

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Estudio de un sensor de caducidad
para alimentos
Study of a food caducity sensor

Autor

NICOLÁS GRACIA VALLÉS

Directoras

CRISTINA NERÍN DE LA PUERTA
RAQUEL BECERRIL URIOL

Facultad de Ciencias

2017

ÍNDICE

Resumen/Summary	3
1. Introducción	4
2. Objetivos	6
3. Caracterización de la merluza	7
3.1 Materiales y métodos	7
3.1.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	7
3.1.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	7
3.1.2.1 Preparación de las muestras	7
3.1.2.2 Siembra de las muestras y medios de cultivo	7
3.1.2.3 Contaje de unidades formadoras de colonias	8
3.1.3 CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA: determinación de los volátiles liberados por la merluza a lo largo del tiempo de almacenaje	9
3.1.3.1 Preparación de las muestras de análisis:	9
3.1.3.2 Método de Nessler	9
3.1.3.3 Método del azul de metileno	11
3.1.3.4 Medida de pH	12
3.1.3.5 Análisis de compuestos volátiles por cromatografía de gases	12
3.2 Resultados y discusión	13
3.2.1 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	13
3.2.1.1 Análisis microbiológico de las muestras sembradas	13
3.2.2 CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA: determinación de los volátiles liberados por la merluza a lo largo del tiempo de almacenaje	15
3.2.2.1 Análisis de la concentración de NH ₃ por el método Nessler	15
3.2.2.2 Análisis del SH ₂ producido por el método de Azul de metileno	17
3.2.2.3 Cromatografía de gases	17
4. Sensor de caducidad	19
4.1 Materiales y métodos	19
4.1.1 Preparación de los sensores/indicadores de frescura	19
4.1.2 Preparación de las muestras de merluza con los indicadores	20
4.2 Resultados y discusión	20
4.2.1 Resultados de los sensores/indicadores de frescura	20
5. Conclusiones/Conclusions	24
6. Bibliografía	25
7. Anexos	27

ESTUDIO DE UN SENSOR DE CADUCIDAD PARA ALIMENTOS

Resumen

El objetivo del proyecto era el desarrollo de un indicador de frescura para la merluza, en atmósfera protectora, que cambiara de color al alcanzarse el límite microbiológico de consumo humano. Para ello se hizo un análisis microbiológico de la merluza para conocer en qué momento se alcanzaba ese límite y cuáles eran las especies de bacterias predominantes. Una vez hallado el día en el que se alcanza el límite, se realizó un análisis de los volátiles liberados, durante el deterioro de la merluza, que pudieran ser utilizados como diana para el indicador o que pudieran causar interferencias. Para ello se utilizaron diferentes técnicas de análisis de extracción gas-líquido (métodos de Nessler y azul de metileno) y microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza junto con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS).

Se probaron seis fórmulas diferentes en el desarrollo de los indicadores de frescura que debían cambiar de color en el momento deseado, al alcanzar el límite microbiológico, además el cambio tenía que ser claro para que pudiera ser fácilmente interpretado por el consumidor. Los indicadores se prepararon como etiquetas autoadhesivas y se analizaron en muestras de merluza envasada con atmósfera protectora. Se realizó un seguimiento de la evolución de los indicadores hasta alcanzarse el día del límite.

Summary

The project objective was to develop a freshness indicator for hake packaged under modified atmosphere that should change the color when hake reaches the microbiological limit for human consumption. Microbiological analysis was done to know when that limit was reached and what bacteria were predominant. Once it was known, the analysis of volatile compounds released by hake during their spoilage was performed to identify possible targets for the indicator or substances that could cause interferences with the indicator. For this purpose, various analytical techniques were used, gas-liquid extraction (Nessler and methylene blue methods) and head space solid phase microextraction with gas chromatography coupled to mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS).

For the freshness indicator, six different formulas were tested. They should change the color when the microbiological limit was reached. Besides, the change of color should be clear to be easily identified by the consumer. The indicators were made as shelf-adhesive labels and analysed on samples of hake packaged with modified atmosphere. The evolution of the indicators was studied until the end microbiological shelf life.

1. Introducción

La merluza es el pescado blanco más consumido en España con un consumo medio anual de 5,3 kg/persona. Se consumen ocho especies diferentes predominando la merluza europea con una estacionalidad (*Merluccius merluccius*) de abril a septiembre, siendo sustituida por otras especies de merluza el resto del año (MAGRAMA, 2015). La merluza pertenece al orden *Gadiformes*, familia *Gádidos* y género *Merluccius*. En este proyecto se trabaja con merluza capturada en el Atlántico sureste, donde predominan las especies de merluza *Merluccius capensis* y *Merluccius paradoxus*. Estas especies son muy importantes para el mercado pesquero español debido a la estacionalidad de *M. merluccius* (MAGRAMA, 2015). Se comercializa principalmente fresca entera (MAGRAMA, 2015), sin embargo, debido a los nuevos hábitos de consumos cada vez es más frecuente encontrarla envasada con atmósfera protectora en forma de filetes.

Las atmósferas protectoras o envasado en atmósfera modificada (MAP) reemplazan el aire en el envasado por una atmósfera compuesta por una combinación de O₂, N₂ y CO₂ en diferentes proporciones. Esto, junto al almacenamiento refrigerado alarga la vida útil del producto manteniendo las características organolépticas y sanitarias deseadas al ralentizar el crecimiento bacteriano (Cann, 2001). La atmósfera protectora recomendada por la FAO para pescados blancos como la merluza contiene 40% CO₂, 30% N₂ y 30% O₂ (Cann, 2001). Esta composición es adecuada debido a que el CO₂ reduce el crecimiento bacteriano, el O₂ previene los cambios de color y el blanqueamiento, por último el N₂ es inerte y sirve para diluir la mezcla gaseosa. La ventaja de comercializar el pescado envasado con atmósfera protectora es que tiene una mayor vida útil respecto a su comercialización habitual, como una pieza entera.

Los principales géneros bacterianos causantes del deterioro organoléptico de la merluza, durante su almacenamiento son *Shewanella* y *Pseudomonas*. Estas bacterias Gram negativas y psicrófilas (Ordoñez et al. 2000) producen sustancias causantes del mal olor, tales como aminas volátiles aminas biógenas o compuestos azufrados. Especial importancia tiene la especie *Shewanella putrefaciens*, principal responsable de la producción de ácido sulfídrico (SH₂), un gas tóxico y que huele a huevos podridos (Baixas-Nogueras et al. 2009). Otras bacterias importantes en el deterioro de la merluza son:

- La familia *Enterobacteriaceae* son bacterias Gram negativas, producen aminas volátiles y biógenas (Ordoñez et al. 2000).
- Las bacterias ácido lácticas son Gram positivas, producen algunas aminas biógenas y ácido láctico (Ordoñez et al. 2000).
- *Photobacterium phosphoreum* es Gram negativa de la familia *Vibrionaceae*, y es una de las mayores productoras de trimetilamina (TMA) y también produce aminas biógenas, pero no es productora de sulfídrico (Delgaard et al. 1996, Elvira López-Caballero et al. 2002).

La contaminación del músculo estéril de la merluza, por estas bacterias, tiene lugar durante la limpieza del pescado al destriparlo y cortarlo, pasando las bacterias al músculo desde la piel y las vísceras. En cuanto a los compuestos volátiles que se producen, por causa de las especies bacterianas nombradas anteriormente, destacan por su contribución al deterioro organoléptico de la merluza el amoniaco (NH₃), la trimetilamina (TMA), el ácido sulfídrico y

otros compuestos azufrados. El más importante de éstos es la TMA, es el principal causante del mal olor característico del pescado en mal estado, se produce por la reducción del óxido de trimetilamina (TMAO) que se encuentra de forma natural en el músculo de los filetes y tiene una función osmorreguladora (Baixas-Nogueras et al. 2003).

Junto a la función protectora que tiene un envase, en los últimos años se ha desarrollado un nuevo concepto de envase, el envase inteligente, definido por la Unión Europea como un tipo de envase que permiten monitorizar las condiciones de los alimentos envasados así como de su ambiente durante las etapas de distribución y conservación. Dichos envases contienen sensores químicos que son dispositivos que transforman una señal química dependiente de la concentración de un componente específico de una muestra, en una señal analítica fácilmente interpretable. Estos sensores pueden ser cuantitativos o cualitativos y ser de diferentes tipos: ópticos, electroquímicos, eléctricos, magnéticos, termométricos, etc. (Hulanicki et al. 1991). Dentro de los sensores destacan, por su facilidad de interpretación, los indicadores colorimétricos que proporcionan información visual y cualitativa (o semicuantitativa) por medio de un cambio de color. Dentro de los indicadores se encuentran diferentes tipos (Vanderrost et al. 2014):

- Indicadores de gas: detectan cambios en la composición de la atmósfera protectora, lo que sirve como señal de problemas en la integridad del envase que afectarán a la calidad del alimento.
- Indicadores de frescura: dan información sobre la calidad del producto a partir del crecimiento microbiano o cambios químicos en el producto. El crecimiento microbiano se detecta por la reacción de metabolitos, producidos por los microorganismos, con el indicador. Este es el tipo de indicador que se desarrollará en el presente proyecto.
- Indicadores de tiempo-temperatura: indican si ha habido algún cambio de temperatura durante el almacenamiento del producto.



Figura 1. Ejemplo de un indicador de temperatura de la empresa Freshpoint.

Puesto que uno de los principales problemas del pescado es la contaminación microbiana es útil el desarrollo de un indicador de frescura que indique el momento en el que el pescado alcanza 10^7 cfu/g, el límite máximo de microorganismos definido por La Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF) para consumo humano (ICMSF, 2011). Dicho indicador se basará en un cambio de color que debe ser fácilmente identificado por el consumidor.

Debido a que el indicador se basará en los volátiles liberados por el pescado durante el crecimiento de los microorganismos, es necesario conocer que compuestos son los que aumentan cuando el número de microorganismos alcanza el límite de aceptabilidad.

Existen diferentes técnicas que permiten evaluar los volátiles liberados por los microorganismos. La más común es la cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC/MS), dicha técnica permite identificar y cuantificar los compuestos volátiles. Esta técnica se puede utilizar junto a la microextracción en fase sólida (SPME), que permite extraer los compuestos del espacio de cabeza con mayor sensibilidad. La HS-SPME es una de las metodologías más populares en la detección cuantitativa de volátiles en gran variedad de alimentos (Chan et al. 2006).

A pesar de su potencia y sensibilidad, ciertos compuestos son difíciles de detectar con la espectrometría de masas. Este es el caso de los compuestos de bajo peso molecular, como el NH₃ y el SH₂. Estos compuestos que no requieren ser identificados previamente pueden ser cuantificados utilizando técnicas de extracción gas-líquido con detección colorimétrica o espectrofotométrica.

2. Objetivos

- El objetivo principal es el desarrollo de un sensor para merluza que cambie de color al alcanzarse el límite microbiológico de 10⁷cfu/g establecido por la ICMSF.

Los objetivos secundarios:

- Estudio del crecimiento microbiano en la merluza durante su almacenamiento en atmósfera protectora.
- Identificación de los volátiles producidos durante el almacenaje de la merluza en atmósfera protectora.
- Desarrollo de un método para la determinación de NH₃ en espacio de cabeza utilizando el reactivo de Nessler.
- Desarrollo de un método para la determinación de SH₂ en espacio de cabeza utilizando la metodología del azul de metileno.

3. Caracterización de la merluza

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

La merluza necesaria para los experimentos se adquirió en el supermercado. Las muestras de merluza adquiridas eran procedentes del Atlántico sureste, fueron capturadas con, sedales y anzuelos, y desembarcadas en Walvis Bay (Namibia). Por la localización geográfica de la captura es probable que la merluza fuera de las especies *M. capensis* y *M. paradoxus*. La merluza se troceó en muestras de 100 y 200 gramos y se congeló hasta su uso posterior.

3.1.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

3.1.2.1 Preparación de las muestras

Se descongelaron 200 gramos de merluza y se prepararon muestras de 4 gramos. Las muestras fueron colocadas en una placa de Petri e introducidas en una bolsa de vacío para envasarlas en atmósfera modificada en su almacenamiento. La atmósfera modificada utilizada es la recomendada por la FAO, y utilizada en Pastoriza et al. (1996), contiene 40% CO₂, 30% N₂ y 30% O₂. Para el envasado se utilizó una envasadora al vacío de campana Tekvac 410 (Distfom, Lérida, España) que elimina la atmósfera estándar, la sustituye por la atmósfera protectora y sella las bolsas de vacío. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C hasta su uso.



Figura 2. Máquina de vacío TekVac 410 utilizada para conseguir la atmósfera protectora.

3.1.2.2 Siembra de las muestras y medios de cultivo

Se determinó el número de microorganismos en las muestras de merluza a los días 0, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 de ser envasadas con la atmósfera protectora.

Cada día se sacó una muestra de 4 g de refrigeración, se mezcló con 36 mL de agua de peptona en una bolsa de Stomacher y se homogeneizó durante 2 minutos a 265 rpm en un Stomacher-400 Circulator (Seward, Reino Unido). Con esto se consigue que las bacterias que se encuentran en la merluza pasen al medio líquido, agua de peptona.

Una vez se tuvieron las muestras homogenizadas se prepararon diluciones 1/10 en tubos con suero fisiológico estéril, desde la dilución 10⁰, obtenida de la homogenización en el Stomacher, hasta la dilución 10⁷. Se sembraron, para cada uno de los medios seleccionados, 1 mL de cada muestra diluida por el método de siembra en masa. Las diluciones sembradas, normalmente dos diluciones por día, dependieron del día en el que se realizaron, siendo menores los

primeros días y mayores los últimos. Las placas así sembradas se incubaron para su posterior recuento.

A continuación, en la Tabla 1 se detallan los medios de cultivo utilizados y las condiciones de incubación para cada medio:

Medio de Cultivo	Condiciones de incubación	Tipo de microorganismos detectados	Referencia
Plate Count Agar (PCA)	72 horas a 30°C (mesófilas) o a 4°C (psicrófilas) en aerobiosis	Bacterias totales mesófilas y psicrófilas	ISO 4833-1-2013 Ordoñez et al. 2000
Violet-Red-Bile-Glucose agar (VRBG agar)	24 horas a 37°C en aerobiosis	Enterobacterias	ISO 11133-2014 Ordoñez et al. 2000
Iron Agar Lyngby	72 horas a 25°C en aerobiosis	Bacterias productoras de sulfhídrico	Baixas-Nogueras et al. 2009
De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar)	72 horas a 30°C en microaerofilia	Bacterias ácido lácticas	ISO 15214-1998 Ordoñez et al. 2000

Tabla 1. Condiciones de incubación y tipos de microorganismos para los medios utilizados.



Figura 3. Medios de cultivo utilizados en las siembras. De izquierda a derecha, Iron Agar Lyngby, VRBG agar, MRS agar y PCA.

3.1.2.3 Contaje de unidades formadoras de colonias

El recuento de unidades formadoras de colonias (CFU) se realizó tras la incubación de las placas en las condiciones reflejadas en la tabla 1. Se tuvieron en cuenta para el recuento las placas que contenían más de 10 y menos de 300 CFU, siguiendo la Norma ISO 4833-1:2013. Se realizó el recuento de todas las bacterias que crecían en la placa excepto en el medio diferencial Iron Agar Lyngby, donde sólo se tuvieron en cuenta las colonias negras productoras de sulfhídrico.

3.1.3 CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA: determinación de los volátiles liberados por la merluza a lo largo del tiempo de almacenaje

3.1.3.1 Preparación de las muestras de análisis:

A partir de merluza descongelada se prepararon muestras de 6 gramos en viales de 20 mL con atmósfera protectora y se almacenaron a 4°C. Los días analizados fueron el 3, 6, 7 y 8 desde la preparación de las muestras.

Para conseguir la atmósfera modificada los viales con las muestras se metieron en las bolsas de vacío junto con los tapes, se llevaron a la envasadora de vacío donde se intercambió la atmósfera estándar por la protectora, se sellaron las bolsas y se cerraron los viales a través de las bolsas.



Figura 4. Muestras de merluza en los viales preparados para ser envasados en atmósfera protectora.

3.1.3.2 Método de Nessler

El objetivo de este método es la determinación de la concentración de amoniaco (NH_3) producido mayoritariamente por las bacterias que contaminan la merluza y se libera a la atmósfera. Es un método espectrofotométrico que detecta bajas concentraciones de NH_3 . Se utiliza el reactivo de Nessler, una disolución acuosa de yoduro mercúrico (HgI_2), yoduro de potasio (KI) e hidróxido de sodio (NaOH), que reacciona con el NH_3 de la muestra obteniendo un compuesto de color marrón, $\text{OHg}_2\text{NH}_2\text{I}$. Midiendo la absorbancia de este compuesto a una longitud de onda de 425nm podremos conocer la concentración de NH_3 en la muestra (Krug et al. 1979) (ASTM International, 2008).

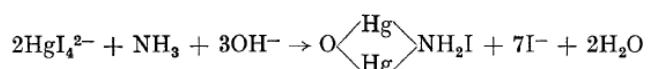


Figura 5. Reacción de Nessler. El reactivo de Nessler (HgI_4^{2-}) reacciona con el NH_3 en medio básico para dar un compuesto coloreado ($\text{OHg}_2\text{NH}_2\text{I}$) (Krug et al. 1979).

En este proyecto existía un problema a la hora de utilizar este método, ya que está diseñado para determinación de NH_3 en disolución acuosa en vez de en atmósfera. Para solucionar este problema se realizó una extracción gas-líquido previa, utilizando para ello una fibra semipermeable de polipropileno (300/1200 PP® Membrana GmbH Wuppertal-Germany) que deja pasar el NH_3 gas, y en cuyo interior hay un tampón KCl/HCl de pH 2 que absorbe el NH_3 manteniéndolo en disolución en forma de amonio (NH_4^+). Toda el agua utilizada en este método es H_2O miliQ para evitar interferencias.

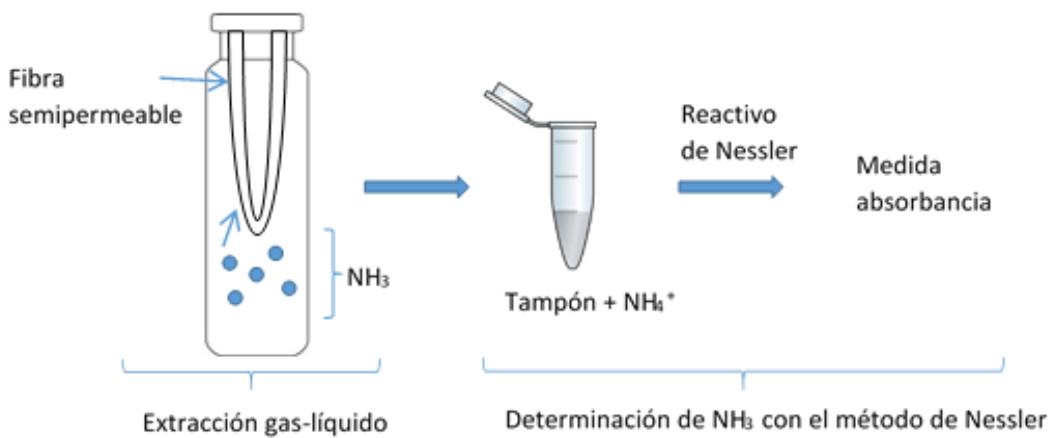


Figura 6. Esquema de la extracción gas-líquido del amoniaco y su posterior determinación.

- Optimización del método y recta de calibrado:

Se prepararon 6 disoluciones patrones de (NH₄)₂SO₄ para la optimización y para la recta de calibrado, de 6,81 mmol/L, 5,30 mmol/L, 4,54 mmol/L, 3,78 mmol/L, 2,65 mmol/L, 2,08 mmol/L, 1,51 mmol/L y 0,757 mmol/L.

Se cortó la fibra en fragmentos pequeños de 6-8cm y se rellenó con 30 µL del tampón KCl/HCl. Se sellaron los extremos de la fibra y se pegó con un poco de celo en el cuello del vial. A continuación se añaden 10 µL de las disoluciones patrón en los viales preparados previamente y sobre estas se añaden otros 10 µL de NaOH 6M, se cierran rápidamente los viales tras añadir el NaOH y se mantienen a 40°C durante 5 minutos. De esta manera se consigue que todo el NH₄⁺ en disolución pase a fase gas en forma de NH₃. Si se considera que todo el NH₄⁺ está en forma de NH₃, se tendrán concentraciones en el espacio de cabeza del vial de 6,81 µmol/L, 5,30 µmol/L, 4,54 µmol/L, 3,78 µmol/L, 2,65 µmol/L, 2,08 µmol/L, 1,51 µmol/L y 0,757 µmol/L. Pasados los 5 minutos de absorción, se retira la fibra del vial, se extrae el contenido de 30µL y se recoge la disolución en un microtubo para analizar su contenido en amoniaco.

Se trasvasan 20 µL de la disolución recogida a otro Eppendorf al que se le añaden 5 µL de NaOH 1M para contrarrestar el bajo pH de la disolución. Se añaden después 73 µL de H₂O miliQ para diluir y evitar que se forme precipitado. Por último se añaden 2 µL del reactivo de Nessler y se deja reaccionando durante 30 minutos. Al pasar este tiempo se diluye hasta 1 mL y se mide la absorbancia a 425 nm en el espectrofotómetro (DU 730, Beckman coulter, Brea, EE UU). Los blancos se prepararon utilizando agua en vez de los patrones.

Se optimizaron los tiempos de absorción y reacción, así como con diferentes volúmenes de NaOH 1M y de reactivo de Nessler, hasta conseguir las condiciones óptimas que son las que se han explicado previamente.

- Análisis de las muestras:

Las muestras de pescado se prepararon como se ha descrito en la sección 3.1.3.1. En este caso los viales contenían una fibra semipermeable de polipropileno (PP) rellena con 30 µL del tampón KCl/HCl (pH 2) como se ha explicado anteriormente.



Figura 7. Viales de las muestras de merluza preparadas con la fibra del vial para el método de Nessler.

En los días especificados se recuperó la disolución de la fibra del vial y se midió la concentración de NH₃ utilizando el método de Nessler anteriormente descrito.

3.1.3.3 Método del azul de metileno

El objetivo de este método es la determinación la concentración de SH₂ producido por las bacterias que contaminan la merluza. Es un método espectrofotométrico que detecta bajas concentraciones de SH₂. Se utiliza como reactivo una disolución de 0,4 g N,N dimetil-p-fenilensulfato de diamina y 0,6 g cloruro férrico (FeCl₃) diluida en 100 mL de HCl 50%, que detecta concentraciones entre 3-40 µmol/L (0,102 ppm-1,36 ppm). Este reactivo de diamina reacciona con el SH₂ en disolución dando una coloración azulada, azul de metileno, que se puede medir en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 670 nm y así conocer la concentración de SH₂ (Cline, 1969). El agua utilizada en este método es H₂O miliQ sin O₂ disuelto, que se elimina burbujeando con N₂, para no oxidar el SH₂.

Al igual que en el método de Nessler, se realizó una extracción gas-líquido previa utilizando una fibra semipermeable de polipropileno. En este caso se utilizaron fibras semipermeables llenadas con 30 µL de una disolución de fijación de EDTA disódico (2%) y de acetato de zinc (1%) con un pH 12,7.

- Optimización de la recta de calibrado:

Se preparan patrones a partir de sulfuro de sodio (Na₂S) de 16,01 mmol/L, 12,81 mmol/L, 9,61 mmol/L, 7,69 mmol/L, 6,41 mmol/L, 5,13 mmol/L, 3,20 mmol/L, 1,28 mmol/L y 6,41 mmol/L. El Na₂S utilizado está hidratado (Na₂S-7-9 H₂O) por lo que será necesario valorarlo para conocer con exactitud su concentración real y por la inestabilidad de la disolución de SH₂.

Los viales se preparan con las fibras llenadas con 30 µL de la disolución de fijación de SH₂, se sellan los extremos y se pegan con celo al cuello del vial.

Se añadieron 10 µL de los patrones a los viales, y sobre estos se añadieron otros 10 µL de HCl 1M para que el sulfuro se transformara en SH₂ y fuera absorbido por la disolución de fijación. Se cierran los viales rápidamente y se llevan a la estufa a 40°C durante 5 minutos, para conseguir evaporar todo el sulfuro y que pase a SH₂. A continuación se retiró el líquido de la fibra y se recogió en un Eppendorf. Se tomaron 25 µL de la disolución y se diluyó la muestra con 975 µL de H₂O miliQ sin O₂, una vez diluida se añadieron 80 µL del reactivo de diamina, de manera que hay una relación de 250:20 (muestra:diamina) (Cline, 1969). Finalmente se dejó

reaccionar durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 670 nm en el espectrofotómetro. Los blancos se prepararon utilizando agua en vez de los patrones.

Simultáneamente había que valorar uno de los patrones para conocer la concentración exacta de Na_2S que se tiene. La valoración se realizó añadiendo 10 mL de una disolución de yoduro de potasio (KI) 0,12N y 10 mL de yodato de potasio (KIO_3) 0,01N en seis matraces. A continuación se agregó 1 mL de H_2SO_4 a cada matraz y se añadieron 50 mL del patrón a valorar a tres matraces, mientras que a los otros tres 50 mL de H_2O destilada. Se dejó reposar durante 10 minutos y se valoró con tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,01N empleando una disolución de almidón como indicador (Li et Astor, 2013).

En este caso el tiempo de extracción y de reacción así como la proporción muestra-reactivo de diamina también fueron optimizadas.

- Preparación y análisis de las muestras:

Las muestras de pescado se prepararon como se ha descrito en la sección 3.1.3.1. En este caso los viales contenían una fibra rellena con 30 μL de tampón como se ha explicado anteriormente.

En los días especificados se recuperó la disolución de la fibra del vial y se midió la concentración de SH_2 utilizando el método de azul de metileno anteriormente descrito.

3.1.3.4 Medida de pH

Se estudió la evolución del pH durante el almacenamiento de la merluza, ya que éste puede afectar a la liberación de los compuestos volátiles al espacio de cabeza de los viales donde se encontraban las muestras. Con este objetivo, muestras de 6 g de merluza preparadas según se describe en la sección 3.1.3.1 fueron recogidas y diluidas con 6 mL de agua destilada. El pH se midió utilizando un pHmetro Seven Easy (Mettler Toledo, España).

3.1.3.5 Análisis de compuestos volátiles por cromatografía de gases

Se utilizó un método de análisis HS-SPME-GC-MS (Headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometric) para la detección y análisis de los compuestos volátiles producidos por las bacterias contaminantes de la merluza.

La extracción de compuestos volátiles liberados por el pescado al espacio de cabeza del vial fue llevada a cabo en un CombiPal autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Suiza) equipado con una fibra 75 μm CAR-PDMS SPME (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU). Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas HP5973 de la casa Agilent (Barcelona, Spain) y una columna Carbowax pp 20 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) de SGE analytical science (Zulte, Bélgica).

En la Tabla 2 se especifican las condiciones de la extracción, cromatografía y detección de los compuestos volátiles.

Condiciones de la extracción SPME	Tiempo de preincubación (min)	1
	Tiempo extracción (min)	25
	Velocidad de agitación (rpm)	500
	Temperatura de extracción (ºC)	40
	Tiempo de desorción (min)	1
	Temperatura de desorción	250
Condiciones GC	Flujo de Helio (mL/min)	1
	Inyector	250°C Splitless (2min)
	Rampa temperatura del horno	40°C (5min) Hasta alcanzar 220°C 10°C/min 220°C (5min)
Condiciones masas (EI)	Rango de masas (m/z)	50-200
	Temperatura fuente (ºC)	230
	Temperatura cuadrupolo (ºC)	150
	Energía electrones (eV)	70

Tabla 2. Condiciones establecidas para la utilización del HS-SPME-GC/MS

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

3.2.1.1 Análisis microbiológico de las muestras sembradas

Es necesario determinar experimentalmente el día en el que se alcanzan la población de 10^7 CFU/g o 7 log CFU/g, que es el límite de microorganismos establecido, por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF, 2011), para que la merluza ya no sea aceptable para consumo. Cuando alcance esa concentración de microorganismos es cuando el sensor cambiará de color. Para esto se realizaron las siembras en PCA, para obtener el número total de bacterias mesófilas y psicrófilas. El resto de bacterias se sembró para conocer las diferentes poblaciones presentes en la merluza, que nos darán idea del tipo de volátiles que se generan durante el almacenaje del pescado.

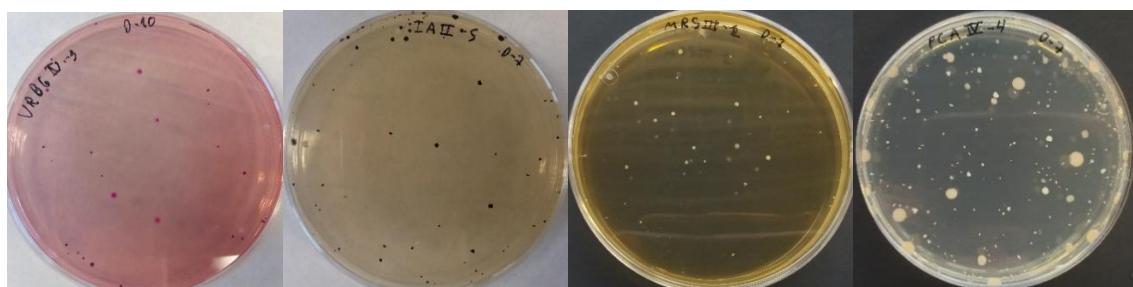


Figura 8. Placas de cultivo. De izquierda a derecha: VRBG agar, Iron Lyngby agar, MRS agar y PCA.

- Bacterias totales mesófilas y psicrófilas:

Se estudió el crecimiento de los microorganismos mesófilos y psicrófilos, a lo largo de diez días, en las muestras de merluza almacenadas en refrigeración a 4°C y con atmósfera protectora (40%CO₂, 30%O₂ y 30%N₂). Los resultados se muestran en la figura 9.

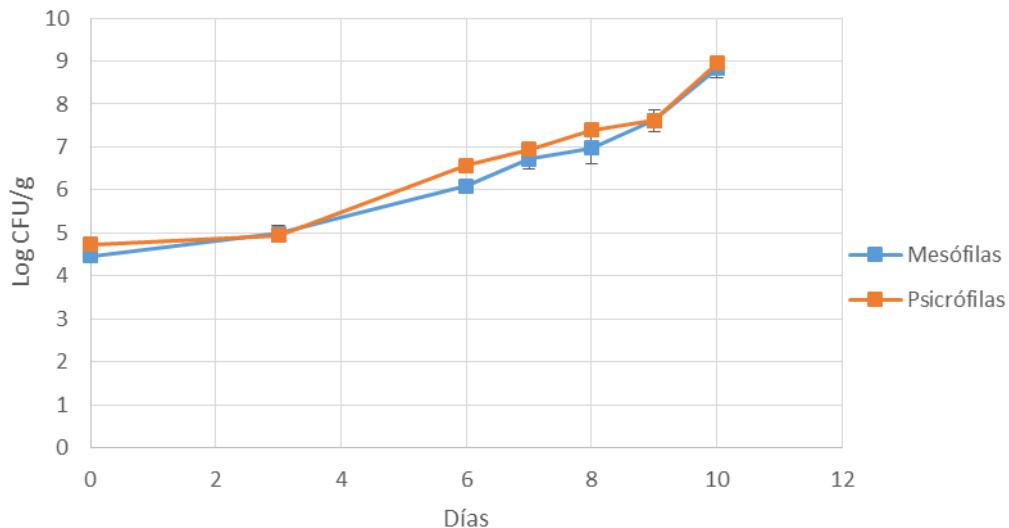


Figura 9. Gráfica de crecimiento de las bacterias totales mesófilas (azul) y psicrófilas (naranja).

Como se observa en la figura 9, el crecimiento de bacterias mesófilas y psicrófilas es muy similar. En ambos casos, se partía, en el día 0, de una población de unos 4,5 log CFU/g, alcanzando el último día de análisis (día 10) los 9 log CFU/g. Tras 8 días, las bacterias mesófilas habían superado el límite establecido para el consumo de 7 log CFU/g según ICMSF, por lo tanto, el sensor que se va a desarrollar debe cambiar de color tras 8 días de almacenamiento del pescado.

Con los resultados obtenidos en el análisis microbiológico, se establecieron los días en los que se realizarían los análisis de detección de los compuestos volátiles por los métodos de Nessler, azul de metileno y la HS-SPME-GC-MS. Se establecieron los días 3, 6, 7 y 8, debido a que el límite de consumo se alcanzaba entre los días 7 y 8, se dejaron los días 3 y 6 para observar la evolución en los días previos. Los días 9 y 10 no era necesario analizarlos, ya que el límite de 7 log CFU/g está ampliamente superado.

- Bacterias productoras de SH₂, *Enterobacteriaceae* y bacterias lácticas:

Se estudió el crecimiento de los microorganismos productores de SH₂, la familia *Enterobacteriaceae* y las bacterias acido lácticas, a lo largo de diez días, en las muestras de merluza almacenadas en refrigeración a 4°C y con atmósfera protectora. Los resultados se muestran en la figura 10.

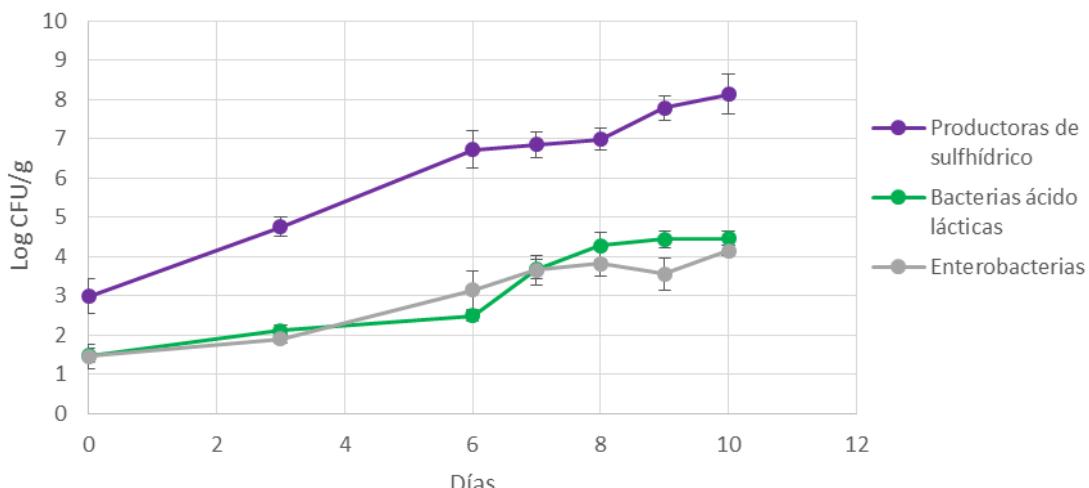


Figura 10. Gráfica de crecimiento de las bacterias productoras de sulfídrico (azul), bacterias ácido lácticas (naranja) y enterobacterias (gris).

Las bacterias productoras de SH_2 destacan sobre las enterobacterias y las bacterias ácido lácticas, por su gran crecimiento en las muestras de merluza. Llegando a alcanzar el día 10, último día analizado, 8,1 log(CFU/g). De acuerdo con la bibliografía, dentro de las bacterias sulfídricas, la especie mayoritaria en pescado refrigerado es *Shewanella putrefaciens* (Baixas-Nogueras et al. 2009). Las bacterias productoras de SH_2 son las bacterias mayoritarias de la merluza, junto con *P. phosphoreum* y las que más influirán en la producción de compuestos volátiles nitrogenados responsables del mal olor como NH_3 , TMA o DMA (Ghaly et al. 2010).

Las poblaciones de *Enterobacteriaceae* y de bacterias ácido lácticas son minoritarias en relación con las productoras de SH_2 , ya que ambas partieron de una concentración de 1,5 log(CFU/g) y no alcanzaban 5 log(CFU/g) el día 10. En las condiciones de almacenaje utilizadas, su importancia en el deterioro del pescado es menor (Ghaly et al. 2010).

3.2.2 CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA: determinación de los volátiles liberados por la merluza a lo largo del tiempo de almacenaje

3.2.2.1 Análisis de la concentración de NH_3 por el método Nessler

Gracias a la utilización de este método se estudió la producción de NH_3 producido por las bacterias contaminantes en las muestras de merluza. El NH_3 es una de los compuestos volátiles nitrogenados que se produce durante el deterioro de la merluza, es importante conocer a qué concentración se encuentra por si interfiere con el indicador de frescura o por si puede ser utilizado como diana.

- Recta de calibrado:

Para el análisis del NH_3 liberado se elaboró una recta de calibrado como se indicó en el apartado 3.1.3.2. La recta de calibrado obtenida se puede observar en la figura 11.

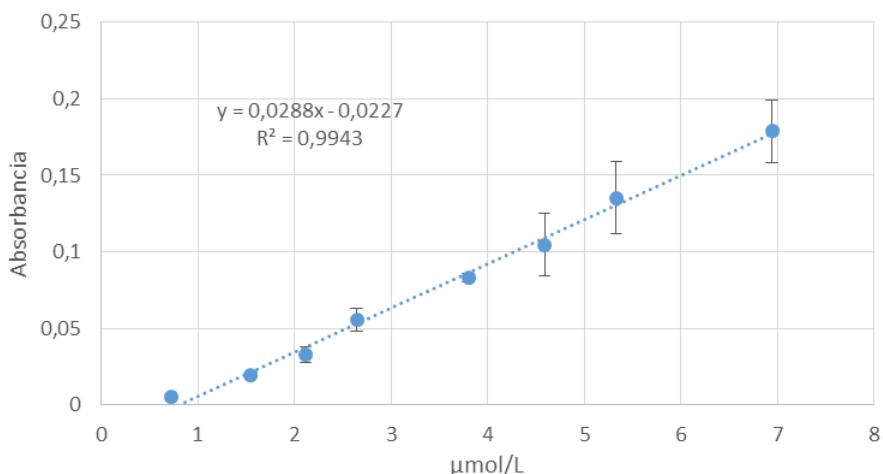


Figura 11. Recta de calibrado del método de Nessler en $\mu\text{mol/L}$.

Se obtuvo una recta de calibrado (figura 11) capaz de detectar concentraciones de hasta 0,72 $\mu\text{mol/L}$ (0,012 ppm) de NH_3 , lo que indica que el método es bastante sensible.

- Análisis de las muestras de merluza:

El NH_3 liberado al espacio de cabeza por las muestras de merluza fue medido a lo largo del tiempo. Para ello, como se explica en el apartado 3.1.3.2, se absorbe en la disolución fijadora de NH_3 y se mide con la metodología de Nessler. En la figura 12 se observan los resultados calculados a partir de la absorbancia de las muestras en los días analizados.

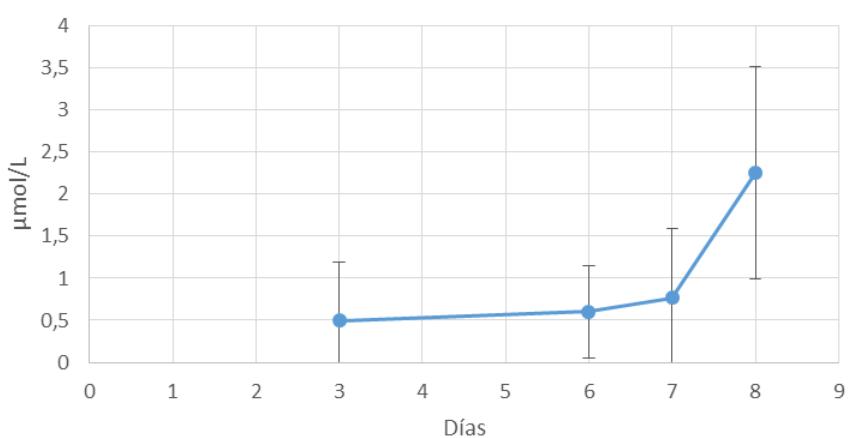


Figura 12. Evolución de la concentración de amoníaco, en $\mu\text{mol/L}$, en el espacio de cabeza de las muestras de merluza a lo largo del tiempo de almacenaje.

Los resultados obtenidos tienen una alta desviación estándar, probablemente debido a la propia variabilidad de las muestras de pescado analizadas. A pesar de ello, se observa una clara tendencia ascendente según pasan los días, en refrigeración y con la atmósfera protectora, habiendo un gran aumento de la concentración de NH_3 entre los días 7 y 8. La alta concentración en ppm del día 8 concuerda con los resultados obtenidos en la caracterización microbiológica, donde el día 8 se alcanzaba el límite de 7 log CFU/g para consumo humano. Esto indica que el NH_3 podría ser una posible diana para el indicador de frescura.

3.2.2.2 Análisis del SH₂ producido por el método de Azul de metileno

Este método se utilizó para medir la producción de SH₂ producido, por las bacterias contaminantes en las muestras de merluza, y liberado al espacio de cabeza del vial en que se encontraban las muestras de merluza refrigeradas y con atmósfera protectora. Este compuesto podría ser utilizado como diana en el indicador de frescura si se libera en la concentración suficiente o interferir con el sensor, por ello es necesario su análisis.

No se obtuvo en ninguno de los cuatro días analizados (días 3, 6, 7 y 8) ninguna muestra que diera absorbancia a 670 nm por este método, indicando que o no se producía SH₂ o no se liberaba al espacio de cabeza. Los resultados del apartado 3.2.1.1 demostraron la producción de SH₂ en el pescado debido a la presencia de gran cantidad de bacterias contaminantes productoras, por lo que podría no haberse liberado el SH₂ al espacio de cabeza del vial desde la merluza. Esto podría deberse al pH de la muestra. El pK₁ del H₂S es de 6,98 en agua destilada, de 6,72 en agua con 0,7 M de NaCl y de 6,60 en agua del mar según Morse et al. (1987).

Se midió el pH de las muestras de merluza entre los días 0 y 8 de los análisis, como se ve en la figura 13, y variaba entre 6,85 y 6,67 ascendiendo en el último día. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ruiz-Capillas et al. (2001), donde tras una leve disminución del pH los primeros días, empezaba a ascender hasta valores básicos. Probablemente al encontrarse el pH de la merluza por debajo del pK₁ el equilibrio entre SH₂ y SH⁻ al pH al de la merluza esté desplazado hacia SH⁻, habiendo muy poca concentración de SH₂ que se pueda volatilizar al espacio de cabeza del vial, por lo que no fue detectado por el método de azul de metileno. Por parte del método no hubo ningún problema de sensibilidad, ya que se llegó a detectar al menos una concentración de 0,384 µmol/L (0,013 ppm) de H₂S con los patrones de Na₂S.

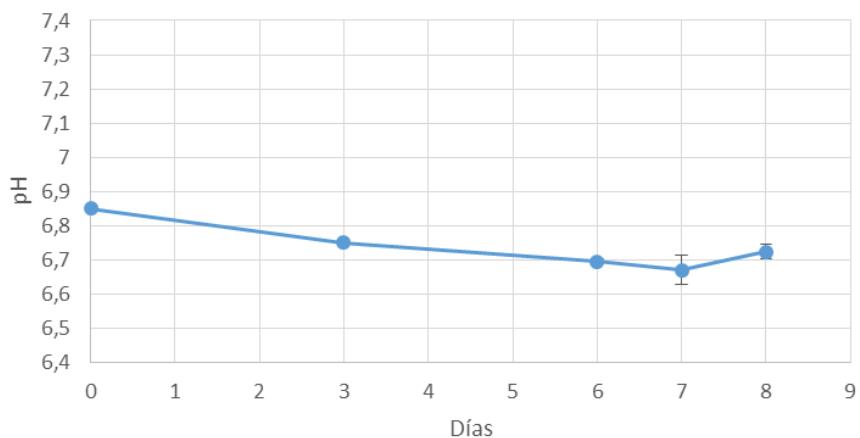


Figura 13. Grafica del pH de las muestras de merluza con el paso del tiempo.

Los resultados obtenidos indican que el ácido sulfídrico no podría ser utilizado como diana, ya que no se detectó SH₂ en ninguno de los días. Al no detectarse ninguna concentración de SH₂ no se llevó a cabo la recta de calibrado ni la valoración de los patrones, ya que no era necesario.

3.2.2.3 Cromatografía de gases

- Análisis de las muestras por HS-SPME-GC-MS:

Las muestras de merluza fueron analizadas por HS-SPME-GC-MS para detectar los volátiles producidos en el deterioro de la merluza con atmósfera protectora. En la figura 14 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos.

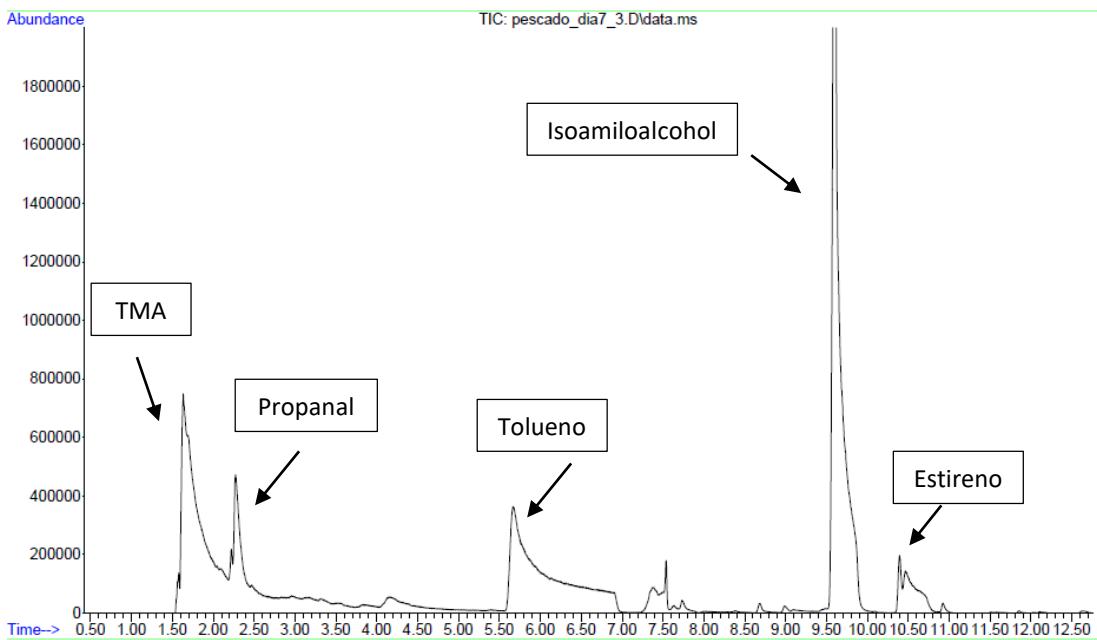


Figura 14. Cromatograma obtenido de una muestra de merluza del día 7.

De los picos detectados sólo en tres de ellos se observó un aumento a lo largo del tiempo de almacenaje de la merluza: trimetilamina (TMA) con un tiempo de retención de 1,62 min, propanal con un tiempo de retención de 2,27 min e isoamiloalcohol con un tiempo de retención de 9,56 min. Como se puede ver en las figura 15 y 16, hay un gran incremento de la señal entre el día 3 y el día 8 de almacenaje, día señalado como límite de aceptabilidad. También hay un incremento de la señal entre los días 6 y 8 (anexo, figura 20) lo que indicaría que estos compuestos podrían ser utilizados en el desarrollo del indicador. Aunque hay que señalar que existe cierta variabilidad en los resultados, debido probablemente a la variabilidad de las muestras que debería tenerse en cuenta a la hora de diseñar el indicador.

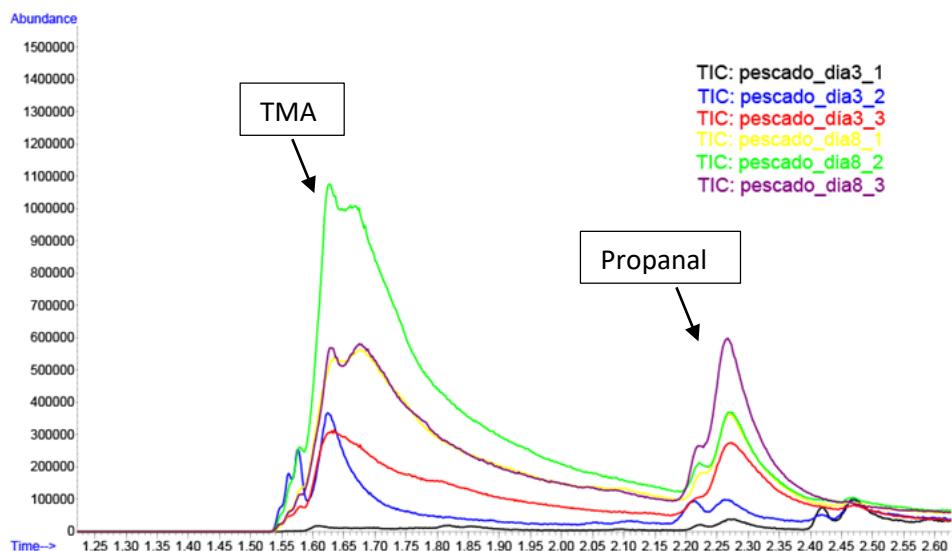


Figura 15. Comparativa de TMA y propanal producidos en las muestras de los días 3 y 8.

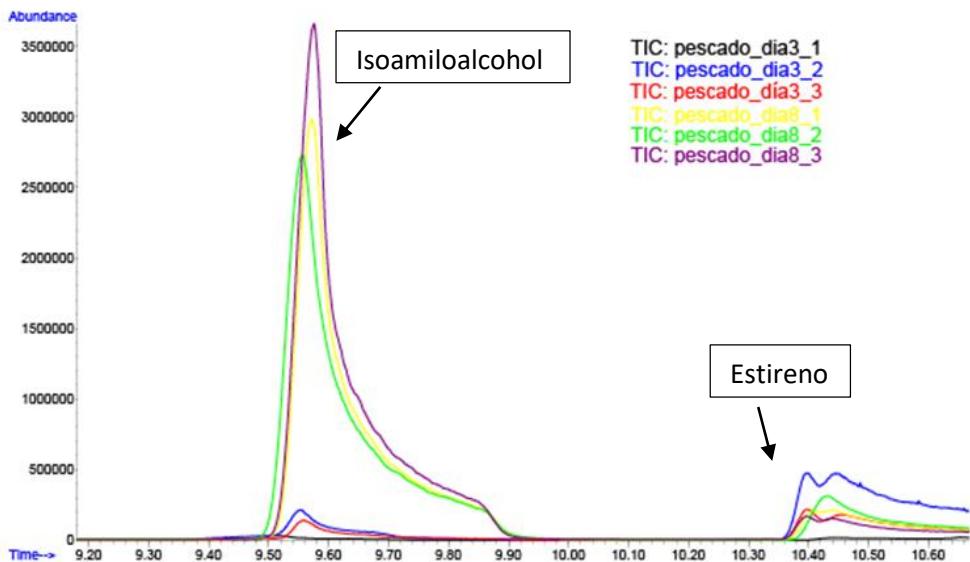


Figura 16. Comparativa de isoamiloalcohol producido en los días 3 y 8 y del estireno.

El TMA era el volátil esperado en la oxidación del músculo de la merluza y el pescado en general, principal causante del mal olor del pescado en mal estado. El pentanal y el isoamiloalcohol (Iglesias et Medina, 2008) se obtuvieron en una gran concentración, especialmente el isoamiloacohol que aumentaba mucho entre los días 3 y 8 del análisis, por lo que podría ser una buena diana para el indicador de frescura. El tolueno obtenido, con un tiempo de retención de 5,7 min, se mantiene constante durante todos los días y proviene de la degradación de azúcares o aminoácidos según Grigorakis et al. (2003).

Un pico que es interesante señalar es el estireno con un tiempo de retención de 10,39 min, los picos son similares y no aumentan con el paso del tiempo, por lo que es muy probable que provenga del envase alimentario donde se encuentra en forma de poliestireno (Marsh et Bugusu, 2007).

4. Sensor de caducidad

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Preparación de los sensores/indicadores de frescura

El desarrollo de las formulaciones y la fabricación de las etiquetas se llevaron a cabo a partir de los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico y de la experiencia del grupo GUIA.

En concreto se desarrollaron tres formulaciones diferentes con las que se prepararon seis etiquetas autoadhesivas denominadas S2, AB, SP, S1C+CA, S1C+S2 y S1A+S2. Tanto las formulaciones como el proceso de fabricación de las etiquetas están protegidas por la patente (ESA200930141) y bajo acuerdo de confidencialidad. Dicha patente fue solicitada por la Universidad de Zaragoza; siendo extendida a 69 países como Smart Packaging for detecting microorganisms.

4.1.2 Preparación de las muestras de merluza con los indicadores

La preparación de las muestras se llevó a cabo colocando cinco muestras de 4 gramos por cada sensor, más un blanco con 5 mL de H₂O destilada para cada uno de los seis sensores.

Para cada muestra se pusieron los 4 gramos de merluza en una placa de Petri y se pegó la etiqueta con el indicador en la placa, sobre la muestra. Las placas se metieron en bolsas de vacío y se intercambió la atmósfera estándar por la atmósfera protectora, en la máquina de vacío. Se guardaron en refrigeración a 4°C.



Figura 17. Muestras con el indicador envasadas en atmósfera protectora.

Simultáneamente se prepararon cinco muestras de 4 gramos para cada día que se medía el sensor y así poder conocer la población total de bacterias en la merluza. Se colocaron en cada placa de Petri las cinco muestras de cada día, y al igual que con las del indicador se pusieron en bolsas de vacío con atmósfera protectora. Se guardaron en refrigeración a 4°C.

Las siembras se realizaron únicamente en medio PCA, ya sólo interesaba conocer el recuento total de bacterias. A partir de los resultados obtenidos de las siembras de PCA para análisis microbiológico (apartado 3.2.1.1), se hicieron las diluciones para estas siembras.

El procedimiento de siembra fue idéntico al realizado durante la caracterización microbiológica, apartado 3.1.2.2.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Resultados de los sensores/indicadores de frescura

Las seis fórmulas preparadas fueron evaluadas con las muestras de 4g de merluza para observar si se producía el cambio de color que indicase que se había alcanzado el límite microbiológico de 7 log CFU/g. En las figuras 18 y 19 (sensores) se pueden ver los indicadores comparados con su control en cada día del seguimiento, del día 0 al 8. Se añadió el día 11 para ver si los indicadores que no cambiaban de color lo hacían a una alta concentración de microorganismos, ya que por los resultados obtenidos en la caracterización microbiológica (Figura 9), la concentración de bacterias totales sería superior a 9 log CFU/g.

Los sensores que contenían las fórmulas S2, AB, SP y S1C+CA no cambiaron de color en ninguno de los 11 días evaluados. Sólo se observaron cambios de color en los indicadores de frescura que contenían las fórmulas S1C+S2 y S1A+S2.

El indicador con la fórmula S1C+S2 empezó a cambiar de color el día 0 tras preparar la muestra y envasarla con la atmósfera protectora. El día 1 ya había cambiado de color completamente, habiendo pasado de color verde a negro, por lo que no puede utilizarse como fórmula indicadora para el sensor.

Respecto al indicador con la fórmula S1A+S2 se apreció un cierto cambio de color entre los días 5 y 7, pasando de un color “blanco roto” (día 5) a un color más amarillento (día 7). El cambio de color se empieza a observar el día 6, cuando la concentración de bacterias mesófilas totales es de 5,5 log CFU/g (ver Figura 9) y el día 7 ya es un cambio claro, cuando la concentración de bacterias es de 6,2 log CFU/g.

Con los resultados obtenidos se pueden descartar todas las fórmulas como indicadores de frescura para merluza, excepto el sensor con la fórmula S1A+S2 que a pesar de no haber cambiado de color a la concentración de bacterias totales esperadas, si lo hace muy cerca de la concentración microbiológica deseada de 7 log(CFU/g). Sin embargo, habría que mejorar el cambio de color para que fuese más perceptible por el consumidor.

Hay que señalar que el crecimiento de las bacterias totales mesófilas (Tabla 3) fue menor al obtenido en la caracterización microbiológica. Se esperaba alcanzar el límite de 7 log CFU/g en el día 8, pero en este caso la concentración obtenida fue de 6,4 log CFU/g, es decir, más de medio orden de magnitud menos de lo esperado.

Días	2	3	4	5	6	7	8
Log CFU /g	4,20	4,54	4,41	4,34	5,45	6,23	6,39

Tabla 3. Evolución del crecimiento de las bacterias mesófilas totales.

El procedimiento de siembra y la manipulación fueron idénticos a los realizados en la caracterización microbiológica, la única diferencia fue que la merluza estuvo congelada durante tres meses y una semana, habiendo podido afectar a la viabilidad de las bacterias contaminantes y causando un menor crecimiento bacteriano respecto a la caracterización microbiológica, ya que entre la compra y la preparación de las muestras, la merluza sólo estuvo un día congelada. Lo óptimo habría sido haber podido realizar los experimentos con la menor diferencia de tiempo entre ellos, pero por disponibilidad de tiempo fue imposible.

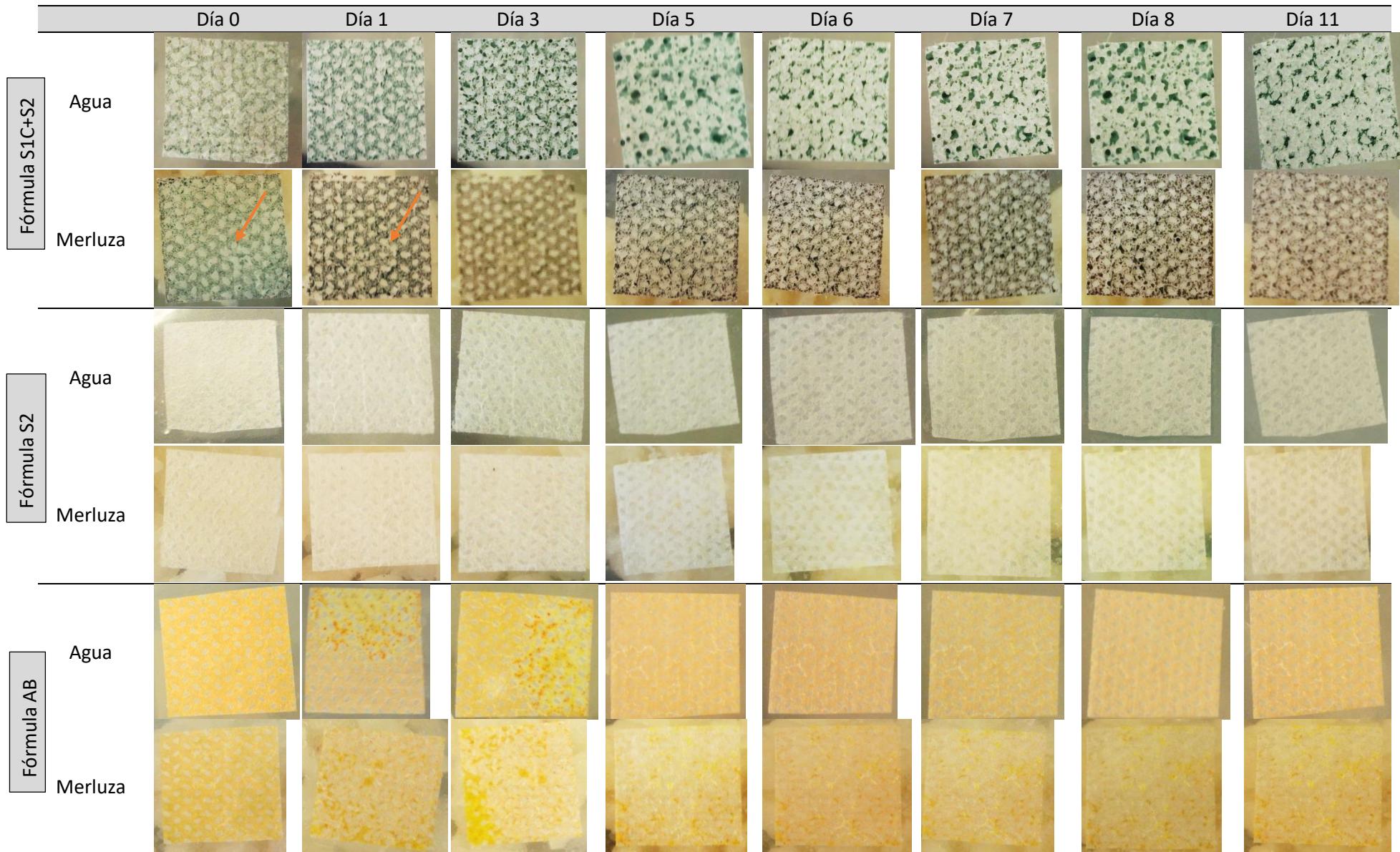


Figura 18. Indicadores de frescura S1C+S2, S2 y AB utilizados en el seguimiento microbiológico de las muestras.

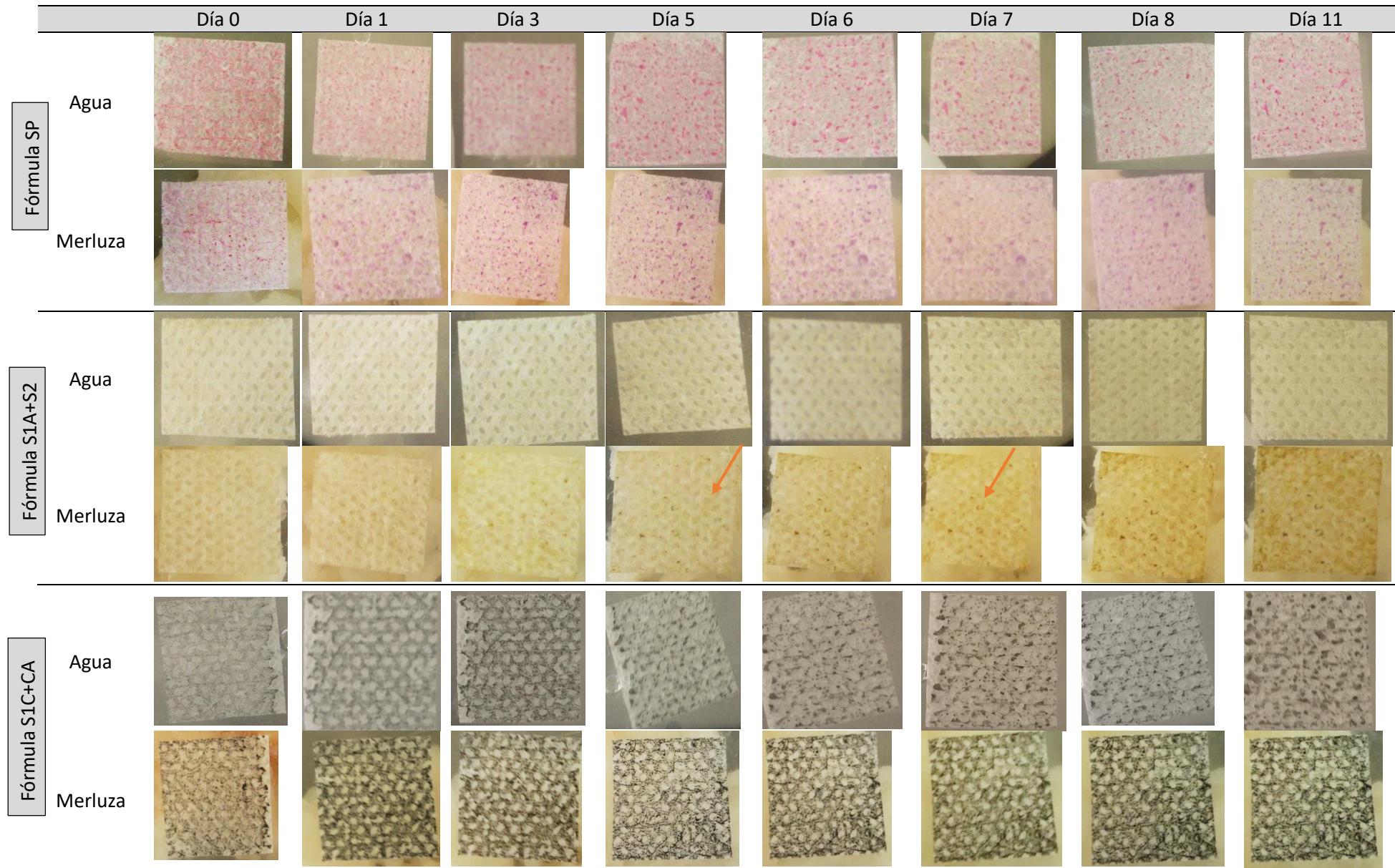


Figura 19. Indicadores de frescura SP, S1A+S2 y S1C+CA utilizados en el seguimiento microbiológico de las muestras

5. Conclusiones

- El límite microbiológico para consumo humano en la merluza analizada se alcanza entre el séptimo y octavo día de envasado en la atmósfera protectora (40% CO₂, 30% N₂ y 30% O₂) recomendada por la FAO.
- Las bacterias productoras de sulfídrico son las bacterias mayoritarias durante el deterioro de la merluza, mientras que las bacterias ácido lácticas y las enterobacterias tienen poca importancia.
- Los métodos de azul de metileno y de Nessler se han desarrollado y optimizado satisfactoriamente, demostrando tener una gran sensibilidad a la hora de detectar bajas concentraciones de ácido sulfídrico y amoniaco, respectivamente.
- La utilización de la HS-SPME-GC-MS permite la detección e identificación de los principales compuestos volátiles producidos durante el deterioro de la merluza, con lo que se pueden identificar dianas para el indicador.
- La fórmula S1A+S2 ha sido la única de las seis utilizadas que podría ser utilizada como un indicador de frescura en merluza, aunque el cambio de color no es lo suficientemente claro y se produce antes de tiempo, por lo que para su comercialización de cara al consumidor tendría que ser mejorada. El resto de fórmulas que se han utilizado para los indicadores cambiaron de color demasiado pronto o no lo hicieron.

Conclusions

- The microbiological limit for human consumption, in the analysed hake, was reached between the seventh and eighth day of storage under modified atmosphere (40% CO₂, 30% N₂ y 30% O₂) by the FAO.
- Hydrogen sulfide producing bacteria are the major bacteria during hake spoilage, while acid lactic bacteria and enterobacteria are of little importance.
- Methylene blue and Nessler methods were developed and optimized successfully, proving to have great sensibility to detect low concentrations of hydrogen sulfide and ammoniac, respectively.
- The use of HS-SPME-GC-MS allows the detection and identification of the main volatiles produced during hake spoilage, whereby new targets for the indicator can be identified.
- S1A+S2 formula was the only one of the six used that might be use as a freshness indicator in hake. However, the color change was not clear enough and sooner than expected so, this formula should be improved to be used as freshness indicator. The other formulas used changed the color too early or did not change at all.

6. Bibliografía

1. Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente (MAGRAMA) (2015). El mercado de la merluza española.
2. Cann D. C. (2001). Packing Fish in a Modified Atmosphere. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
3. Ordóñez, J. A.; López-Gálvez, D. E.; Fernández, M.; Hierro, E.; Hoz, L. (2000). Microbial and physicochemical modifications of hake (*Merluccius merluccius*) steaks stored under carbon dioxide enriched atmospheres. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, p. 1831-1840.
4. Baixas-Nogueras, S.; Bover-Cid, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Vidal-Carou, M. C. (2009). Effect of gutting on microbial loads, sensory properties, and volatile and biogenic amine contents of european hake (*Merluccius merluccius* var. *mediterraneus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*, Vol. 72, No. 8, 2009, p. 1671-1676.
5. Delgaard, P.; Mejlholm, O.; Christiansen, T. J.; Huss, H. H. (1996). Importance of *Photobacterium phosphoreum* in relation to spoilage of modified atmosphere-packed fish products. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 24, p. 373-378.
6. López-Caballero, M. E.; Álvarez, M. D.; Sánchez-Fernández, J. A.; Moral, A. (2002). *Photobacterium phosphoreum* isolated as a luminescent colony from spoiled fish, cultured in model system under controlled atmospheres. *European Food Research and Technology*, vol. 215, p. 390-395.
7. Baixas-Nogueras, S.; Bover-Cid, S.; Veciana-Nogués, M. T.; Vidal-Carou, M. C. (2003). Suitability of volatile amines as freshness indexes for iced mediterranean hake. *Journal of Food Science*, Vol. 68, Nr. 5, p. 1607-1610.
8. Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. (1991). Chemical sensors definitions and classification. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Pure & Applied Chemistry*, Vol. 63, No. 9, p. 1247-1250.
9. Vanderroost, M.; Ragaert, P.; Devlieghere, F.; De Meulenaer, B. (2014). Intellegent food packaging: the next generation. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 39, p. 47-62.
10. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (2011). Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities.
11. Chan, S. T.; Yao, M. W. Y.; Wong, Y. C.; Wong, T.; Mok, C. S.; Sin, D. W. M. (2006). Evaluation of chemical indicators for monitoring freshness of food and determination of volatile amines in fish by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, vol. 224, p. 67-74.
12. Pastoriza, L.; Sampedro, G.; Herrera, J. J.; Cabo, M. L. (1996). Effect of modified atmosphere packaging on shelf-life of iced fresh hake slices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 71, p. 541-547.

13. Krug, F. J.; Ruzicka, J.; Hansen, E. H. (1979). Determination of ammonia in low concentrations with Nessler's reagent by flow injection analysis. *Analyst*, Vol.104, p. 47-54.
14. American Society for Testing and Materials International (ASTM International). Standard test methods for ammonia nitrogen in water. D1426 – 08. 2008.
15. Cline, J. D. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography*, vol. 14, p. 454-458.
16. Li, X.; Astor, Y. M. (2013). Determination of hydrogen sulfide. *Handbook of Methods for the Analysis of Oceanographic Parameters at the CARIACO Time-series Station*, p. 107-113.
17. Morse, J. W.; Millero, F. J.; Cornwell, J. C.; Rickard, D. (1987). The chemistry of the hydrogen sulfide and iron sulfide systems in Natural Waters. *Earth-Science Reviews*, vol. 24, p. 1-42.
18. Ruiz-Capillas, C.; Moral, A. (2001). Residual effect of CO₂ on hake (*Merluccius merluccius* L.) stored in modified and controlled atmospheres. *European Food Research and Technology*, vol. 212, p. 413–420.
19. International Organization for Standardization (ISO). Norma ISO 4833-1-2013. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique.
20. International Organization for Standardization (ISO). Norma ISO 15214-1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30°C.
21. International Organization for Standardization (ISO). Norma ISO 11133-2014. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
22. Marsh, K.; Bugusu, B. Food packaging: roles, materials, and environmental issues. *Journal of Food Sciences*, vol. 72, n. 3, p. 39-55. (2007).
23. Ghaly, A. E.; Dave, D.; Budge, S.; Brooks M. S. (2010). Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: review. *American Journal of Applied Sciences*, vol. 7, p. 859-877.
24. Grigorakis, K.; Taylor, K. D. A.; Alexis, M. N. (2003). Organoleptic and volatile aroma compounds comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): sensory differences and possible chemical basis. *Aquaculture*, vol. 225, p. 109-119.
25. Iglesias, J.; Medina, I. (2008). Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *Journal of chromatography A*, 1192, p. 9-16.

7. Anexos

Resultados del HS-SPME-GC-MS:

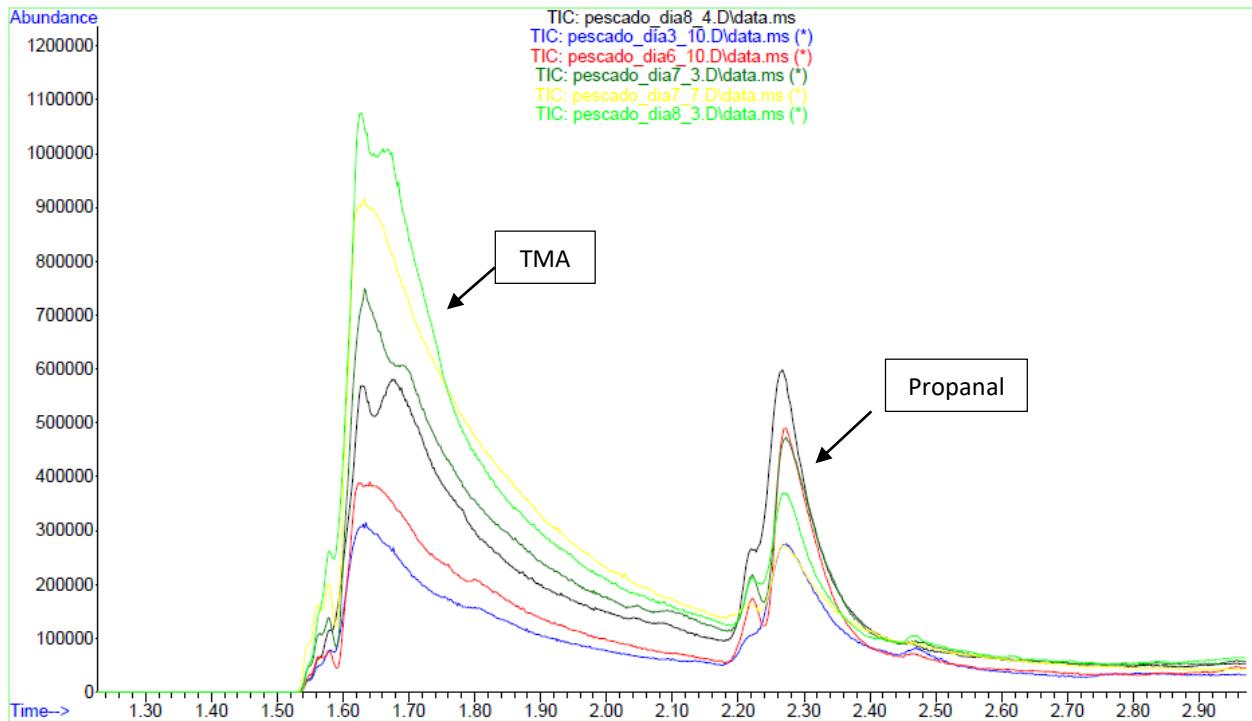


Figura 20. Evolución de TMA y propanal producidos durante el seguimiento de las muestras.

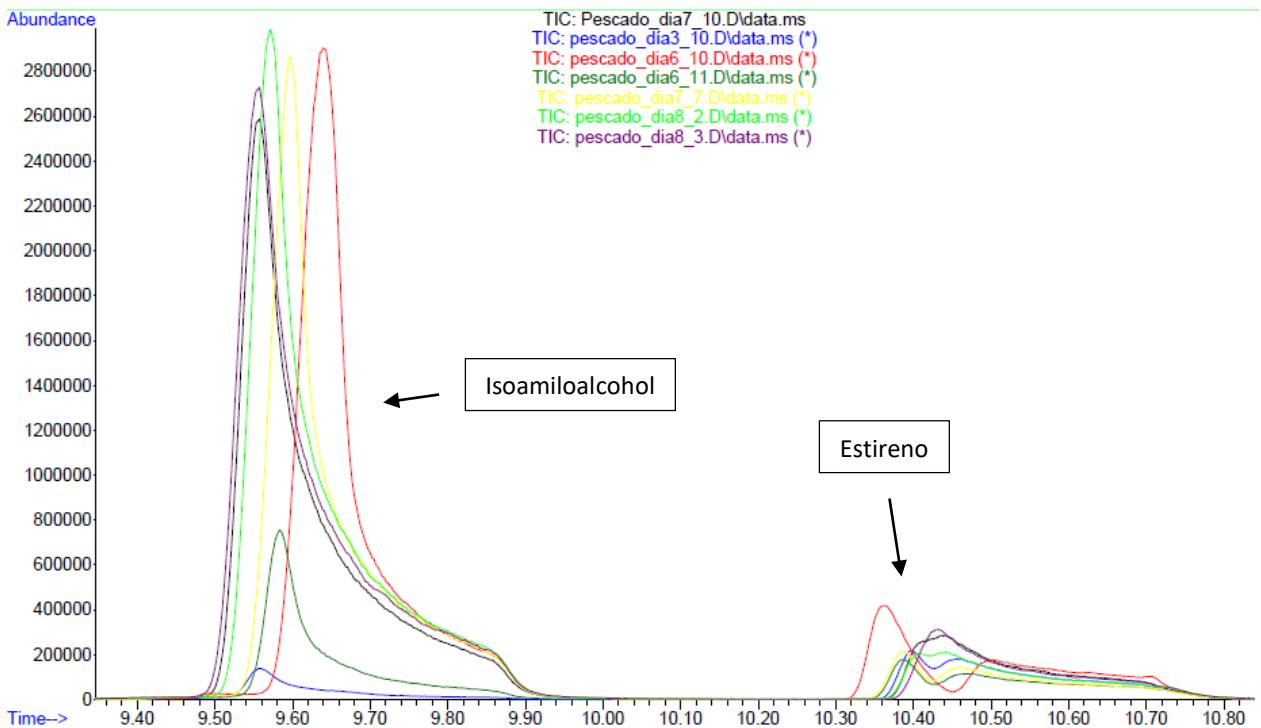


Figura 21. Evolución del isoamiloalcohol durante el seguimiento de las muestras.

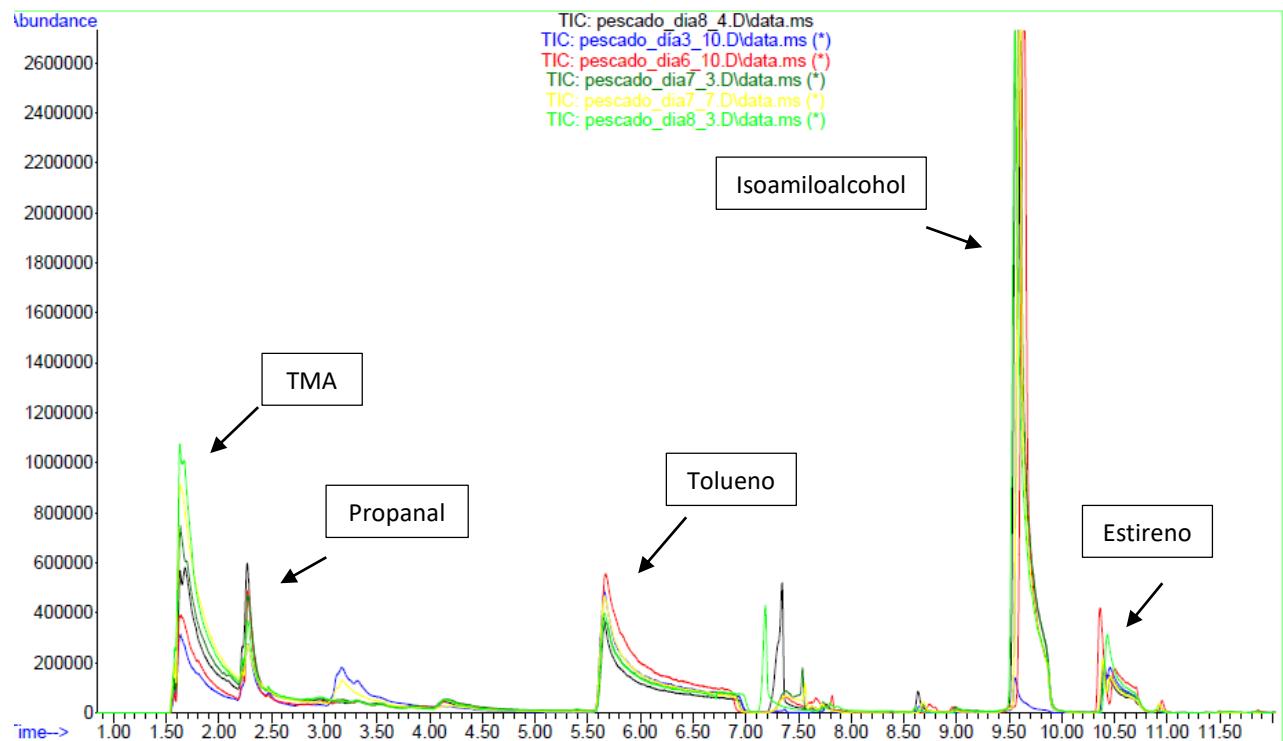


Figura 22. Cromatograma que muestra la evolución de todos los volátiles liberados.