fish*. J. Agric. Food. Chem., 1972, 20 (4), 781.
- GUTIERREZ, R, Vargas, A.- *Grasas y Aceites*. 1957, 8, 73.
- HILLIG, F., Betheas, S.- *Determination of trimethylamine in extracts and volatil fractions of fish*. J. Ass. Off. Anal. Chem., 1965, 48, 731.
- HULTIN, H.O.- *Post-mortem biochemistry of meat and fish*. J. Chem. Educ., 1984, 61(4), 289-298.
- IDLER, D.R., Tamura, T.; Naimai, T.- *Seasonal variations in sterol fat and unsaponifiable components of scallop muscle*. J. Fisher. Res. Board Can., 1964, 21 1032-1035.
- JONES, N.R., Murray, J. & al.- *Rapid estimation of hypoxanthine concentrations as indices of the freshness of chilled fish*. J. Sci. Food. Agric., 1964, 15, 763.
- KEAY, J.N., Hardy, R.- *The separation of aliphatic amines in dilute aqueous solution by gas-cromatography and application of this technique to the quantitative analysis of tri and dimethylamine in fish*. J. Sci. Food. Agric., 1972, 23, 9-19.
- LEANDRO MONTES, A.- *Tratado de Bromatología*. Tomo I, 1981, Ed. Universitaria de Buenos Aires. Abril.
- MERCK.- *The Merck Index*. Edición 9ª, 1976. Ed. Merck & Co. Inc., USA.
- NORMA UNE - 55.023. *Indice de Peróxidos*.
- NORMA UNE - 55.047. *Medida espectrofotométrica de la absorción en la región ultravioleta*.

- OLIAS, JIMENEZ, J.M.- *Grasas y Aceites*. 1971, 22, 81.
- PIRATI, G., Guidi, G.- *Influenza della temperatura di conservazione sui filetti di acciughe all'olio*. *Industria Conserve*, 1971, 45, 103.
- PRIMO YEFERA, M.- *Química Agrícola*. Tomo III, Alimentos, 1979, Ed. Alhambra.
- STANSBY, M.E.- *Marine derived fatty acid of fish oils as raw material for fatty acid manufacture*. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1979, 56, 793A-796A.
- SINHUBER, R.D., Yu, T.C.- *The 2-thiobarbituric acid reaction, an objective measure of the oxidative deterioration occurring in fats and oils*. *Yukugatu*, 1977, 26, 259-267.
- TEJADA YABAR, M.- *Estudios sobre desnaturalización proteica en pastas de jurel (*Trachurus trachurus L*) congeladas y conservadas al estado congelado*. A. *Alimentaria*, n.º 108, 39, 1979 — B. *Alimentaria*, n.º 109, 115-163, 1979 — C. *Alimentaria*, n.º 110, 25-60, 1980.
- TOZOWA, H., Enokibara, K.; Amano, K.- *Effect of dimethylamine on the value of trimethylamine determined by Dyer's method*. *Bull. Jap. Sci. Fich.*, 1970, 36, 606-611.
- de la TORRE BORONAT, M.C., Moreno Martín, F.- *Tratado de Bromatología*. 1983, Universidad de Barcelona, Fac. de Farmacia.
- WATT, B.K., Merrill, A.L. & al.- *Composition of Food*. October 1975, Agriculture Handbook N.º 8, U.S. Department of Agriculture, Washington D.C.
- WOOT-TSUEN WU LEUNG.- *Tabla de composición de los alimentos para uso en América Latina*. 1964, Ed. Interamericana.