

II MÁSTER OFICIAL DE CULTIVOS MARINOS

Las Palmas de Gran Canaria, España 2012

Efecto del aturdimiento y desangrado sobre el bienestar y la calidad
en lubina (*Dicentrarchus labrax*).

Alberto González de la Fe

Trabajo realizado en el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), España, bajo la dirección de Rafael Ginés Ruíz.

Y presentado como requisito parcial para la obtención del Título de Máster Universitario Internacional en Acuicultura, otorgado por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) y el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos de Zaragoza (CIHEAM).

Director Autor

Director Autor

Autor

Fdo.:

Fdo.:.....

Fdo.:

Rafael Ginés

Pedro Castro

Alberto González

Las Palmas de Gran Canaria, a ____ de _____ de 2012

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer primeramente a mi pareja y mi familia por todo el apoyo y paciencia que me han dado a lo largo de estos dos años de Máster.

Seguidamente, mi más sincero y gran agradecimiento a mi director de tesis, el Dr Rafael Ginés Ruiz, por toda la ayuda que me dio durante todo mi segundo año de Máster, así como el apoyo y la experiencia que recibí de él. Gracias por enseñarme tanto.

Así mismo, agradezco a todo el personal del Instituto Canario de Ciencias Marinas y del IUSA la ayuda prestada en el transcurso de mi formación, tanto teórica como práctica, resaltando especialmente la colaboración de Ada, Pedro, Carmen, Yurena, Silvia y Lorena por dedicar un rato de su tiempo para ayudarme y enseñarme algunos trucos y técnicas, así como el manejo de algunos instrumentos.

También agradezco a todos los compañeros y amigos del Máster los buenos momentos vividos durante el último año y medio.

Finalmente, quiero recalcar la labor realizada por todas las personas, organismos e instituciones que ha hecho posible el II Máster Oficial de Cultivos Marinos.

ÍNDICE

<u>Lista de tablas</u>	X
<u>Lista de figuras</u>	XII
<u>Resumen</u>	XIV
<u>Introducción</u>	1
1. Bienestar animal y su legislación	1
2. Lubina	7
2.1. Distribución geográfica y biología	8
2.2. Taxonomía y morfología	9
2.3. Cultivo y mercado	11
3. Sacrificio y aturdimiento	13
3.1. Tipos de sacrificio y aturdimiento	14
3.1.1. Sacrificio por asfixia	14
3.1.2. Sacrificio con agua más hielo o shock térmico	15
3.1.3. Narcosis y aturdimiento con CO ₂	16
3.1.4. Sacrificio por evisceración	18
3.1.5. Sacrificio por “baño de sal”	18
3.1.6. Sacrificio por percusión	19

3.1.7. Sacrificio y aturdimiento por electrocución	20
3.1.8. Sacrificio por desangrado	23
3.1.9. Sacrificio y aturdimiento por anestesia	23
3.1.10. Combinación de narcosis con CO ₂ con bajas temperaturas como método de aturdimiento	24
3.2. Métodos para evaluar la eficacia del sacrificio sobre el bienestar animal	26
4. Desangrado	30
4.1. Incidencia y efecto en la acuicultura	30
4.2. Características de las manchas de sangre residual	31
4.3. Hemopigmentos	37
4.3.1. Hemoglobina	37
4.3.2. Mioglobina	39
4.3.3. Color en filetes	40
4.4. Métodos de cuantificación de la sangre residual	40
4.4.1. Métodos visuales	41
4.4.2. Medición de la Hemoglobina	44
5. La calidad del producto	44
5.1. Deterioro de la calidad del producto	45

5.2. Cambios sensoriales	45
5.3. Cambios autolíticos	47
5.4. Efecto en la actividad muscular	47
5.5. Cambios bacteriológicos	49
5.6. Oxidación de los lípidos	51
5.7. Herramientas para la determinación de la calidad del filete	53
5.7.1. Métodos sensoriales	53
5.7.1.1. Método QIM (Quality Index Method)	54
5.7.2. Métodos físicos	54
5.7.2.1. TPA (Texture Profile Analysis)	55
5.7.2.2. pH	56
5.7.3. Métodos químicos	57
5.7.3.1. TBARs	57
5.7.3.2. Métodos microbiológicos	58
6. Objetivos	60
<u>Material y métodos</u>	
1. Experimento nº1: Aturdimiento con combinación de CO ₂ y frío	61
1.1. VERs	62

1.2. Frecuencia opercular (FO)	62
1.3. Equilibrio y manipulación	63
1.4. Verticalidad	63
1.5. Agresividad	64
2. Experimento n° 2: Método de sangre residual	64
2.1. Observación visual	65
2.2. Medición de hemoglobina	68
2.3. Medición del color	68
3. Experimento n°3: Comparación de la calidad entre individuos desangrados y aturcidos, no desangrados y aturcidos, y no desangrados y no aturcidos	70
3.1. QIM (Quality Index Method)	70
3.2. pH	72
3.3. TPA (Texture Profile Analysis)	72
3.4. TBARs	73
3.5. Determinación de la bacteria S. Putrefaciens	74

Resultados

1. Experimento n°1: Aturdimiento con combinación de CO2 y frío	76
1.1. Aturdimiento con 4°C de temperatura	76

1.2. Aturdimiento con 7°C de temperatura	77
1.3. Aturdimiento con 11°C de temperatura	78
2. Experimento n° 2: Método de sangre residual	81
2.1. Observación visual	81
2.2. Medición de hemoglobina	82
2.3. Medición del color	86
3. Experimento n°3: Comparación de la calidad entre individuos desangrados y aturcidos, no desangrados y aturcidos, y no desangrados y no aturcidos	87
3.1. QIM (Quality Index Method)	87
3.2. pH	88
3.3. TPA (Texture Profile Analysis)	89
3.4. TBARs	93
3.5. Determinación de la bacteria S. Putrefaciens	94

Discusión

1. Experimento n°1: Aturdimiento con combinación de CO ₂ y frío	95
2. Experimento n° 2: Método de sangre residual	97
2.1. Observación visual	97
2.2. Medición de hemoglobina	98

2.3. Medición del color	100
3. Experimento nº3: Comparación de la calidad entre individuos desangrados y aturcidos, no desangrados y aturcidos, y no desangrados y no aturcidos	101
3.1. QIM (Quality Index Method)	101
3.2. pH	102
3.3. TPA (Texture Profile Analysis)	103
3.4. TBARs	105
3.5. Determinación de la bacteria S. Putrefaciens	106
<u>Conclusión</u>	108
<u>Referencias</u>	110

LISTA DE TABLAS

Tabla I: Diferentes tiempos de pérdida del VERs y comportamiento en función al método de aturdimiento en salmón atlántico	29
Tabla II. Tiempos de respuesta de los peces (mínimo y máximo para cada valor de pH, O ₂ y CO ₂) a la temperatura de 4 °C	77
Tabla III. Tiempos de respuesta de los peces (mínimo y máximo para cada valor de pH, O ₂ y CO ₂) a la temperatura de 7 °C	78
Tabla IV. Tiempos de respuesta de los peces (mínimo y máximo para cada valor de pH, O ₂ y CO ₂) a la temperatura de 11 °C	79
Tabla V. Valores de color de los tres grupos en la zona de opérculo, vientre y lomo, así como la diferencia significativa ($P < 0,05$) de los factores día, grupo y día*grupo	84
Tabla VI. Valores de color de los tres grupos en la zona anterior y posterior del filete, así como la diferencia significativa ($P < 0,05$) de los factores día (D), grupo (G) y día*grupo (D*G)	86
Tabla VII. Evolución de los parámetros del TPA del pescado entero, así como la diferencia significativa ($P < 0,05$) de los factores día (D), grupo (G) y día*grupo (D*G)	91

Tabla VIII. Evolución de los parámetros del TPA del filete, así como la diferencia significativa ($P < 0,05$) de los factores día (D), grupo (G) y día*grupo (D*G)

93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribución geográfica de la lubina	8
Figura 2: Principales países productores de lubina	10
Figura 3: Producción global en toneladas de lubina	10
Figura 4: Morfología de la lubina	11
Figura 5: Distribución porcentual de producciones de lubina por CC.AA. en 2010	12
Figura 6: Manchas de sangre residual de tipo1 en la línea media del filete de salmón	32
Figura 7: Manchas de sangre residual de tipo2 en filete de salmón	32
Figura 8: Manchas de sangre residual de tipo3 en filete de salmón	33
Figura 9: Estructura de la hemoglobina	38
Figura 10: Filete desangrado	42
Figura 11: Ejemplo de pérdida de equilibrio	63
Figura 12: Ejemplo de inmovilización previa a la manipulación	64
Figura 13: Comparación del color del pescado entero del día 0 de los tres grupos	66
Figura 14: Escala en función al color; muy rojizos y oscuros, ligeramente oscuros y blanquecinos	67

Figura 15; Realización del método QIM por parte de algunos miembros del panel de jurados	71
Figura 16: Ficha de puntuación de calidad para un QIM	71
Figura 17: Texturómetro Stable Micro Systems TA.XT2	73
Figura 18: Colonias de <i>Shewanella putrefaciens</i>	75
Figura 19: Resultados de las VERs por pez con 25 mg CO ₂ /L a 4°C, 7°C y 11°C	80
Figura 20: Resultados de las VERs por pez con 47 mg CO ₂ /L a 4°C, 7°C y 11°C	80
Figura 21: Resultados de las VERs por pez con 70 mg CO ₂ /L a 4°C, 7°C y 11°C	81
Figura 22: Concentración de mg Hemoglobina/g de músculo por pescado de los tres grupos al día 0	87
Figura 23: Evolución de los puntos de demérito de los tres grupos a lo largo de los 11 días de conservación en hielo	88
Figura 24: Evolución del pH de los tres grupos durante los días 0, 4 y 11	89
Figura 25: Desarrollo de los TBARs de los tres grupos durante los días 0, 4 y 11, donde a es (P<0,05) con respecto al grupo	94

Resumen

El estudio presente se dividió en tres experiencias; la primera fue la búsqueda de la combinación de concentración de CO₂ y temperatura óptima para el aturdimiento de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) sin afectar al bienestar de esta. La segunda se basó en establecer la observación visual y la medición de la hemoglobina residual en el músculo como métodos para valorar el desangrado eficaz en la lubina. En la tercera experiencia se comparó la calidad del producto de individuos sin desangrar con desangrados, así como con individuos previamente aturridos con ejemplares sin aturdir. Para ello fueron realizados métodos sensoriales (QIM), métodos físicos (pH y textura), métodos químicos (TBARS) y métodos microbiológicos (determinación de la bacteria *S. putrefaciens*, bacteria específica del deterioro). En la primera experiencia se obtuvieron que las mejores condiciones de aturdimiento para la lubina si que se afectara su bienestar fueron 47 mg CO₂/L en combinación con 4°C de temperatura. La aplicación de una metodología fundamentada en la observación visual y medición del color del filete y del pez entero así como la medición de la hemoglobina fue satisfactoria para la valoración de la eficacia del desangrado El desangrado tuvo un efecto positivo en el aspecto visual tanto del filete como del pez entero, a su vez el aturdimiento con CO₂ mejoró la textura durante los primeros 11 días de conservación en hielo.

Introducción

1. Bienestar animal y su legislación

La consideración al bienestar animal en los animales producidos con destino al consumo humano es de creciente importancia en la actualidad. La sociedad en su conjunto es cada vez más sensible a estas cuestiones y las administraciones competentes comienzan a dictar normas de buenas prácticas y reglas en este sentido. En la actualidad existen varios Reglamentos europeos que tratan sobre el bienestar animal, tanto en cuanto a las condiciones de producción, como de transporte, o sobre su sacrificio. Los animales acuáticos han estado hasta hace muy poco tiempo fuera de estos debates y normas, que se centraban en las condiciones de producción de mamíferos y aves. Pero en la actualidad existe un importante debate en marcha sobre el bienestar de los peces en la acuicultura. Tanto el Consejo de Europa, como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria o la Organización Mundial de la Salud Animal, trabajan sobre el bienestar de los peces en la crianza. El principal reto de su trabajo se encuentra en las dificultades para valorar científicamente la existencia o no de sensaciones de temor o de sufrimiento que puedan experimentar los peces.

El bienestar animal fue identificado como una de las prioridades del Plan Estratégico de la OIE para el período 2001-2005. Se ha decidido continuar con esta línea de trabajo y se han incluido aspectos específicos de bienestar animal en el Código Sanitario para los Animales Terrestres en los siguientes campos; transporte de animales por vía marítima y por vía terrestre, sacrificio de animales destinados al consumo humano y matanza de animales con fines de control sanitario.

Mediante la elaboración de Convenios, Acuerdos y Recomendaciones, el Consejo de Europa contribuye a la creación de un espacio legal común europeo. En muchos

casos, estos instrumentos sirven de referente en todo el continente y constituyen la base para la modificación y armonización de las legislaciones de los diferentes países en las diferentes áreas de trabajo. España entró a formar parte del Consejo de Europa en 1977. Actualmente hay cinco convenios básicos referentes al bienestar animal, siendo importantes, no sólo por su carácter vinculante, sino también porque con frecuencia la Unión Europea los toma como documento base de trabajo para elaborar normativa en esta materia. Los Convenios del Consejo de Europa en esta materia son:

- Convenio para la Protección de los Animales en el Transporte Internacional. Realizado en París el 13 de diciembre de 1968. Firmado y ratificado por España. Entró en vigor el 3 de febrero de 1975 (BOE nº266 de 6 de julio de 1975).
- Convenio para la Protección de los Animales en Explotaciones Ganaderas. Realizado en Estrasburgo el 10 de marzo de 1976. Firmado y ratificado por España. Entró en vigor el 6 de noviembre de 1988 (BOE nº259 de 28 de octubre de 1988).
- Convenio para la Protección de los Animales al Sacrificio. Hecho en Estrasburgo el 10 de mayo de 1979. No ha sido firmado ni ratificado por España.
- Convenio para la Protección de los Animales de Compañía. Elaborado en Estrasburgo en octubre de 1987. No ha sido firmado ni ratificado por España.

- Convenio para la Protección de los Animales de Experimentación. Realizado en Estrasburgo el 18 de marzo de 1986. Firmado y ratificado por España. Entró en vigor el 1 de enero de 1991 (BOE nº256 de 25 de octubre de 1990).

El 5 de junio de 2006 entro en vigor la recomendación relativa a los peces en explotaciones acuícolas adoptada por el Comité Permanente del Convenio Europeo de Protección de los Animales en Explotaciones Ganaderas (T-AP) del 5 de diciembre de 2005. En ésta, el artículo 19 trata sobre el sacrificio de urgencia en peces, los principios de este artículo son;

1. Si hubiese peces enfermos o heridos hasta el punto de no poder administrárseles ningún tratamiento ni transporte son causarles un sufrimiento o daño, serán sacrificados de inmediato por una persona con formación y experiencia en las técnicas de sacrificio, salvo si, en caso de emergencia, no se dispusiera de ninguna persona con estas características.
2. La elección del método de sacrificio dependerá del sistema de explotación, de la especie, del tamaño y el número de peces que deben ser sacrificados; deberá considerarse también la necesidad de sacrificar rápidamente un gran número de peces para controlar la propagación de enfermedades. Los métodos utilizados deberán causar una muerte inmediata, o insensibilizar rápidamente a los peces que mueran, o provocar la muerte de un pez ya eficazmente anestesiado o sin sentido.
3. Es esencial controlar la eficacia de los procedimientos utilizados para el sacrificio de emergencia. Deberían realizarse controles mediante indicadores fiables, como el cese inmediato e irreversible de los movimientos

respiratorios o la pérdida inmediata e irreversible de la actividad ocular (VERs).

4. Salvo en los casos en que tenga que sacrificarse rápidamente un elevado número de peces, y con el fin de proteger sus adecuadas condiciones de vida o de controlar las enfermedades, no se utilizará el CO₂.
5. No se permitirá seccionar las branquias o los arcos branquiales de los peces sin anestesiarlos previamente.

La existencia y aplicación de una normativa sobre protección animal diferente en los distintos Estados miembros de la Unión Europea, que podría suponer una distorsión de la competencia en los mercados comunitarios, ha animado a la Unión Europea al establecimiento de normas comunes, bajo la forma de Directivas y Reglamentos. Muchas de las Directivas están inspiradas en los Convenios del Consejo de Europa. El control respecto al cumplimiento de las normas corresponde a los organismos competentes de las Comunidades Autónomas, que deberán enviar información de su actividad en este ámbito al Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, que actúa como enlace entre éstas y la Unión Europea. A partir del 1 de enero de 2006, es de aplicación del Reglamento (CE) N°882/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2009, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre la salud animal y bienestar animal.

En España, las primeras normas relativas a la protección animal datan de 1883, cuando una Real Orden establecía que los maestros, entre sus tareas docentes, debían incluir entre sus alumnos sentimientos de benevolencia hacia los animales. Hasta

1978 el Ministerio de la Gobernación fue el responsable de dictar normas de esta materia, y vigilar su aplicación. El Decreto 2715/78 de 27 de octubre traspassa todos los cometidos en materia de protección animal al Ministerio de Agricultura. La estructura orgánica básica del Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino se desarrolla mediante el Real Decreto 1130/2008 de 4 de julio, (BOE 8 de julio), que atribuye a la Subdirección General de Explotaciones y Sistemas de Trazabilidad de los Recursos Agrícolas y Ganaderos las competencias del departamento en materia de bienestar animal.

Desde el 8 de diciembre de 2007 es de aplicación la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. El objetivo de esta ley es establecer las normas básicas sobre el cuidado de los animales en la explotación, durante su transporte y en el momento de su sacrificio. También, establece las normas básicas sobre los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Con esta Ley se completa la normativa nacional ya existente en la materia, incorporando al ordenamiento jurídico algunos aspectos de la legislación comunitaria en materia de protección animal, incluyendo la tipificación de infracciones y sanciones.

Asimismo, se modifica la Ley 8/2003, de sanidad animal para prever, en la imposición de las sanciones por la comisión de infracciones, la posibilidad de una graduación más proporcional, teniendo en cuenta los casos en los que existe una cualificada disminución de la culpabilidad del imputado.

En cuanto a la normativa específica, existe legislación que regula la protección de los animales de granja, durante su transporte y en el momento del sacrificio. La normativa vigente en materia de protección de los animales durante su sacrificio

tiene por objeto adoptar normas mínimas para garantizar que se evite cualquier dolor o sufrimiento innecesario, y asegurar a su vez el desarrollo racional de la producción y la realización del mercado interior de animales y productos animales, evitando posibles distorsiones a la competencia.

La norma básica en la materia es el RD 54/1995 de 20 de enero (BOE 15 de febrero). En este Real Decreto se fijan las condiciones aplicables a la estabulación de los animales en los mataderos, la sujeción de los animales antes de su aturdimiento, sacrificio o matanza. Se regulan también las condiciones de sacrificio y matanza fuera de los mataderos. Se contempla asimismo la posibilidad de sacrificios realizados según determinados ritos religiosos. Este Real Decreto no es aplicable a los experimentos científicos, a los animales a los que se dé muerte en manifestaciones culturales y deportivas y a la caza silvestre.

Por otra parte, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) tiene un Panel sobre salud y bienestar animal, que trata las cuestiones relacionadas con el bienestar animal, fundamentalmente con los animales de producción, incluidos los peces.

Recientemente, el Panel Científico sobre la Salud de los Animales y el Bienestar de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha emitido un dictamen relacionado con el bienestar de los animales durante los procedimientos de aturdimiento y sacrificio en las granjas, recomendando nuevas investigaciones sobre los mecanismos y los efectos de diferentes aturdimientos y métodos de sacrificio (EFSA Journal, 2004). Es importante obtener información sobre cómo los métodos podrían afectar al bienestar y a la calidad de los peces cultivados y proponer procedimientos alternativos. Uno de los pasos críticos que afectan tanto a la calidad

como al bienestar es el procedimiento de aturdimiento y sacrificio. Una forma de minimizar el sufrimiento durante el sacrificio es el uso de métodos de aturdimiento previos al sacrificio. Opiniones recientes sobre los métodos de sacrificio para los peces (Robb *et al.*, 2000) abordan cuestiones relativas a la posibilidad de consideraciones éticas en los procedimientos de la industria para el sacrificio. Según Van de Vis *et al.*, (2003), el método de sacrificio idóneo es aquel que deja inconsciente, sin dolor o sufrimiento, al pez hasta la muerte. Se han ido desarrollando varios métodos de anestesia para satisfacer el bienestar del animal, además de no afectar negativamente a la calidad final de los peces. Por supuesto, los métodos basados en el uso de productos químicos, deben ser rechazados por el riesgo potencial para el consumo humano. Hoy en día es importante continuar la investigación sobre métodos alternativos de aturdimiento y sacrificio, ya que esto va a simplificar los procedimientos comerciales. Además de las consideraciones éticas, también hay razones económicas y comerciales, ya que la calidad del filete se reduce en los peces con un mal tratamiento.

2. Lubina

La lubina, *Dicentrarchus labrax*, es una especie valorada y popular por los consumidores en el área mediterránea, así como en otras partes de Europa. El interés de mantener la calidad de este producto ha sido una preocupación creciente para la industria de la acuicultura. Además, así como el sector de producción animal en general, la industria de la acuicultura también se ocupa de la ética y problemas de bienestar.

2.1. Distribución geográfica y biología

La lubina es una especie subtropical, se distribuye desde del Mar del Norte hasta la costa de Guinea, incluido el archipiélago de Canarias. También, se encuentra en el Mar Mediterráneo, Mar Báltico, Mar Caspio y el Mar Negro (**figura 1**).

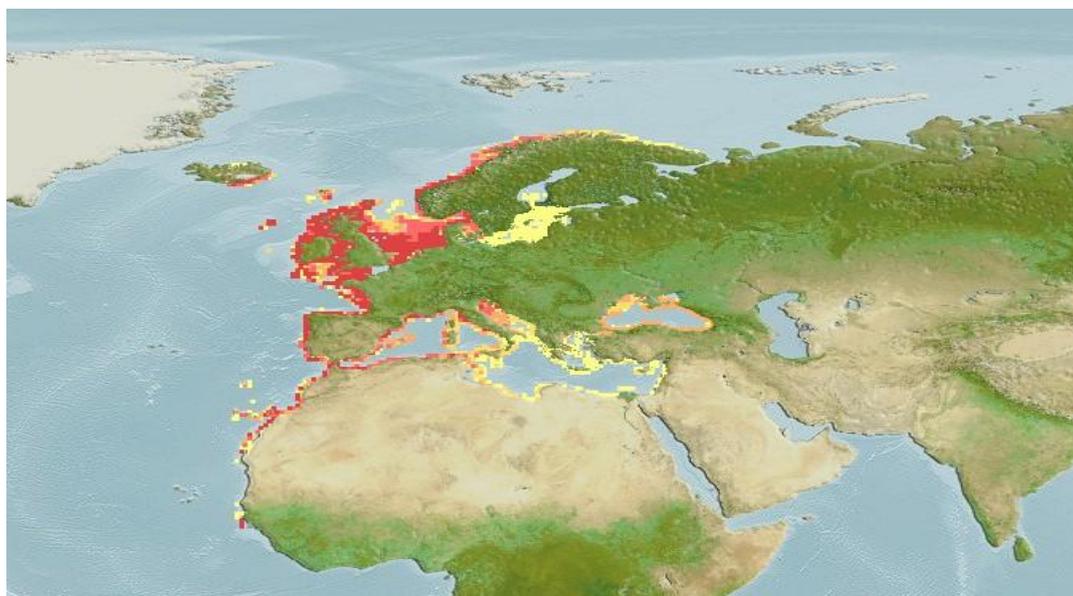


Figura1: Distribución geográfica de la lubina (Fuente FAO)

La lubina tiene una alta tolerancia a la salinidad, siendo una especie eurihalina. Además, es una especie altamente euriterma, los individuos adultos viven en rangos de temperatura entre 2°C y 32°C. El enfriamiento del agua en otoño es la causa de la migración de la lubina hacia aguas más profundas, que generalmente son más cálidas, por el efecto de la termoclina. También, la lubina tiende a concentrarse en zonas costeras debido a los efluentes de agua cálida de los ríos y estuarios. Hay sólo una puesta al año, que ocurre en el invierno en la población mediterránea (diciembre a marzo), y hasta junio en poblaciones atlánticas en zonas de estuarios, lagunas o zonas costeras protegidas. Tras la puesta los adultos vuelven a mar abierto, siendo los

huevos pelágicos de pequeño tamaño (de 1,09 a 1,39 mm). Cuando los huevos eclosionan las larvas permanecen en las zonas de nacimiento, cuando estas crecen dejan la zona y migran a zonas profundas (mar abierto). La lubina es una especie carnívora, los individuos jóvenes se alimentan de crustáceos y otras especies, cuando son adultos son prácticamente piscívoros.

2.2. Cultivo y mercado

El primer cultivo de la lubina fue posiblemente hecho por los romanos en estanques. A lo largo de años, se han desarrollado sistemas extensivos para la captura y cultivo de lubinas en zonas del litoral como las lagunas o los estuarios (Vallicultura en Italia) aprovechando cuando los adultos van a desovar a las costas o migran para la alimentación. Como especie en la acuicultura, la lubina se empezó a cultivar en los años 60 en embalses y lagunas costeras. Desde entonces las técnicas de cultivo se han desarrollado para la producción masiva de juveniles y larvas. Durante finales de los años 60, Francia e Italia compitieron para desarrollar técnicas de producción fiables para la lubina y, antes de finales de los años 70, estas técnicas fueron desarrolladas en la mayoría de los países. La lubina se cultiva comercialmente en Europa, y los principales productores son Grecia, Turquía, Italia, España, Croacia y Egipto . En los últimos 20 años la producción de lubina se ha desarrollado rápidamente debido al apoyo gubernamental a la investigación



Figura 2: Principales países productores de lubina (Fuente FAO)

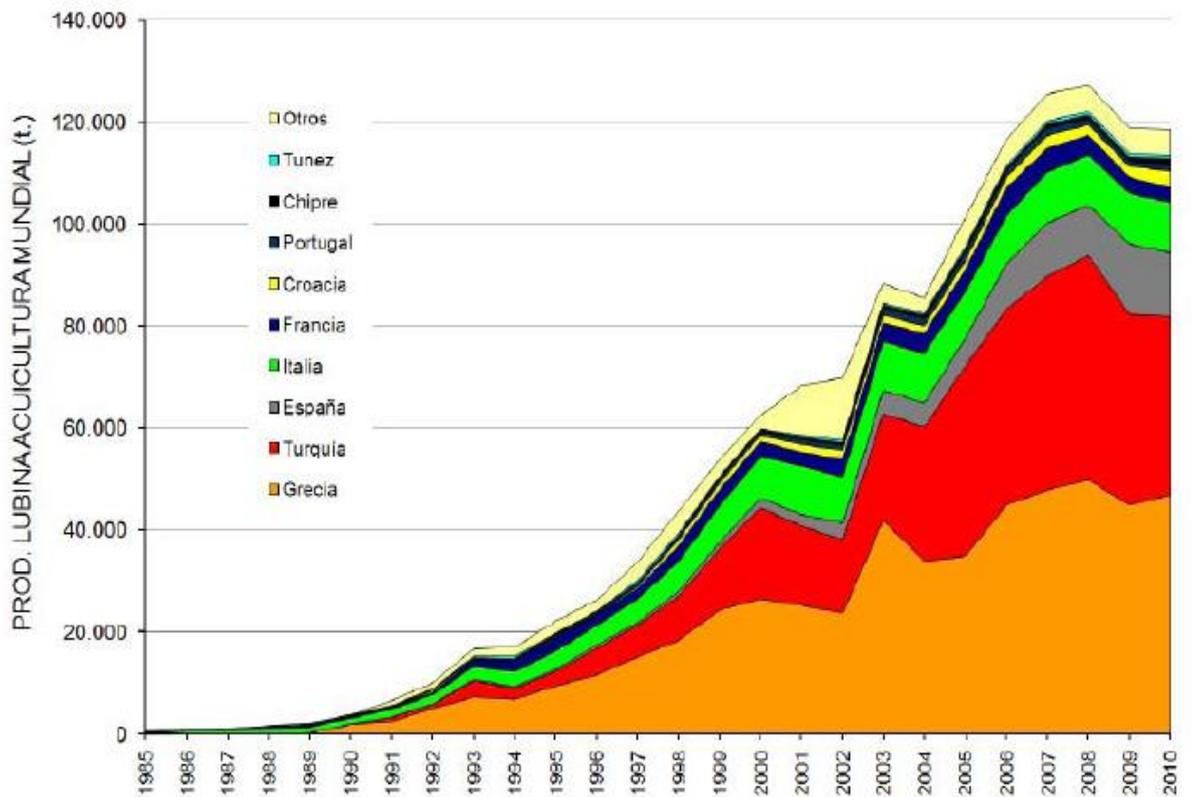


Figura 3: Producción global en toneladas de lubina (Fuente Apromar)

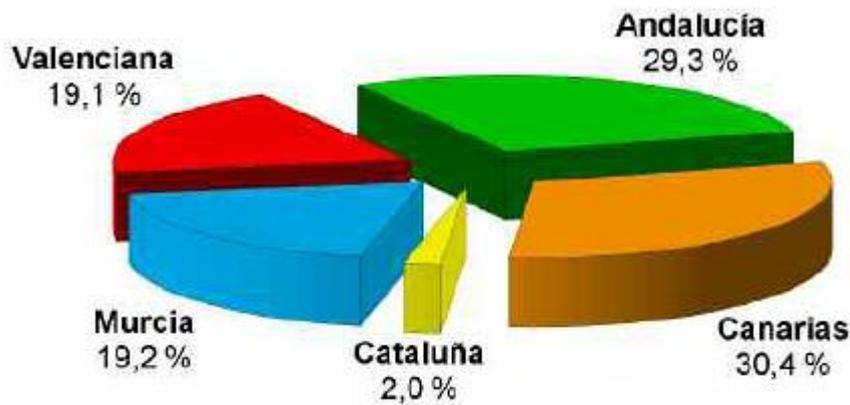


Figura 4: Distribución porcentual de producciones de lubina por CC.AA. en 2010 (Fuente Apromar)

Según FEAP, la producción acuícola total de lubina (*Dicentrarchus labrax*) en Europa y el resto del mundo en 2010 ha sido de 118.931 toneladas, que supone una reducción del 0,3% respecto de las 118.931 toneladas de 2009, que ya se habían reducido el 6,6% respecto de 2008. Los principales países productores de lubina son Grecia con 47.000 toneladas (39,6%) Turquía con 35.000 t. (el 29,5% del total de esta especie) y España con 12.495 t. (10,5%). Pero se produce lubina en un total de 17 países, incluyendo Italia, Francia, Croacia, Portugal, Chipre, Túnez, Egipto, Emiratos Árabes Unidos, Libia, Malta, Bosnia, Marruecos, Eslovenia, Alemania y Argelia (Apromar).

2.3. Taxonomía y morfología

La lubina pertenece al orden *Perciforme*, suborden *Percoidei*, familia *Serranidae*, género *Dicentrarchus* y especie *labrax*. *Dicentrarchus labrax* (Linneo, 1758) es el nombre que tiene en la actualidad la lubina en Europa.

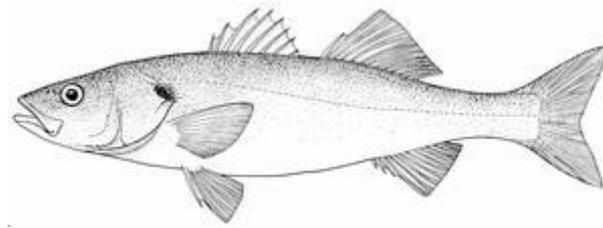


Figura 5: Dibujo de la morfología de la lubina (Fuente FAO)

La lubina tiene una longitud de 50 cm de media, con máximos observados de 103 cm en machos. Las aletas pélvicas están situadas en la parte posterior sobre el vientre y ligeramente detrás de las aletas pectorales, que están situadas justo detrás del opérculo. El cuerpo de la lubina está cubierto por escamas cuyo color varía bastante, dependiendo del origen. Generalmente el color del dorso es gris oscuro, azul o verde, y el vientre es blanco o amarillo pálido. Los flancos son azul plateado, y algunas veces dorado o bronce. Los ojos son relativamente grandes para un pez marino y el iris es de una coloración entre plateado y blanco. La boca es grande con la característica forma de bolsa cuando se abre, típica del orden Perciforme.

Como la mayoría de las especies depredadoras, el tracto digestivo de la lubina es relativamente corto y los intestinos estrechos con sus giros en la cavidad corporal. El resto de los órganos; corazón, hígado y estómago están situados a lo largo de la cavidad corporal como en el resto de especies. Con la maduración la cavidad corporal se va llenando de gónadas y grasa mesentérica. Como todos los perciformes, la lubina es un fisoclisto, tiene una vejiga natatoria cerrada, por lo que no tienen un conducto hasta el esófago.

3. Sacrificio y aturdimiento

El sacrificio se define como el proceso de matar a un animal desangrándolo (Anon, 1995), el animal muere por anoxia debido a la falta de sangre en el cerebro. Esta definición fue establecida para animales de ganadería y corral, con el inicio de la acuicultura se aplicó a los animales sacrificados en este sector. Aún así hay grandes diferencias entre el sacrificio de especies terrestres y marinas, la principal el medio seguida por la fisiología de las especies cultivadas. Debido a esto durante los últimos años se ha buscado diferentes métodos de sacrificio que cumplan los requisitos necesarios con respecto a la calidad y el bienestar del producto.

Los métodos de sacrificio se pueden clasificar en dos tipos; rápidos y lentos. Los métodos lentos suponen una alta actividad del pez y por tanto son negativos en la calidad del producto, mientras que los rápidos en principio suponen una muerte rápida del pez y una mejora de la calidad de la carne. El método de sacrificio tiene efecto en el rango de ablandamiento del filete; los valores de fuerza disminuyen después de la muerte del pez debido a la degradación del colágeno fibrilar. Además, se ha informado en la evolución post-mortem que el ablandamiento del músculo es causado por el debilitamiento del tejido conectivo pericelular, que está constituido por fibrillas de colágeno.

El aturdimiento se define como el método por el cual el animal pierde la consciencia antes de ser sacrificado. Hay diferentes métodos de aturdimiento y sacrificio de uso común en la pesca y la acuicultura en las granjas europeas para alguna de las más importantes especies cultivadas, como el corte de enmalle, la narcosis de CO₂, impulsos eléctricos, la asfixia, baños de sal, hielo... (Poli *et al.*, 2005). Los valores obtenidos sin ningún tipo de aturdimiento muestran un deterioro más rápido de la

calidad y una respuesta más alta del estrés (de acuerdo a los niveles de cortisol, de glucosa y de lactato en plasma). El rigor *mortis* se asocia con la acidificación causada por el proceso de producción de ácido láctico en el tejido muscular durante la fase de pre-mortem. Se ha demostrado que el ejercicio intenso antes del sacrificio provoca una mayor proteólisis durante el almacenamiento (Roth *et al.*, 2007; Acerete *et al.*, 2009) dando lugar a un ablandamiento del filete.

3.1. Tipo de sacrificios y aturdimiento

A continuación se exponen los diferentes métodos de sacrificio y aturdimiento utilizados actualmente en la acuicultura:

3.1.1. Sacrificio por asfixia

Es el método más antiguo de sacrificio, la muerte por asfixia se basa en el hecho de que cuando los peces son sacados del agua sus branquias son menos eficientes en el intercambio gaseoso. El pez finalmente muere de anoxia. La muerte se acelera por el esfuerzo realizado por los peces intentado escapar, estos utilizan el oxígeno más rápidamente, acelerando la muerte cerebral. La temperatura corporal de los peces también afecta a la tasa de mortalidad.

La asfixia es considerada uno de los métodos más estresantes, se han obtenido altos niveles de glucosa (8 veces superior a la media), lactato y cortisol (5 veces mayor que la media) en diversas especies sacrificadas con este método, incluida la lubina debido al estrés generado por el método (Acerete *et al.*, 2009).

3.1.2. Sacrificio con agua más hielo o shock térmico

Como los peces son poiquiloterms, su metabolismo se reduce rápidamente disminuyendo la temperatura. Esto se debe a un decrecimiento de la actividad muscular, los músculos se paralizan por el frío, con el tiempo de exposición suficiente el pez termina muriendo. Se ha demostrado que la temperatura letal para la lubina esta en torno a 2°C y 3°C. Además, es un requerimiento que los peces tras ser sacrificados se conserven en hielo para evitar y/o ralentizar el crecimiento bacteriano.

El sacrificio en hielo consiste en la introducción de peces en cubas con una mezcla de agua y hielo (generalmente en un ratio 3:1). En todo el proceso hay que controlar que la temperatura del agua se mantenga a 0°C, si la temperatura aumenta hasta los 8°C los peces no mueren de hipotermia sino por asfixia, afectando negativamente a la calidad del producto (apariencia, color y textura). El frío ralentiza el movimiento de escape de los peces, facilitando la maniobra. Aún así los peces siguen teniendo movimientos de lucha y terminan muriendo por asfixia, debido al colapso de las branquias por anoxia. El momento de la muerte es mucho más largo que por asfixia ya que la tasa metabólica de los peces es menor a baja temperatura, el oxígeno se utiliza al menos durante un tiempo (Kestin *et al.*, 1991). Se ha observado que la pérdida total de las VERs en doradas (*Sparus aurata*) sacrificadas en hielo más agua está torno a 5-5,5 min, siendo estos valores similares a la muerte por asfixia (Van de Vis *et al.*, 2003). Sin embargo, la actividad total de los peces desde el inicio del sacrificio hasta el punto de la muerte puede ser el mismo si se mantiene el nivel de oxígeno, siendo menos estresante que el sacrificio por asfixia. Se ha observado en lubina un incremento significativo del rigor en las primeras 24 horas post-mortem (Acerete *et al.*, 2009). Los valores de lactato y glucosa en plasma son pequeños en

comparación a otros métodos de sacrificio como la asfixia (Acerete *et al.*, 2009), lo que indica que el sacrificio con hielo no es tan estresante como se pensaba.

El agua más hielo puede ser utilizado tanto para aturdir como para sacrificar por asfixia, observándose en lubina que el tiempo en que tarda en morir el pez en hielo es en torno a 34 minutos (Acerete *et al.*, 2009).

3.1.3. Narcosis y aturdimiento con CO₂

Se basa en añadir CO₂ en el agua, este se disuelve formando ácidos, tras esto se introducen los peces en el agua, estos empiezan a sufrir movimientos bruscos hasta que quedan narcotizados, lo que facilita su manejo y sacrificio. Esto es debido al estado de hipercapnia en el que entra el pez, esta induce a que el pH en sangre y musculo sufre una caída brusca, debido a una baja difusión del CO₂ en la sangre. Tras esta fase se produce la acidosis que genera un aumento del bicarbonato en plasma, para equilibrar el pH, en esta fase compensatoria aumenta del Na y una disminución en plasma. Como resultado se produce una disrupción en la actividad cerebral causando la muerte del pez. Otra explicación de la muerte del pez puede ser que la actividad vigorosa durante el aturdimiento genera una sensación de asfixia activando el metabolismo anaeróbico generando lactato e iones de H⁺ (Olsen *et al.*, 2006). La saturación del agua con CO₂ genera reacciones de lucha en los peces, produciendo un efecto negativo en la calidad del filete. En informes anteriores se ha observado que la respuesta del salmón (*Salmo salar*) durante el aturdimiento con CO₂ genera estrés agudo y reacción de fuga (Robb *et al.*, 2003), dando lugar a la aparición temprana del rigor mortis y por tanto del ablandamiento del musculo (Roth *et al.*, 2006). La narcosis por CO₂ se produce después de la aparición de hipercapnia

y es probablemente causado por la disminución del pH dentro del cerebro. La tasa de inicio de la narcosis se determina por la presión parcial del CO₂ en el agua circundante cuanto mayor es la presión parcial, más rápido será el inicio de la narcosis (Bernier y Randall, 1998). Sin embargo, la presión parcial del gas en el agua no es fácil de medir y comercialmente sólo se mide indirectamente mediante el monitoreo del pH de la agua (Anon, 1995). A un pH de 5 o más abajo, la presión parcial del gas debe ser de al menos 250 mmHg (Anon, 1995), y esto genera un cese más rápido del movimiento que a menores presiones parciales del gas (Bernier y Randall, 1998).

Robb *et al.* (2000) demostraron con una serie de experiencias con salmón atlántico basadas en el aturdimiento con CO₂ utilizando las VERs (respuestas visuales evocadas) y otros indicadores de la respuesta cerebral, que el tiempo entre el cese de la actividad física del pez y la pérdida de conciencia es alto (460-600 segundos), por lo que la mayoría de los peces que son sacrificados tras ser narcotizados con CO₂ son conscientes durante todo el proceso, sufriendo durante todo el proceso. La tasa de pérdida de la función cerebral en los peces narcotizados con CO₂ también puede verse afectada por la temperatura. Se ha demostrado que el grado de la respuesta hiperactiva de la carpa (*Cyprinus carpio*) en CO₂ se pueden reducir enfriando el pescado (Yokoyama *et al.*, 1989). A altos niveles de CO₂ los peces parecen que están inconscientes, pero a la entrada a los tanques para el sacrificio tienen movimientos bruscos (Roth *et al.*, 2006). No solo el uso del CO₂ es estresante sino el posterior desangrado que aumenta el estrés acelerando el rigor (Roth *et al.*, 2006).

Se ha observado en lubina que el tiempo en que tarda en morir el pez por CO₂ es en torno a 16 minutos (Acerete *et al.*, 2009). La concentración media letal de CO₂ para

la lubina está entre 104, 4 y 115,5 mmHg en períodos de 48 ± 120 h (Cecchini *et al.*, 2001).

3.1.4. Sacrificio por evisceración

Las vísceras de los peces contienen proteasas y otras enzimas requeridas para la digestión y el metabolismo. Después de la muerte estas enzimas empiezan la autólisis y pueden generar graves daños en la carne, debido a esto es necesario extraer las vísceras lo antes posible. En algunas especies la evisceración es parte del sacrificio, las vísceras son extraídas del pez mientras está vivo causando la pérdida de la sangre. Este procedimiento se utiliza para una gran cantidad de especies pescadas, incluidas los peces planos que pueden tardar más de 6 horas en morir después de la evisceración. Actualmente este método se utiliza en gran parte de las industrias de acuicultura de Europa, en especial del Norte de Europa.

3.1.5. Sacrificio por “baño de sal”

En los Países Bajos, el método de sacrificio más utilizado con la anguila (*Anguilla anguilla*) es el llamado “baño de sal”. Se añade NaCl o una combinación de NaCl con Na₂CO₃ acuoso en un tanque, tras esto se introducen los peces. La duración del proceso es de un promedio de 20 minutos, tras esto los peces son eviscerados. El método no cumple los requisitos para el bienestar del animal, ya que como se ha observado el VERs (respuestas visuales evocadas) tardan tiempo en desaparecer, y los peces intentan escapar del tanque durante los 3 primeros minutos del proceso (Van de Vis *et al.*, 2003).

3.1.6. Sacrificio por percusión

Es un método de sacrificio utilizado habitualmente basado en matar al pez con un golpe en la cabeza con la ayuda de un palo. Los golpes de percusión aplicados a la cabeza de los animales causan un diferencial de presión dentro del cráneo. Si el golpe es de la suficiente fuerza, se provoca la interrupción de los procesos en el cerebro causados por los cambios de presión. Tras el golpe el animal está inconsciente, pero es capaz de recuperarse después de un período de tiempo. El aumento de la magnitud de la fuerza puede causar un daño irreparable al cerebro, el animal pierde el conocimiento inmediatamente después del golpe y muere. Una variante de la percusión es el uso de una pistola, en este caso el momento de la pérdida de consciencia se ve afectado por la ubicación exacta y la trayectoria del disparo; en la parte frontal del cerebro (lóbulo óptico) o en la parte anterior del cerebelo, aunque es posible que otras partes del cerebro continúen funcionando. Cuando los disparos dan en zonas por detrás del cerebro, en la parte posterior del cerebelo y en el tronco cerebral el animal sigue consciente y sufre, generando un aumento del estrés disminuyendo la calidad del filete (Robb *et al.*, 2000). Duran *et al.*, (2008) demostraron que la resistencia del filete de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y de la carpa frente a la fuerza (presión) es mayor con el sacrificio por percusión que con la asfixia

El principal problema del sacrificio por percusión es que hay que realizarlo de manera individual, por lo que se necesita un gran número de personal y de tiempo. A su vez la percusión también es utilizada para aturdir a los peces.

3.1.7. Sacrificio y aturdimiento por electrocución

La electricidad es ampliamente utilizada para el sacrificio y aturdimiento de los animales de carne roja y aves de corral. El aturdimiento eléctrico afecta a la actividad nerviosa; no se puede enviar información al cerebro, por lo que la información nerviosa no llega a ser procesada. Además, se produce una electroparálisis de las fibras musculares generando una rápida contracción de los músculos, quedando el pez paralizado. La electricidad es una herramienta potencial tanto para el sacrificio como para el aturdimiento debido a que el agua es un buen conductor de esta. Para que el pez muera por electrocución su corazón debe pararse a la vez que es aturcido, sin embargo, el corazón de las especies de peces hasta ahora investigadas parece ser muy sólido (Lambooi *et al.*, 2008). Por lo tanto, es necesario utilizar una mayor corriente para destruir los nervios que controlan el corazón, o para mantener a los peces en la corriente eléctrica más tiempo para que mueran de anoxia antes de que el corazón desfibrile. Diversas investigaciones sobre aturdimiento eléctrico valoran a la electricidad como un potencial método de sacrificio. Robb *et al.*, (2003) estudiaron que la duración de la insensibilidad se incrementa con el aumento de la corriente y la duración de la misma, las corrientes con una duración mayor a 30 segundos pueden matar al pez. Además, demostró que la corriente óptima para el sacrificio en un corto plazo de tiempo de la trucha arcoíris es de 50 Hz. Van de Vis *et al.*, (2003) informaron que aplicando el sacrificio por electrocución en combinación con gas de nitrógeno en la anguila se obtiene una mejor calidad del filete en comparación con otros métodos de sacrificio.

El aturdimiento con electricidad se basa en aplicar una corriente en los peces, la intensidad y la duración de la corriente varían en función a la especie y número de individuos, generalmente se utilizan 50 Hz. Actualmente el método de aturdimiento

eléctrico es el que hace sufrir menos al pez (mayor bienestar). Se ha demostrado en que los peces aturridos con electricidad no muestran comportamientos de escape durante el sacrificio como en otros métodos tradicionales como el hielo, lo que supone una reducción del estrés y de sus repercusiones en la calidad del filete (Knowles, 2007). En comparación con el método de aturdimiento en hielo no existen diferencias significativas en la calidad total y la frescura externa en la lubina (Knowles *et al.*, 2007). No se han mostrado diferencias en la dureza y la fuerza del corte del filete a los 7 días post-mortem en el rodaballo (*Psetta máxima*), considerándose el método de aturdimiento eléctrico óptimo (Roth *et al.*, 2007). A su vez, diferentes paneles de cata no han encontrado diferencias entre las características organolépticas de rodaballo (*Psetta máxima*) y lubina aturridos con electricidad y con otros métodos hasta los 10 días del sacrificio (conservados en hielo), considerándose de una calidad excelente los filetes de peces aturridos eléctricamente (Knowles *et al.*, 2007). Según Lambooij *et al.*, (2003) la orientación de los peces con la corriente puede ser importante, si la corriente fluye a través de la cabeza o a través de todo el cuerpo.

Pero su principal problema es el costo, ya que se obtiene un producto con características similares a otros métodos tradicionales de aturdimiento y sacrificio como el hielo. Además se han reportado una serie de problemas del uso de este método: en anguila y otros peces se ha observado que la aplicación del aturdimiento eléctrico durante más de un segundo las VERs (respuestas del movimiento ocular) no se pierden inmediatamente como se piensa, lo que indica que la aplicación de un tiempo de aturdimiento erróneo afecta negativamente al bienestar del pez (Van de Vis *et al.*, 2003). Se ha observado que los peces aturridos eléctricamente muestran un color más claro en los ojos, pero este se pierde a los 30 minutos del sacrificio.

Además, en lubina se han observado quemaduras en labios y branquias (sobre todo en branquias) cuando la exposición a la electricidad es alta, lo que puede repercutir negativamente en el aspecto externo del producto (Knowles *et al.*, 2007; Roth *et al.*, 2007). No se han reportado variaciones en la coloración de la lubina con el método de aturdimiento eléctrico. Utilizando el valor K, indicador químico, para la observación de la degradación de los nucleótidos no se ha observado valores significativos, excepto en a partir del 6 día de almacenamiento en hielo, en el que se produce un aumento brusco. También, se ha demostrado un aumento del pH en las primeras 4 horas post-mortem, el cual no tiene un efecto claro en la calidad del filete de lubina (Knowles *et al.*, 2007). Se han reportado hemorragias en la carne y rotura de huesos aplicando el aturdimiento eléctrico previo al sacrificio (Knowles *et al.*, 2007). Estos fenómenos varían en función a la especie y a la potencia. En salmón Atlántico las hemorragias en los filetes y las lesiones en la médula son muy comunes con el uso del aturdimiento eléctrico, mientras que en el rodaballo tienen baja incidencia, siendo la potencia óptima para estimular el sistema nervioso central y por tanto aturdir al pez 80 Hz (Roth *et al.*, 2007). El aturdimiento por electricidad tiene efecto en el tiempo del rigor; durante los 6 primeros días post-mortem el rigor se adelanta dos días y entre los días 6 y 10 post-mortem el rigor se adelanta un día. Esto es debido a la estimulación eléctrica del musculo, este se contrae y se activan diversos procesos metabólicos que aceleran el rigor. Debido a que el rigor es utilizado como indicador de frescura, el adelantamiento de este da a la lubina una apariencia de mayor edad a la correspondiente (Knowles *et al.*, 2007). En el caso en que se implantara el método de aturdimiento eléctrico como oficial, se debería reeducar a los paneles de cata debido a este fenómeno de adelantamiento del rigor.

3.1.8. Sacrificio por desangrado

El proceso del desangrado se basa en la eliminación del mayor volumen de sangre que tenga el pescado. El método es simple; el pez muere por anoxia debido a la pérdida de la sangre. El sangrado a raíz de un corte con un cuchillo afilado puede ser más rápido que con un cuchillo tajante, debido a que los vasos sanguíneos tienden a ocluirse después de un mal corte disminuyendo la pérdida de sangre, muriendo lentamente. Durante la muerte, el pez se puede mover vigorosamente utilizando las reservas de oxígeno más rápido de lo normal desangrándose con mayor velocidad. El pez termina muriendo en torno a los 5 minutos (Robb *et al.*, 2000).

3.1.9. Sacrificio y aturdimiento por anestesia

La adicción de anestésicos en el agua puede facilitar el manejo de los peces durante el sacrificio, y por tanto el estrés y la actividad muscular generados durante éste. En Nueva Zelanda y Australia se utiliza el anestésico AQUI-S, después de 10-13 minutos de añadirlo los peces quedan anestesiados. Tras esto, los peces son trasladados a los tanques donde son sacrificados con percusión. Existen otros anestésicos más utilizados en investigación, pero también pueden ser aplicados en el sacrificio (Comité de la Convención Europea para la protección de los animales de las explotaciones ganaderas, 2006) como el MS-222, la benzocaína, el etomidato y sus metabolitos. El volumen añadido de anestésico depende del volumen de agua y del número de peces a aturdir. El nivel de oxígeno es monitorizado durante todo el aturdimiento, si es necesario se añade oxígeno para evitar la muerte del pez.

Existen 5 estados que describen el efecto de la anestesia; sedación ligera (pérdida parcial de la reacción a las perturbaciones externas no invasivas), sedación profunda

(pérdida parcial del equilibrio, pérdida de la reacción a las perturbaciones externas no invasivas), anestesia parcial (pérdida de equilibrio, desequilibrio en la natación, responde a las perturbaciones externas invasivas), anestesia ligera (pérdida los reflejos, no responde a las perturbaciones externas invasivas) y anestesia profunda (colapso medular que lleva a la muerte) (Robb, 2001).

Este método no es muy utilizado debido a que su uso supone añadir al medio y a los peces sustancias químicas, debido a esto a la hora de añadir anestésico hay que tener cuidado con el porcentaje que no se diluye del todo en el agua. Tal procedimiento no da al pez la oportunidad de eliminar las sustancias de su carne, este hecho se demuestra por la creciente preocupación de los consumidores japoneses por los residuos de sabor en peces anestesiados previamente al sacrificio (Roth *et al.*, 2007).

3.1.10. Combinación de narcosis con CO₂ con bajas temperaturas como método de aturdimiento

Por si solos, la utilización de frío (agua más hielo) o la narcosis no cumplen los requisitos para aturdir satisfactoriamente a los peces durante el sacrificio, afectando a la calidad del producto. Se ha observado que los niveles de lactato en plasma son más altos con el método de la asfixia en hielo que con CO₂. Para ambos métodos se producen movimientos de lucha por parte del pez, sin embargo el tiempo hasta la muerte en el método del hielo es más largo lo que produce un mayor impacto, dando lugar a una alta actividad metabólica en los músculos y por lo tanto la acumulación de metabolitos como el lactato en el plasma sanguíneo. Esto se expresa en el incremento significativo del rigor en las primeras 72 horas post-mortem. El aturdimiento con frío es demasiado largo por lo que los peces sufren durante todo el

proceso (movimientos bruscos) considerándose este método inhumano (Van de Vis *et al.*, 2003). La narcosis con CO₂ a altos niveles supone un método muy agresivo para los peces, el proceso dura pocos minutos, pero durante este tiempo los peces se mueven bruscamente lo que indica que están sufriendo, por lo que este método también es inhumano (Van de Vis *et al.*, 2003)

El principio del aturdimiento de la narcosis con CO₂ en combinación con el frío no es nuevo, los estudios realizados por Yokoyama *et al.*, (1989) muestran que existe un efecto de aturdimiento con la combinación de CO₂ y frío. Además, demostró que la anestesia inicial de CO₂ (P CO₂ = 80 mm Hg) en combinación con temperatura baja del agua (4-8°C) se puede emplear con éxito en un sistema cerrado antes de transporte (14-8°C, 10 h) de adultos de carpa. La respuesta hiperactiva del CO₂ se reduce en cierta medida por la reducción de la temperatura de los peces. La aplicación de este aturdimiento no tiene efectos adversos sobre la calidad del filete (Yokoyama *et al.*, 1993). Después del 2000, el método de combinación de CO₂ con frío se convirtió gradualmente en el método generalizado a gran escala en el aturdimiento de salmónidos en Noruega. Basándose en los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Erikson *et al.*, (2006) en salmón Atlántico sobre la combinación de narcosis de CO₂ combinado con frío, los fabricantes de tanques de enfriamiento en vivo equiparon en estos sistemas de aporte de CO₂ a niveles constantes, aunque de forma considerable se sigue utilizando la metodología tradicional para el aporte de CO₂. La mejora de los sistemas de control para el manteniendo constante de los niveles de oxígeno disuelto (70-100% de saturación) también se introdujeron.

Erikson *et al.*, (2006) aplicaron la combinación de narcosis de CO₂ con frío para aturdir salmón Atlántico obteniéndose buenos resultados; los peces no sufrieron movimientos bruscos durante el desangrado ni durante el sacrificio, indicando que la

combinación de CO₂ con frío es un buen método de aturdimiento, que cumple los requisitos del bienestar del animal. Cuando se compara la narcosis de CO₂ con otros métodos de aturdimiento, como el aturdimiento eléctrico o la percusión, se obtienen valores significativamente altos del rigor en las primeras 72 horas (obteniéndose el valor máximo a las 12 h) debido a la rápida disminución del pH (Erikson *et al.*, 2006). Además, la reducción de la temperatura genera el mismo efecto, se obtienen valores significativos durante las primeras 24 horas (Roth *et al.*, 2006).

La hipotermia es más eficaz para los peces aclimatados a las aguas por encima de 10-8°C, actuando como un sedante, por el contrario en los peces de aguas frías, por debajo del rango anterior, la aplicación del frío para aturdir no es muy eficaz (Robb, 2001). A su vez, la aplicación de bajas temperaturas (8-10°C) conjunto a la narcosis de CO₂ para aturdir en especies de aguas templadas como la lubina no genera daños en el epitelio branquial, como se ha visto en otras especies de agua fría como el salmón atlántico (Erikson *et al.*, 2006), lo que evita efectos negativos en el bienestar del animal durante el aturdimiento y el desangrado.

Actualmente los métodos de sacrificio preferidos en Europa para la lubina son la asfixia y agua más hielo. Mientras que los métodos de aturdimiento son la percusión, anestesia y shock térmico (hielo).

3.2. Métodos para evaluar la eficacia del sacrificio sobre el bienestar animal

La cuestión clave en la evaluación del bienestar en el momento del sacrificio es el sufrimiento animal, el cual es difícil de medir. Se ha demostrado que, aunque menos desarrollado que en otros animales de granja, los peces también tienen órganos

sensoriales capaces de detectar los estímulos dolorosos, vías sensoriales para el procesamiento de dichos estímulos y mecanismos cerebrales que procesan esta información y generan respuestas conductuales. Una evaluación fiable del bienestar de los animales y el impacto en la calidad del producto, requiere un enfoque multidisciplinario. Esto podría realizarse con el estudio de los cambios de los parámetros de la función cerebral, las respuestas endocrinas, los procesos bioquímicos y los cambios de la calidad.

Desde el punto de vista del bienestar, el proceso de pérdida del conocimiento o bien debe ser inmediato, o no debe inducir a ningún estrés. Además, durante el desangrado el animal deberá estar totalmente o parcialmente inconsciente, ya que el desangrado como se ha comprobado es estresante. El comportamiento puede ser un buen indicador no invasivo para la determinación del bienestar de los peces, ya que a menudo estos responden rápidamente a los cambios ambientales. Durante el sacrificio, el comportamiento de los peces da indicios de la presencia o ausencia de la conciencia. Los estudios de comportamiento consisten en una serie de observaciones llevadas a cabo durante o después del sacrificio y/o aturdimiento. La mayoría de los observaciones están relacionadas tanto con la propia conducta, tales como la resistencia y la persistencia de la motilidad de natación, y las respuestas a estímulos tales como la capacidad de mantener la equilibrio cuando el pez esta al revés, el movimiento de los ojos después de los cambios en las posturas del cuerpo en el eje longitudinal, la reacción a la punción de la aguja en la cabeza o la cola (pinchazo), el manejo a lo largo de la línea lateral y la aplicación de electricidad de baja tensión (Van der Vis *et al*, 2003).

Por otro lado, están los indicadores con respecto a la función cerebral, siendo los principales las VERs (respuestas visuales evocadas), las SERs (respuestas somato-sensoriales), las EEG (respuestas de electroencefalograma) y las ECG (respuestas de electrocardiograma). Kestin *et al.*, (2002) desarrollaron un método de puntuación usando como factores de control la natación, las reacciones al contacto, el movimiento de las branquias y de los ojos. Estas actividades están relacionadas directamente con la respuesta cerebral frente a estímulos externos. Kestin *et al.*, (1991) y Robb (2000) midieron las VERs frente al estímulo externo de un flash de luz para determinar la actividad cerebral. Este método es utilizado debido a su sencillez, ya que la actividad visual es una de las últimas respuestas que tiene el cerebro cuando muere o se vuelve disfuncional. El uso de las VERs para determinar cuando un animal está inconsciente fue discutido por y Kestin *et al.*, (1991). A su juicio la pérdida de las VERs indica una disyunción cerebral profunda, lo que es sinónimo de una pérdida de la consciencia residual. Si las VERs están inactivas se puede suponer que el animal no responde a estímulos visuales y por tanto está inconsciente. La ausencia de las VERs se considera un indicador fiable de la pérdida de la consciencia (Robb *et al.*, 2000; Van de Vis *et al.*, 2003). (Robb *et al.*, 2000, 2003; Kestin *et al.*, 2002; Lambooi *et al.*, 2003, Roth *et al.*, 2003; Van de Vis *et al.*, 2003) estudiaron las aplicaciones directas de estímulos eléctricos y táctiles sobre el pez para generar respuestas de dolor en el cerebro (SERs), las cuales eran interpretadas a través de encefalogramas (EEGs). También observaron los cambios en la forma de onda de la actividad cerebral en general para detectar el nivel de respuesta. Usando la transformación rápida de Fourier de la actividad cerebral detectada, se pueden determinar e interpretar las frecuencias de los impulsos eléctricos en el cerebro para mostrar los niveles de consciencia. En la **Tabla I** aparecen los diferentes tiempos de

pérdida de las VERs y conocimiento en función al método de aturdimiento en salmón Atlántico (Van de Vis *et al.*, 2003):

Tabla I: Diferentes tiempos de pérdida del VERs y comportamiento en función al método de aturdimiento en salmón atlántico (Van de Vis *et al.*, 2003)

Método	Tiempo inicial de pérdida de conocimiento (min)	Tiempo de pérdida de las VERs
Corte de branquias	2,2	4,7
CO2	1,6	6,1
Percusión	0	0,3
Electricidad (durante 3 sg)	0	0

La medida de la actividad cerebral (EGS) es lenta y difícil de medir, además de utilizarse de forma complementaria a otras técnicas como el comportamiento y las VERs, por lo que en general se utilizan métodos visuales del comportamiento del pez. La pérdida de la consciencia de un pez se puede clasificar usando las siguientes observaciones;

- Un pez totalmente consciente tiene una actividad de natación normal, no se invierte la posición cuando nada y muestra una respuesta de escape cuando se

maneja. Además, tiene respuesta ocular a los estímulos, y el movimiento respiratorio es rítmico.

- Un pez medio consciente muestra una actividad natatoria anormal y lenta, su respuesta de escape es lenta y torpe. Con respecto a la respuesta ocular, esta es anormal, y su respiración lenta.
- Un pez inconsciente no muestra capacidad de natación y escape. La posición de los ojos es fija (no hay movimiento) y las branquias se mueven muy lentamente.

4. Desangrado

4.1. Incidencia y efecto en la acuicultura

Desde hace más de 10 años la presencia de manchas de sangre en los filetes de salmón, así como de otros peces como la trucha arcoíris está siendo un problema en las industrias de acuicultura en el Norte de Europa (Escocia y Noruega), llegando a afectar a un 19% de la industria escocesa (Olsen *et al.*, 2006). Estas manchas de sangre también llamadas bloodspots han representado una cuarta parte de las pérdidas económicas asociadas a la producción de salmón ahumado (Olsen *et al.*, 2006). La presencia de manchas de sangre tiene diferentes repercusiones en la producción de la acuicultura, siendo el principal el aspecto que tienen los filetes para el consumidor (Robb *et al.*, 2003; Roth *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2006), debido a que la sangre residual supone una fuente potencial de la oxidación lipídica y el crecimiento microbiano, ambos principales factores que afectan a la vida útil del filete, y por tanto a las características organolépticas. En los últimos 10 años, se han

publicado evidencias de que la hemoglobina puede actuar como pro-oxidante causando mal olor durante el almacenamiento (Olsen *et al.*, 2006). La hemina o el Fe procedente de la hemoglobina y la mioglobina durante la hemólisis actúan como catalizadores lipídicos en paralelo a la formación de óxidos, peróxidos de H y radicales de hidroxilo oxidando los lípidos localizados en el musculo.

4.2. Características de las manchas de sangre residual

Las manchas de sangre residual o bloodspots están localizadas sobre todo en la línea media y la zona ventral, en gran medida en la zona de las aletas. Se pueden clasificar en tres tipos (Robb *et al.*, 2003):

- Tipo 1: manchas circulares de 1-2 mm que atraviesan el filete en la región de la línea media, a lo largo del filete. Son observables tras cortar el filete pero también en superficie. Este tipo de mancha genera pérdidas económicas importantes (**figura 6**).
- Tipo 2: manchas pequeñas de 1 mm de ancho y 1-4 mm de largo en la zona abdominal. Se observan cuando se corta el filete. Estas no causan pérdidas económicas ya que se limitan a las aletas ventrales y pueden ser recortadas (**figura 7**).
- Tipo 3: manchas ocasionales de hasta 2 cm de largo y 2 mm de ancho, poco ocasionales (**figura 8**).

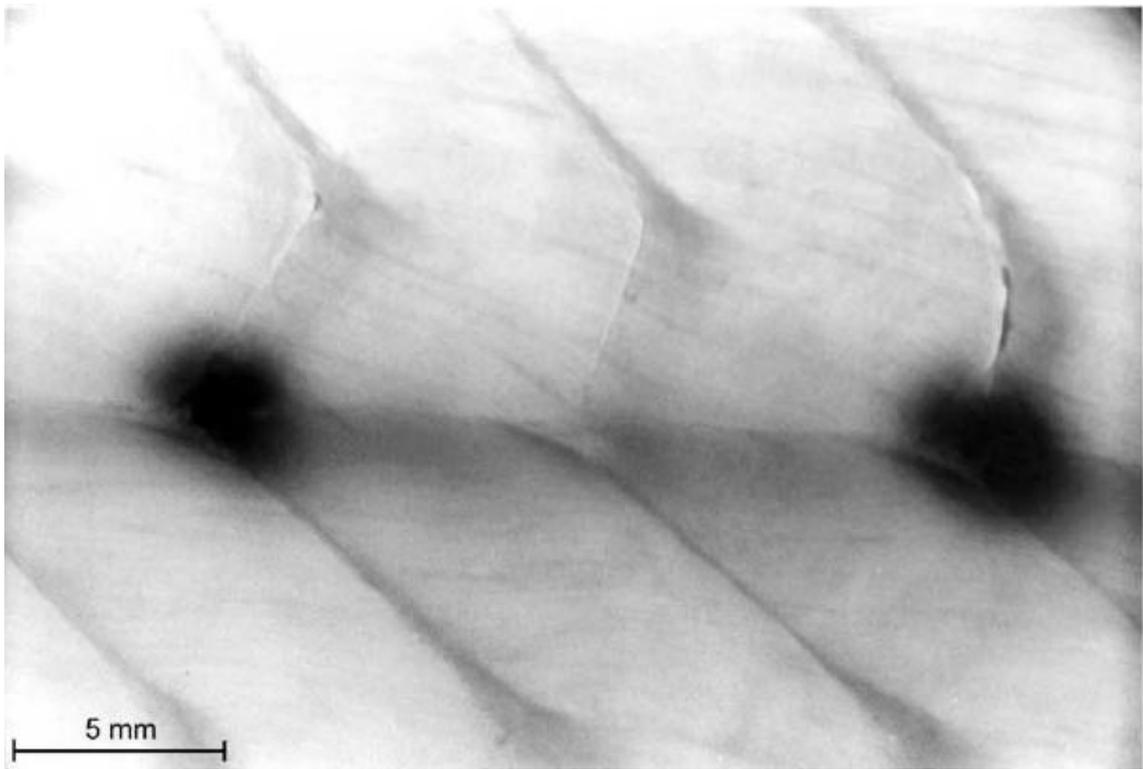


Figura 6: Manchas de sangre residual de tipo1 en la línea media del filete de salmón (*Salmo salar*) (Robb, 2001)

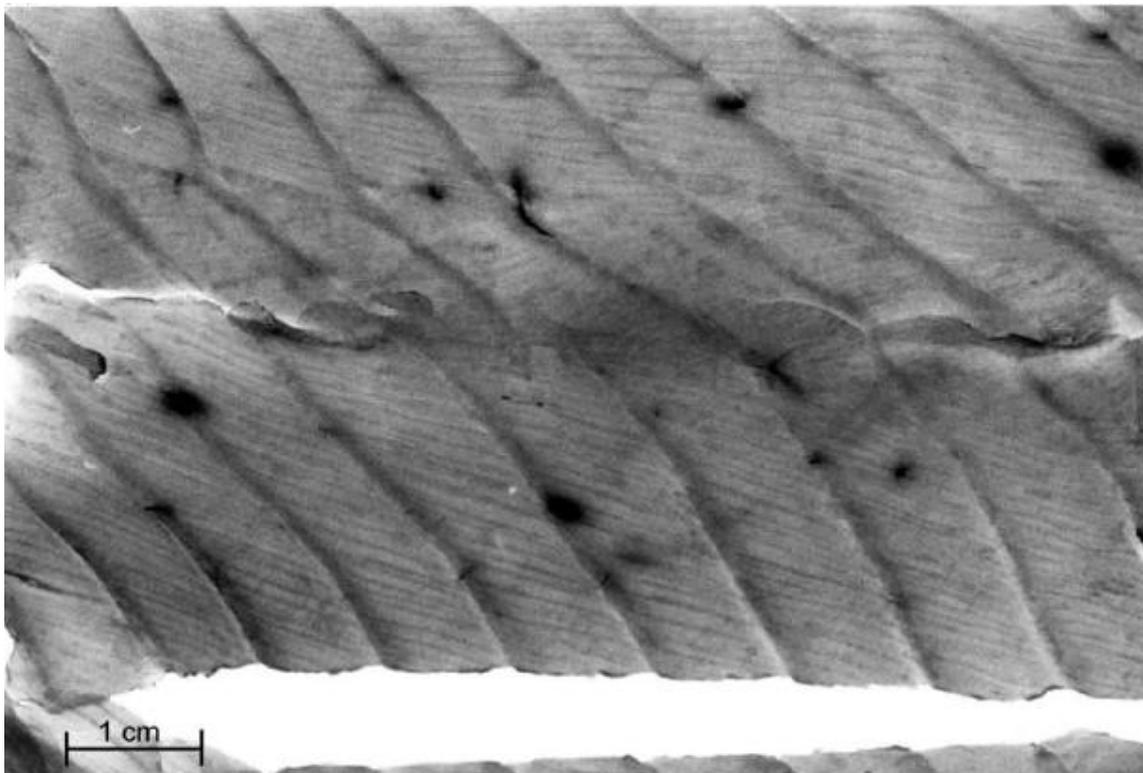


Figura 7: Manchas de sangre residual de tipo2 en filete de salmón (*Salmo salar*) (Robb, 2001)

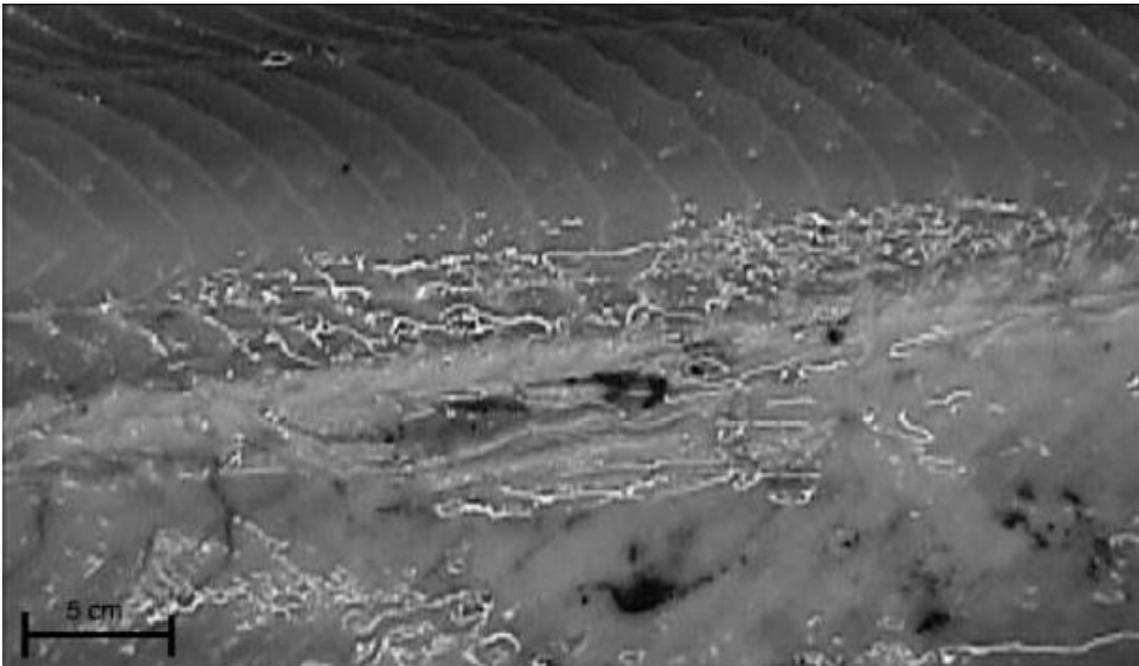


Figura 8: Manchas de sangre residual de tipo3 en filete de salmón (*Salmo salar*) (Robb, 2001)

Las condiciones durante el cultivo; alimento, densidad de cultivo, tipo de cultivo no tienen efecto en la formación de manchas de sangre residual. El proceso de sacrificio si tiene importancia en la formación de las manchas de sangre residual. Cuando los peces son expuestos a condiciones de hipoxia, hipercapnia o simplemente una mayor actividad muscular, los peces son capaces de disminuir la acumulación de sangre en los intestinos y cambiar el flujo circulatorio en los músculos (Roth *et al.*, 2009). En el proceso del sacrificio los peces son expuestos a ambientes hipercapnicos e hipóxicos, siendo un factor en la formación de los bloodspots.

Por tanto las condiciones post-mortem de gran importancia (Roth *et al.*, 2009), siendo el tiempo entre el sacrificio y el desangrado uno de los más importantes. Esto es debido a la capacidad de coagulación de los peces; a lo largo de la evolución los peces han desarrollado una serie de mecanismos que les permiten coagular rápidamente las heridas.

Otra condición post-mortem, considerada la más importante para muchos, es la posición (orientación) y la gravedad ejercida sobre los filetes durante el almacenamiento; Olsen *et al.*,(2008) y Roth *et al.*, (2005, 2007) demostraron que la gravedad es un factor importante en el desangrado, obteniéndose un mayor desangrado con el vientre hacia abajo. En experimentos de Roth *et al.*, (2009) ni los estímulos eléctricos en el cadáver ni el estrés agudo por el almacenamiento tuvieron efecto en el número de manchas de sangre residual, pero si la orientación de los filetes durante el almacenamiento (prueba de Wilcoxon). El método del tratamiento del filete es un factor muy importante y estudiado en relación a la aparición de manchas de sangre residual. Se ha comprobado que el lavado de los filetes con agua entre 8 y 10°C reduce el número de éstas (Roth *et al.*, 2009). El número de manchas es menor aplicando un lavado tras la evisceración que desangrando al aire libre (Roth *et al.*, 2009). También, se ha observado que la condición de almacenamiento es importante, se reducen el número de bloodspots guardando los filetes en cajas de EPS que en una mezcla de hielo (Roth *et al.*, 2009).

Debido a esto es necesario la aplicación del desangrado. Los métodos tradicionales para el desangrado son el corte de branquias y la evisceración. El corte de las branquias puede detener el flujo circulatorio hasta cierto punto, pero los peces tienen la capacidad de reducir la presión arterial en el lado venoso, creando un diferencial de presión y manteniendo el flujo de sangre. En los peces la mayor parte del volumen de sangre se encuentra en la parte venosa del sistema circulatorio, esto significa que por evisceración la mayor parte de la sangre se elimina con los intestinos. Además, la mayor parte de la sangre en la musculatura posterior está centrada en la zona de los túbulos renales, por lo que con la evisceración se puede romper la resistencia ejercida por los riñones sobre la sangre (Roth *et al.*, 2005). En general el volumen de sangre

en los peces es de aproximadamente el 3 % del peso corporal, al ser eviscerado el pez se elimina el 80% de la sangre. Por lo tanto, sólo el 20% de la sangre está presente en el producto final. Con estos datos también se puede indicar que no es necesario que el corazón del pescado siga latiendo para un buen desangrado (Robb, 2001). A su vez peces que han sido eviscerados inmediatamente tras el aturdimiento muestran un menor volumen de hemoglobina en el filete (Olsen *et al.*, 2006). Tejada y Huidobro (2002) informaron que la evisceración en dorada (*Sparus aurata*) redujo la intensidad del rigor mortis y la carga microbiana, sin afectarse ninguno de los otros parámetros de calidad. Por otro lado, los resultados del informe de Papadopoulos *et al.*, (2003), basados en análisis microbiológicos y sensoriales, sugieren que la lubina eviscerada tiene un periodo más corto de vida útil que sin eviscerar.

Se han probado diferentes métodos de desangrado para reducir el volumen de sangre y por tanto el número de manchas de sangre, los mejores resultados se han obtenido con la evisceración y con el corte de 4 arcos branquiales del mismo lado de la cabeza (método tradicional), y los peores resultados con el corte de 8 (los dos lados de la cabeza) y la extracción del corazón con el salmón Atlántico (*Salmo salar*) (Roth, 2005; Erikson *et al.*, 2010). Hay que tener en cuenta que algunos autores (Robb *et al.*, 2003; Roth *et al.*, 2007) indican que el método de desangrado tiene poca influencia en la calidad de los filetes, pero si tiene importancia en el aspecto visual del producto. Cabe destacar, que en especies de peces planos como el rodaballo (*Psetta máxima*) el volumen de la sangre es menor que en especies pelágicas, teniendo un nivel de pH mayor en músculos y sangre tolerando mejor la oxidación lipídica, Roth *et al.*, (2003) demostró a partir de paneles de cata que no había diferencia de sabor entre un rodaballo desangrado y otro sin desangrar, aún así el impacto visual si generaba un efecto negativo.

Aún así, el desangrado se ve afectado no solo por el propio método de desangrado, sino por otros factores como la temperatura, el tiempo y el método de sacrificio y/o aturdimiento; se ha observado que el tiempo de coagulación de la sangre está fuertemente influenciado por la temperatura. A bajas temperaturas el tiempo de coagulación es prolongado, mejorando el sangrado. Si se mantienen los pescados entre $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 60 min el tiempo de coagulación es de 33 ± 6 min (Olsen *et al.*, 2006), por lo que es de interés la aplicación de métodos de sacrificio y aturdimiento que supongan la reducción de la temperatura. Se ha observado que tanto el corte de branquias como la reducción de la temperatura genera una reducción rápida del pH y la aparición del rigor (Roth *et al.*, 2006). Erikson *et al.*, (1999) describieron que los peces que son desangrados sufren una disminución de la adenosina 50-trifosfato (ATP) y de la creatina fosfato (CPr) lo que indica una alta actividad muscular durante el desangrado. Este fenómeno tiene su lado positivo, ya que si adelanta el rigor el pescado se procesa antes y está listo para el mercado, siendo de interés económico. Además, esta alta actividad muscular demuestra que es necesario un aturdimiento previo al desangrado y sacrificio. Otro factor que hay que tener en cuenta a la hora de desangrar es el lavado; se obtienen menores volúmenes de sangre residual cuando tras el fileteado se realiza un lavado (Erikson *et al.*, 2010; Roth *et al.*, 2009) en comparación a otros que no han sido lavados o han sido lavados en otro momento del procesamiento, obteniéndose valores óptimos con lavados del filete de 12 minutos de duración. A su vez otra función del lavado aparte de la eliminación de la sangre es la eliminación de bacterias.

Recientemente algunos autores han estudiado que el método de desangrado no es un problema si se realiza un fileteado previo al rigor, se ha observado que se reduce considerablemente el volumen de sangre residual (Erikson *et al.*, 2010). Se ha

observado que con el fileteado en pre-rigor se obtienen filetes con mayor firmeza que con un fileteado en el rigor o en el post-rigor, esto es debido a que se evita la tensión muscular que puede causar una ruptura en las estructuras musculares afectando a la firmeza. Robb *et al.*, (2008) demostraron que un fileteado inmediato a la muerte no mejora el desangrado, este fenómeno también ha sido observado en pollos de engorde. Aún así, el fileteado previo al rigor tiene un importante inconveniente; el tiempo transcurrido hasta el rigor varía en gran medida según la especie por lo que en algunos casos es imposible debido al tiempo y al número de individuos a sacrificar. En los casos expuestos anteriormente se trata con peces como el salmón atlántico o la trucha arcoíris que tienen un tamaño considerable para su manejo y lo más importante su rigor es más rápido que otras especies como la dorada o la lubina.

4.3. Hemopigmentos

El color rojo de la carne se debe principalmente a los hemopigmentos: la hemoglobina y la mioglobina. Ambas hemoproteínas son proteínas sarcoplásmicas con una estructura globular, solubles en agua y en soluciones salinas diluidas (Ana y Francisco, 1998).

4.3.1. Hemoglobina

La hemoglobina (Hb) es un tetrámero con un peso molecular de 67.000 Da, integrada por dos polipéptidos o cadenas α con 141 aminoácidos cada uno, y dos cadenas β con 146 aminoácidos; el interior de cada monómero, al igual que la mioglobina, es hidrófobo, mientras que el exterior es hidrófilo (**figura 9**). Cada una de las cuatro

proteínas de la hemoglobina contiene su correspondiente grupo hemo planar, con un átomo de hierro en el centro, se unen entre ellas por puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos. La hemoglobina se encarga de transportar O_2 de las zonas de mayor presión (órgano respiratorio) a las de menor (capilares de los tejidos).

Cuando el grupo hemo se une a una molécula de O_2 la hemoglobina se transforma en oxihemoglobina (HbO_2). Tanto en la hemoglobina como en la oxihemoglobina el hierro permanece en estado ferroso (Fe_{+2} , estado reducido) Este proceso se llama oxigenación, es reversible y depende de la presión parcial del O_2 ; PO_2 : $Hb + 4O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)$. La reacción de asociación y disociación es muy rápida, de forma que, a pesar de que la Hb está empaquetada en los hematíes, el breve tiempo de paso de la sangre por los capilares permite que esos procesos cursen hasta la equilibración de acuerdo con la PO_2 correspondiente.

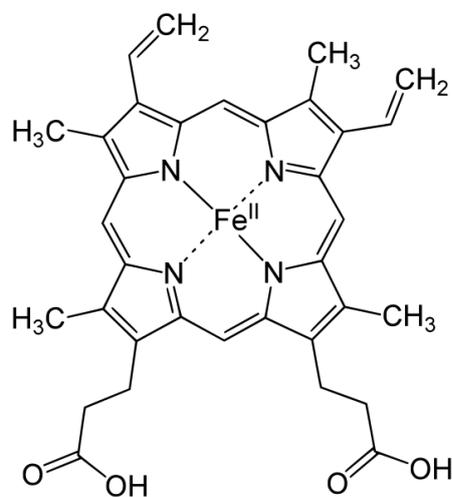


Figura 9: Estructura de la hemoglobina

4.3.2. Mioglobina

La mioglobina es responsable de almacenar el O₂ hasta que se consume por el metabolismo aeróbico. Forma alrededor del 20% de los pigmentos totales del músculo; está constituida por una parte proteínica, la apomioglobina o globina, y un grupo prostético hemo constituido por un centro de hierro, rodeado por cuatro pirroles que forman un anillo de porfirina. El hierro al ser un metal de transición, está coordinado con cuatro nitrógenos del anillo de porfirina y a un residuo de histidina de la globina, queda una sexta posición disponible para unirse con otro ligando de acuerdo con el grado de oxidación del hierro y ,por tanto, de esto depende el color que se produce. La fracción proteica, la globina, es incolora, con un peso molecular de aproximadamente 17800 Da, con 153 aminoácidos, 70% de los cuales establecen ocho zonas que tienen una estructura secundaria de hélice α alrededor del grupo hemo.

Desde el punto de vista de procesamiento de carnes, el pigmento más importante es la mioglobina, dado que la hemoglobina se elimina durante el desangrado de los animales en el proceso de sacrificio. En un músculo promedio, el 10% de hierro está en forma de mioglobina, mientras que después del sacrificio, es decir, una vez que ha sido desangrado el animal y por lo tanto eliminado la mayor parte del hierro en la hemoglobina, el 95% del hierro está presente como mioglobina.

Por otra parte, cuando el animal no es desangrado adecuadamente después del sacrificio o no es desangrado, una fracción de la hemoglobina de la sangre se difunde hacia el músculo; en estas condiciones contribuye al color y en ocasiones, puede representar hasta el 40% del total de los pigmentos de la carne. Además, el

desangrado ineficiente hace que la presión arterial de los vasos aumente, lo que provoca coágulos en el músculo, petequias.

4.3.3. Color en filetes

La pigmentación en el músculo varía en intensidad con la cantidad del pigmento y de tonalidad, según el grado de oxidación del grupo hemo dado por el ambiente gaseoso. La cantidad de mioglobina en el músculo depende del tipo de metabolismo que se lleva a cabo en un músculo en particular; glucolítico (movimientos lentos) en el cual son más abundantes las fibras blancas con poca mioglobina, u oxidativo (movimientos rápidos) con mayor abundancia de fibras rojas con más cantidad de mioglobina.

4.4. Métodos de cuantificación de la sangre residual

En este apartado se estudiara los diferentes métodos que han sido utilizados hasta la actualidad para cuantificar y detectar la sangre residual en los filetes. Hay que tener en cuenta que la mayoría de los compradores basan sus evaluaciones de la sangre residual en observaciones externas del producto, estas evaluaciones implican una mayor inexactitud, debido en parte a la acumulación de la sangre en el interior del filete por gravedad cuando se almacenan, siendo imposible su detección. Por lo que es necesario aplicar métodos de cuantificación de la sangre en el interior del filete.

4.4.1. Métodos visuales

El primero es la observación directa de las manchas de sangre residual en el filete, situadas sobre todo en la línea media y en el vientre. Principalmente se puede realizar de dos maneras; la primera es una observación directa del filete, generalmente los filetes de pescados sin desangrar tienen una coloración rojiza, mientras que en los pescados desangrados es blanquecina. El segundo se basa en colocar los filetes cortados en láminas de 5 mm sobre una superficie blanca bajo luz blanca de alta intensidad y se cuentan las manchas. Este procedimiento se puede realizar con la ayuda de una cámara digital, los puntos de observación son la línea media, el vientre y otras zonas (Roth *et al.*, 2007). En este método hay que tener en cuenta el tratamiento que ha tenido el filete, varios autores (Robb 2001; Roth *et al.*, 2009, 2005; Erikson *et al.*, 2010) afirman que en los peces tratados con el proceso industrial del ahumado se observa mejor las manchas de sangre residual, también, es aceptado la salazón.

Este método de cuantificación es el más aceptable y actualmente el más utilizado para el conteo de manchas de sangre (bloosspots) en Noruega (Erikson *et al.*, 2010), pero tiene dos principales problemas, al igual que la observación a simple vista del filete:

- La sangre capilar no puede ser cuantificada.
- En peces con coloración intensa, como el salmón Atlántico, cuesta identificar los puntos, siendo este método más eficaz en peces blancos, como la lubina.

Debido a esto se han buscado otros métodos para contar las manchas de sangre residual. Roth *et al.*, (2007) estimaron el número de manchas de sangre residual en rodaballo añadiendo un sistema informático que con la ayuda de una cámara digital

se toman fotos y se realizan varios barridos a la imagen (**figura 10**). A parte de detectar la sangre residual, con esta mejora se puede calcular el volumen de sangre total en el filete y el estado oxidativo de la sangre en función a la intensidad de la coloración de la sangre (a mayor tonalidad oscura mayor oxidación).

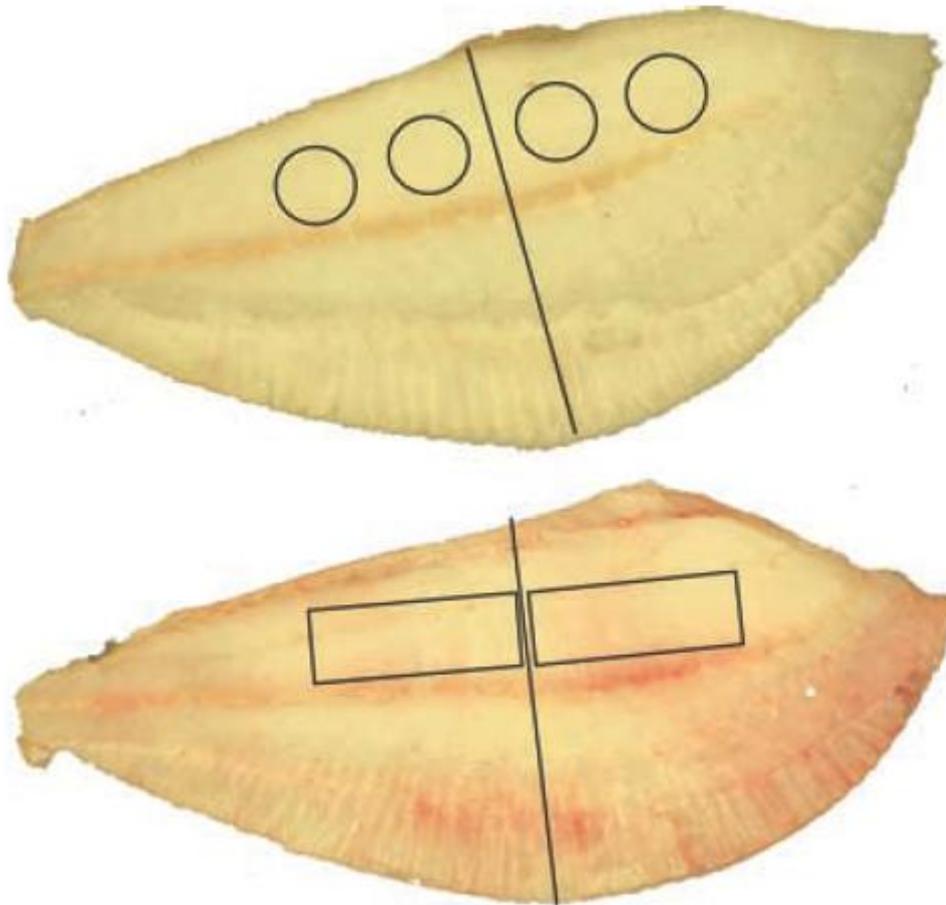


Figura 10: Filete desangrado (arriba y sin desangrar) (Roth, 2007)

A su vez Erikson *et al.*, (2010) cuantificaron y detectaron sangre residual en filetes de salmón Atlántico con un procedimiento de captación y segmentación de imágenes de la cavidad corporal abierta con un sistema similar de detección. El sistema de visión por ordenador se basa en la medición y la cuantificación del color del filete. Consiste en un sistema de visión artificial formado por iluminación controlada, una

cámara para la captura de las imágenes y una computadora. Tras ser capturadas las imágenes, son enviadas al equipo para el almacenamiento y posterior procesamiento. En el equipo también se almacena el software necesario para los ajustes de la cámara de control, con la cual se toman las imágenes, así como para el diseño de los algoritmos de software que permiten el procesamiento y el análisis de imágenes. El procesamiento de imágenes se fundamenta en una serie de operaciones que mejoran la calidad (eliminación de distorsiones, ruidos o iluminación desigual). Por lo general, el análisis de imágenes es el proceso de distinguir los objetos de interés desde el fondo, la extracción de información para la cuantificación de las propiedades del objeto seleccionado, como el color, o la clasificación de imágenes y objetos contenida en estas imágenes.

Otra variante del método de conteo visual es el uso de VIS/NIR, que se basa en la espectroscopia infrarroja. Este método tiene la capacidad de medir muestras sin ningún tratamiento previo, pero los resultados obtenidos no son satisfactorios, por lo que es un método que se ha dejado actualmente de lado (Olsen *et al.*, 2008).

También se puede utilizar el colorímetro de reflectancia. Este método se fundamenta en un espacio tridimensional con tres ejes o planos; plano de luminosidad, plano de rojo-verde y plano de amarillo-azul. El colorímetro se pasa por el filete y se obtiene tres valores, uno por cada plano; cuando tratamos el análisis de sangre residual se habla de filetes con valores de luminosidad alta (concentración baja o nula de sangre residual), valores de amarillo (concentración media de sangre residual en función a la tonalidad del amarillo) y valores rojos (concentración alta de sangre residual en función a la tonalidad del rojo).

Otro método visual es la espectroscopia transflectante. Este método se basa en la detección de manchas de melanina en la superficie de filete a través de la cuantificación y detección de la sangre residual (Erikson *et al.*, 2010).

4.4.2. Medición de la Hemoglobina

Para la determinación del contenido de hemoglobina se utiliza una modificación del método de determinación de hemo-pigmentos totales de Hornsey (1956). Se basa en la determinación del hierro hemo. Se extrae con un solvente orgánico (la acetona), una sal (clorhidrato de hematina) obtenida por la adición de ácido clorhídrico. La intensidad de la coloración se mide en el espectrofotómetro y se compara a una solución estándar de hematina. Hornsey (1956) informó que los picos de absorción de la hematina se observan en 512 y 640 nm. La astaxantina tiene su pico a 480 nm y puede interferir en el pico de 512 nm de la hematina. Cuando se mide la hematina a 640 nm, la absorbancia no se ve afectada por el contenido natural de astaxantina en el músculo. Se ha observado que el método químico de la hemoglobina es más preciso y sencillo que el contaje visual. También es seguro, repetible y rápido (Olsen *et al.*, 2008) en comparación a otras técnicas químicas cuyos productos químicos pueden afectar al filete como el cianuro, óxidos de carbono o nitrógeno.

5. La calidad del producto

El concepto de calidad del producto es bastante variable dependiendo de diferentes factores. Se puede hablar del precio, la disponibilidad, el valor nutritivo o la presentación, aún así para la mayoría de los mercados la frescura es considerada el

parámetro más importante, debido a esto se han buscado diferentes indicadores y metodologías para medirla.

5.1. Deterioro de la calidad del producto

El proceso de alteración del pescado fresco se inicia cuando se sacrifica e incluso antes de su extracción del agua. Estos procesos generan la pérdida de las características organolépticas de máxima frescura del pescado, y el deterioro finaliza cuando llega a un estado inadecuado para la alimentación humana, siendo el producto rechazado. Los cambios post-mortem que sufre el producto se pueden clasificar en cuatro; cambios sensoriales, cambios autolíticos, cambios bacteriológicos y oxidación lipídica.

5.2. Cambios sensoriales

Los primeros cambios sensoriales del pescado durante el almacenamiento están relacionados con la apariencia y la textura. El sabor característico de las especies normalmente se desarrolla durante los dos primeros días de almacenamiento en hielo.

El cambio más dramático es la aparición del rigor mortis. Inmediatamente después de la muerte del pescado el músculo está totalmente relajado, la textura flexible y elástica generalmente persiste durante algunas horas y posteriormente el músculo se contrae. Cuando se torna duro y rígido, todo el cuerpo se vuelve inflexible y se dice que el pescado está en rigor mortis. Esta condición generalmente se mantiene durante uno o más días y luego se resuelve el rigor. La resolución del rigor mortis hace que el músculo se relaje nuevamente y recupere la flexibilidad, pero no la elasticidad previa

al rigor. La proporción entre el comienzo y la resolución del rigor varía según la especie y es afectada por la temperatura, la manipulación, el tamaño y las condiciones físicas del pescado. Esto debe ser evitado, dado que las fuertes tensiones producidas por el rigor pueden causar "desgajamiento", es decir, debilitamiento del tejido conectivo y posterior ruptura del filete (Johansson, 2001).

Generalmente se acepta que el comienzo y la duración del rigor mortis resultan más rápido a mayor temperatura, pero se ha observado en ciertas especies tropicales el efecto opuesto de la temperatura, en relación con el comienzo del rigor. Resulta evidente que en estas especies el inicio del rigor se acelera a la temperatura de 0 °C en comparación con 10 °C, lo cual muestra buena correlación con la estimulación de los cambios bioquímicos a 0 °C (Iwamoto *et al.*, 1987). Sin embargo, una explicación para esto ha sido sugerida por Abe y Okuma (1991), quienes han demostrado que el comienzo del rigor mortis en la carpa depende de la diferencia entre la temperatura del mar y la temperatura de almacenamiento. Cuando esta diferencia es grande, el rigor se inicia a menor tiempo y viceversa.

El rigor mortis se inicia inmediatamente o poco después de la muerte, en el caso de peces hambrientos y cuyas reservas de glucógeno están agotadas, o en peces exhaustos. El método empleado para aturdir y sacrificar el pez también influye en el inicio del rigor. El aturdimiento y sacrificio por hipotermia (el pez es muerto en agua con hielo) permite obtener el más rápido inicio del rigor, mientras que un golpe en la cabeza proporciona una demora de hasta 18 horas.

El significado tecnológico del rigor mortis es de mayor importancia cuando el pescado es fileteado antes o durante el rigor. Durante el rigor el cuerpo del pescado está completamente rígido; el rendimiento del fileteado resulta muy bajo y una

manipulación tosca puede causar el desgarramiento de los filetes. Si los filetes son removidos del hueso antes del rigor, el músculo puede contraerse libremente y se encogerá al comenzar el rigor. El músculo rojo puede encogerse hasta un 52 % y el músculo blanco hasta un 15 % de su longitud original (Buttkus, 1963). Si el pescado es cocinado antes del rigor, la textura será muy suave y pastosa. Por el contrario, la textura es dura pero no seca cuando el pescado es cocinado durante el rigor. Posterior al rigor la carne se toma firme, succulenta y elástica.

5.3. Cambios autolíticos

Autólisis significa "auto-digestión". Se sabe desde hace muchos años que existen por lo menos dos tipos de deterioro en el pescado: bacteriano y enzimático. En algunas especies (calamar, arenque), los cambios enzimáticos preceden y por lo tanto predominan al deterioro del pescado refrigerado. En otros, la autólisis sumada al proceso microbiano, contribuye en diferentes grados a la pérdida general de la calidad. Los procesos autolíticos abarcan un amplio espectro de reacciones, aún así en este apartado trataremos las reacciones básicas que afectaran de manera directa a la calidad del músculo, más adelante en la explicación de las herramientas e indicadores que se utilizan para la determinación de la calidad se explicará otras reacciones autocatalíticas.

5.4. Efecto en la actividad muscular

La actividad de los músculos antes del sacrificio puede afectar a la calidad de los peces de dos formas: físicamente y bioquímicamente. Durante el hacinamiento los

peces nadan de forma vigorosa, golpeándose con otros peces y las paredes del tanque. Algunos métodos de sacrificio, como el aturdimiento eléctrico con 50 Hz, afecta de tal manera en la actividad muscular que se generan fuertes contracciones musculares produciendo rotura de vertebras y vasos capilares (Kestin *et al.*, 1995), disminuyendo el valor del producto.

Durante un tiempo después de la muerte se detiene la circulación de la sangre, las células musculares continúan respirando, primero con el oxígeno restante y después respiran de manera anaeróbica, produciendo ácido láctico, a través de la glucólisis, que disminuye el pH. Esto genera una caída del pH post-mortem. Cuando el pH alcanza un cierto nivel puede interferir con la síntesis de ATP, la fuente de energía para las células musculares, provocando el cese de estas vías químicas. Cuando las células musculares utilizan sus reservas restantes de ATP entran en rigor, lo que genera que los miofilamentos de actina y miosina no se deslicen una sobre la otra. A medida que más células entran en rigor el cuerpo del pez se vuelve más rígido. Si un pez muere después de la actividad muscular de las células, las cuales contienen un cierto nivel de ácido láctico a partir de su respiración anaeróbica anterior, el nivel de pH impide la síntesis de ATP y por lo tanto el rigor se acelera (Korhonen *et al.*, 1990).

La fuerza del rigor tiene un impacto directo en la calidad del filete, los peces que tienen un alto grado de actividad previa al sacrificio muestran un alto grado de desgajamiento. El desgajamiento ocurre cuando los miomeros se separan del miosepto, esto causa un daño importante en el filete, volviéndose poco apetecible para el consumidor, además este fenómeno genera que el procesamiento del filete sea más difícil. El desgajamiento es un serio problema en el tratamiento de filetes de salmón Atlántico. Puede ser el resultado de la aplicación de una gran fuerza de

contracción sobre el tejido conectivo en el miosepto de una alta proporción de fibras musculares durante el rigor (Johansson, 2001). La fuerza de la fibra muscular está directamente afectada por el grado de actividad de los músculos antes del sacrificio. El desgajamiento se expresa particularmente en una disminución de la fractura y la dureza del filete, como indicaron Caballero *et al.*, (2009) la adhesividad en dorada disminuyó hasta los 14 días de conservación en hielo.

El color del filete también se ve afectado por la rápida caída del pH del músculo tras el sacrificio. Se ha observado en salmónidos que han sufrido una alta actividad antes del sacrificio muestran cambios significativos en la coloración del filete (Robb, 2001). La disminución post mortem en el pH del músculo tiene un efecto en las propiedades físicas del músculo. A medida que el pH disminuye, se reduce la carga neta de la superficie de las proteínas musculares, causando su desnaturalización parcial y disminuyendo su capacidad de enlazar agua. El músculo en estado de rigor mortis pierde su humedad cuando es cocinado y resulta particularmente inadecuado para un procesamiento posterior que involucre calentamiento, puesto que la desnaturalización por calor incrementa la pérdida de agua.

5.5. Cambios bacteriológicos

El músculo de un pez saludable o de un pescado recién capturado es estéril, debido a que el sistema inmunológico del pez previene el crecimiento de bacterias en el músculo. Cuando el pez muere, el sistema inmunológico se colapsa y las bacterias proliferan libremente. En la superficie de la piel las bacterias colonizan una amplia extensión la base de las escamas. Durante el almacenamiento, las bacterias invaden el músculo penetrando entre las fibras musculares. Sólo un número muy limitado de

bacterias invade el músculo durante el almacenamiento en hielo. Las bacterias pueden ser detectadas en el músculo cuando el número de microorganismos en la superficie de la piel incrementa por encima de las 10^6 ufc/cm². Este resultado fue observado tanto en el almacenamiento en hielo como en ambiente refrigerado (Dalgaard, 1995). No se encontraron diferencias entre los patrones invasivos de las bacterias específicas del deterioro (por ejemplo *S. putrefaciens*) y las bacterias no específicas del deterioro. Dado que sólo un número limitado de microorganismos realmente invade el músculo y el crecimiento microbiano se lleva a cabo principalmente en la superficie, el deterioro es probablemente una consecuencia de la difusión de enzimas bacterianas hacia el interior del músculo y de la difusión externa de nutrientes (Dalgaard, 1995).

Las bacterias presentes en pescados capturados en aguas templadas, entran en fase exponencial de crecimiento casi inmediatamente después de la muerte del pez. Esto también ocurre cuando el pescado es colocado en hielo, probablemente porque la microflora se encuentra adaptada a las temperaturas de enfriamiento. Durante el almacenamiento en hielo, la población bacteriana se duplica en aproximadamente 1 día y después de 2 o 3 semanas alcanza unas 10^8 - 10^9 ufc, por gramo de músculo o cm de piel. Durante el almacenamiento a temperatura ambiente, se alcanza un nivel ligeramente inferior a las 10^8 - 10^9 ufc/g en 24 horas. Las bacterias presentes en pescados provenientes de aguas tropicales generalmente pasan por una fase de latencia de 1 a 2 semanas, cuando el pescado se almacena en hielo, y posteriormente se inicia el crecimiento exponencial. Durante el deterioro, el nivel de bacterias en pescados de aguas tropicales es similar al nivel encontrado en especies de aguas templadas (Gram *et al.*, 1990).

La composición de la microflora también cambia dramáticamente durante el almacenamiento. De esta forma, después de 1 - 2 semanas de almacenamiento aeróbico en hielo, la flora está constituida casi exclusivamente por *Pseudomonas* spp. y *S. putrefaciens*. A temperatura ambiente (25 °C), la microflora en el punto de deterioro está dominada por Vibrionáceas mesofílicas y, particularmente si el pescado proviene de aguas contaminadas, por Enterobacteriáceas (Sankar *et al.*, 2003; Paleologos *et al.*, 2004; Hozbor, *et al.*, 2006)

5.6. Oxidación de los lípidos

Otro proceso que se genera durante el procesamiento y el almacenamiento del filete es la oxidación de los lípidos, con un impacto importante en la calidad del filete. La oxidación lipídica es un proceso autocatalítico en cadena que se divide en cuatro pasos; iniciación, propagación, ramificación en cadena y terminación (Hultin, 1992). En peces la iniciación se lleva a cabo por enzimas, la formación de radicales alcalinos y radicales de peróxidos propagan la reacción de oxidación. El primer producto estable de la oxidación es el inodoro e insípido hidroperóxido (LOOH), o producto primario de oxidación. En la ramificación en cadena, estos productos se rompen en radicales y productos secundarios como los aldehídos y las cetonas, estos productos secundarios son los responsables del sabor a rancio del pescado. Algunos de estos productos pueden contener grupos aminoácidos libres, los cuales afectan al color y textura del pescado (Aubourg *et al.*, 1997). En paralelo a estos tres pasos las reacciones de terminación van teniendo lugar, estas se basan en la formación de especies radicales no libres por la interacción entre dos radicales libres.

La oxidación de los lípidos, generalmente de ácidos grasos poliinsaturados, varía entre las diferentes partes del pez. La inestabilidad en la cola fue atribuida a la alta proporción de músculo rojo. Diferentes estudios (Yamaguchi *et al.*, 1984) compararon el grado de oxidación de la piel, el músculo blanco y el rojo, obteniendo los valores más bajos en el músculo blanco debido a su bajo contenido de pro-oxidantes. Los compuestos considerados como factores críticos para la oxidación en la piel son el alto contenido de lípidos (Yamaguchi *et al.*, 1984), los metales traza y la presencia de lipogenasas. En el músculo rojo son la abundancia de hemoproteínas, metales de bajo peso molecular y enzimas microsomales (Undeland, 2001). En arenque (*Clupea harengus*) si se estudiaba los tres tejidos por separado, los hidroperóxidos se formaban en el orden músculo rojo, piel y músculo blanco, pero si se estudiaba el conjunto se obtenía el orden piel, músculo rojo y músculo blanco. Esto es debido a que primero se oxida la piel que está en contacto con la atmósfera, aún siendo más susceptible a oxidarse el músculo rojo. En la oxidación lipídica hay que tener en cuenta el grado de difusión del oxígeno, este también es un factor de limitación del efecto de la oxidación en los diferentes tejidos. El oxígeno se difunde entre 1 y 4 mm en el tejido muscular, dependiendo del contenido mitocondrial y del grado de disrupción del tejido (Undeland, 2001).

Para aumentar la estabilidad en el almacenamiento del pescado graso, diversas investigaciones han indicado que durante el almacenamiento en hielo hay que prestar atención no sólo a la proliferación de bacterias, sino también al desarrollo de la oxidación lipídica. Existen tres puntos críticos en el pre-procesamiento de los períodos de almacenamiento en hielo; entre la cosecha y la evisceración/fileteado, entre la evisceración y el fileteado, y entre el procesado y el congelado. El primero debe ser lo suficientemente largo para permitir que la sangre coagule, mientras que el

segundo no debe exceder dos días para reducir al mínimo los cambios pro-oxidativos y evitar la aparición del olor rancio. Para proteger los tejidos sensibles situados debajo de la piel, la piel se debe mantener el mayor tiempo posible durante el almacenamiento, o debe ser eliminada junto con los tejidos subyacentes en una etapa temprana (Undeland, 2001).

5.7. Herramientas para la determinación de la calidad del filete

Los métodos para determinar la calidad del producto deben ser rápidos, fiables, coincidentes con la apreciación sensorial y, preferiblemente, aplicables a la totalidad o mayoría de los productos de origen marino. Generalmente los métodos para determinar la frescura, es decir la vida útil del producto, se dividen en cuatro; métodos sensoriales, métodos físicos, métodos químicos y métodos microbiológicos.

5.7.1. Métodos sensoriales

El análisis sensorial es el primer contacto con el producto, el cual se puede valores de dos formas; en crudo y cocinado. En gran medida el método sensorial se ha basado en la valoración del producto cocinado a través de paneles de cata, aún así la valoración del producto en crudo es más fácil y rápida de realizar por los comerciantes.

5.7.1.1. Método QIM (Quality Index Method)

Este método es cada vez más usado en los últimos 10 años en el que le hacen referencia. Es el método para determinar la frescura del pescado crudo que utilizan los servicios de inspección y la industria pesquera-es el análisis sensorial en la Unión Europea (Decisión del Consejo de la UE no. 103/76, Enero de 1976). La metodología es sencilla, se hace una valoración externa del pescado, puntuando entre 0 y 4 varios atributos (ojos, aleta, branquias...), entre más baja sea la puntuación más fresco es el pescado (Huidobro *et al.*, 2000). Para el análisis nos podemos ayudar de fotos y descripciones estándar. Los parámetros se seleccionan de manera que la evolución de estos se relacionan linealmente con el tiempo de almacenamiento en hielo hasta el final de la vida útil del producto, proporcionando así un medio para predecir la vida útil. Este método tiene una serie de ventajas, entre ellas es que es específico para cada especie y describe de forma precisa los cambios durante el almacenamiento, siendo de gran ayuda para los comerciantes debido a la facilidad de su uso.

Knowles *et al.*, (2007) obtuvieron valores de QIM positivos en la aplicación del aturdimiento eléctrico en lubina. A su vez comparo este tipo de aturdimiento con el aturdimiento con hielo obteniendo valores similares hasta el día 10 post-mortem. Tejada *et al.*, (2006) aplicaron el método QIM para determinar las características sensoriales de lubinas y doradas almacenadas en hielo. El único inconveniente es que se requiere de un panel de asesores entrenados.

5.7.2. Métodos físicos

Los métodos físicos generalmente son sencillos y de fácil aplicación. Aún así tienen un gran problema, la información obtenida con estos métodos es a menudo limitada,

por lo que se utilizan como complementos a otras técnicas, y muchas veces son destructivos. Los principales métodos físicos son:

5.7.2.1. TPA (Texture Profile Analysis)

Durante las últimas décadas se han utilizado diferentes instrumentos para determinar las propiedades de la textura en animales. Carbonell *et al.*, (2003) revisaron la aplicación de diferentes métodos sensoriales alternativos para la determinación de la calidad en peces.

Ginés *et al.* (2002) obtuvieron una disminución de la dureza en pez entero en torno al 15 % antes de los 11 días de conservación en hielo en dorada. Carbonell *et al.*, (2003) estudiaron los cambios en la dorada indicando que la dureza y los parámetros derivados, la masticabilidad y la interacción entre pescado fresco y congelado no disminuyeron significativamente en el tiempo. El efecto de la temperatura sobre el rigor no es uniforme. Sigurgisladottir *et al.*, (1999) estudiaron las diferencias en las propiedades texturales del salmón Atlántico de diferentes orígenes; jaulas, tanques y en granjas oceánicas. Descubrieron que los peces procedentes de granjas oceánicas tienen una mayor fuerza de corte que los procedentes de tanques y jaulas, entre los dos últimos no hubo diferencias significativas.

Diferentes métodos de perforación han sido utilizados para medir la fuerza en filetes de pescado. Ando *et al.*, (1991) evaluaron la perforación en filete de pescado simulando la mordida de un molar con un cilindro metálico de 8 mm de diámetro. La fuerza máxima que se registró después perforar en músculo de pescado en paralelo a la orientación de las fibras musculares se registró como la resistencia a la rotura. La evaluación de la resistencia muscular medida mostró una buena correlación con la

resistencia a la rotura. Periago et al., (2005) estudiaron diferentes parámetros texturales, incluyendo la comprensión, para comparar la calidad del filete en lubina cultivada y salvaje, siendo más altos en individuos cultivados. Según los trabajos de la textura desarrollados por Ayala et al. (2010), todos los parámetros, excepto la elasticidad, cambiaron con el tiempo de almacenamiento del pescado, disminuyendo significativamente la mayoría de ellos en el día 5.

5.7.2.2. pH

Es un método rápido que se puede aplicar in situ, pero como la mayoría de los métodos físicos es destructivo. La medición del pH debido a la acumulación del ácido láctico es considerada un buen método para determinar la calidad del filete en el progreso de la etapa de post-mortem. La reducción del pH muscular se debe a la generación de iones H⁺ asociados a la producción de ácido láctico y a la caída de las reservas de ATP (Poli *et al.*, 2005). Esto genera una degradación de la calidad del filete. (Iwamoto *et al.*, 1987). El pH del pescado fresco está alrededor de 6,5 en diferentes especies y tiende a disminuir tras el sacrificio. La determinación se realiza directamente con un pH-metro en el pescado, en caso de que no se logre la homogeneidad o de tratarse de una muestra excesivamente seca se recomienda hacer una dilución con agua destilada. Los peces aturdidos con CO₂ muestran un descenso más brusco del pH que los peces asfixiados con hielo. Acerete *et al.*, (2009) obtuvieron valores de pH similares comparando el aturdimiento y sacrificio con narcosis de CO₂ y hielo (agua más hielo) en lubina. Knowles *et al.*, (2007) obtuvo un incremento del pH en lubina a las 4 horas post-mortem aplicando aturdimiento eléctrico. Lamboij *et al.*, (2008) también obtuvo picos altos en las primeras 4 horas

post-mortem aplicando el aturdimiento eléctrico en lubina. Periago *et al.*, (2005) estudiaron el pH para comparar la calidad del filete en lubina cultivada y salvaje, siendo los valores similares entre los dos grupos. Tejada *et al.*, (2006) analizaron el pH para determinar las características sensoriales de lubinas y doradas almacenadas en hielo.

5.7.3. Métodos químicos

Los métodos químicos se caracterizan por ser fiables y seguros frente a otros métodos como los físicos. Con estos métodos se puede analizar una sola sustancia o varias a la vez, el mayor problema es su alto coste y la necesidad en muchos casos de personal cualificado. Estos métodos pueden ser de aplicación específica (una sola especie) o de general (varias especies). Entre los métodos químicos, algunos están más ligados al deterioro del filete, como las concentraciones de aminas, amoníaco, trimetilamina, dimetilamina, y los compuestos de la peroxidación lipídica.

5.7.3.1. TBARs

La determinación de los TBARs (sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico) es un método químico basado en los cambios que sufre la fracción lipídica. Este método tiene dos fases; primero se mide el índice de peróxidos, que es útil para seguir la evolución del proceso a lo largo del tiempo. Los peróxidos pueden reaccionar produciendo una gran variedad de compuestos, algunos de los cuales son responsables de los olores y sabores rancios en los pescados grasos y de olores y sabores de almacenamiento en el pescado blanco. Connell (1995) indicó que valores superiores a 10-20 (las unidades son ml de tiosulfato de sodio 0,002 N requeridos para valorar el yodo liberado por 1 g de grasa extraída del pescado) indican que el

pescado probablemente huelga o tenga gusto a rancio, valores inferiores pueden ser indicativos tanto de un bajo grado de rancidez como de estados muy avanzados de deterioro. Uno de estos compuestos, llamado malonaldehído, y una serie de compuestos relacionados se puede extraer del músculo del pescado ya sea por destilación o mediante la preparación de un extracto libre de proteína. En la segunda etapa la reacción de estos compuestos con ácido 2-tiobarbitúrico da lugar a productos de color que se miden con un espectrofotómetro. El aumento en el valor TBA es una medida del grado de deterioro oxidativo en el pescado azul, pero, como en el caso de los peróxidos, del índice del TBA puede caer de nuevo, en una fase posterior de deterioro. Valores de TBA superiores a 1-2 (micromoles de malonaldehído presente en 1 g de grasa) son indicativos de rancidez organoléptica.

5.7.4. Métodos microbiológicos

Los métodos microbiológicos se basan en el recuento de microorganismos en el pescado. La actividad de los microorganismos es el principal factor que limita la durabilidad del pescado fresco, reduciendo la vida útil del producto (Dalgaard *et al.*, 1993). El método más común es la medición de microorganismos específicos del deterioro (MED); el método es rápido, generalmente se realizan medidas indirectas de tipo fisicoquímico como la bioluminiscencia, la radiometría, turbidimetría..., el principal inconveniente es el tiempo, se debe realizar entre 24 horas y 3 días. Los microorganismos que son principalmente utilizados son las bacterias *Shewanella putrefaciens* y la *Photobacterium phosphoreum*.

La *Shewanella putrefaciens*. es una bacteria psicrófila Gram negativa de aguas templadas, que ha sido identificada como la bacteria específica del deterioro del

pescado de aguas templadas almacenado aeróbicamente en hielo, produciendo sulfhídrico en condiciones anaeróbicas (Dalgaard *et al.*, 1993). Se ha estudiado la participación de la *S. putrefaciens* en la reducción del óxido de Trimetilamina (OTMA); durante el crecimiento aeróbico, la *S. putrefaciens* emplea el ciclo de Krebs para producir los electrones que posteriormente son canalizados a través de la cadena respiratoria. La *S. putrefaciens* puede emplear una variedad de fuentes de carbono como sustrato en su respiración anaeróbica dependiente de OTMA, incluyendo formato y lactato.

Las bacterias se miden por unidad de colonia formadora (ufc). Se ha observado que si el pescado en hielo es almacenado en condiciones de anaerobiosis o en una atmósfera de CO₂, el número normal de la *S. putrefaciens* y *Pseudomonas*, es generalmente mucho menor (10^6 - 10^7 ufc/g) que en pescado almacenado en condiciones de aerobiosis. (Dalgaard *et al.*, 1993).

La *Shewanella putrefaciens* supone en torno al 1% de la microflora en los primeros días de conservación del pescado, pero al final de su etapa es casi el 90%. En lubina (*Dicentrarchus labrax*) se observó que su concentración es baja, $0,5-1 \log 10^{-1}$, durante los primeros días aumentando a más de $\log 10^{-7}$ a partir de los 13 días (Poli *et al.*, 2004; Taliadourou *et al.*, 2003). También, en jurel (*Trachurus picturatus*) y jurel mediterráneo (*Trachurus mediterraneus*) se determinó *Shewanella putrefaciens* a partir del primer día (Z. Trikas *et al.*, 2007). Al contrario en otras especies como el carbonero (*Pollachius virens*) y el eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) no se observó presencia hasta los 13-14 días de conservación en hielo (Karl y Meyer, 2007).

6. Objetivos

A la vista de lo anterior, los objetivos que se buscan en el desarrollo de este trabajo son los siguientes:

- Obtener un sistema de aturdimiento basado en la combinación de concentración de CO₂ y temperatura óptima para la lubina (*Dicentrarchus labrax*) sin afectar al bienestar de esta.
- Establecer una metodología fundamentada en la observación visual, medición del color y de la hemoglobina residual en el músculo como métodos para valorar el desangrado eficaz en la lubina.
- Identificar y diferenciar los posibles efectos del aturdimiento y el desangrado en la calidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Experimento n°1: Aturdimiento con combinación de CO₂ y frío

Para obtener un aturdimiento que no afectará al bienestar y a la posterior calidad del producto se diseñaron y establecieron diversas pruebas con la premisa de la combinación de CO₂ y agua fría como método de aturdimiento. Los límites establecidos de los dos parámetros fueron; temperaturas de 4°C, 7°C y 11°C, y concentraciones de 25±5 mg CO₂/ L, 47±5 mg CO₂/ L, 70±5 mg CO₂/ L por cada temperatura. Estos valores de temperatura y CO₂ han sido elegidos ya que las temperaturas letales para esta especie están entre 2-3°C y 30-32° C (Pickett y Pawson, 1994), mientras que la dosis letal de CO₂ está entre 115±2,9 y 104,8±5,1 mg /L (Grottum y Sigholt, 1996). Para ello se acondicionó un acuario con unas dimensiones 48 cm x 37 cm x 117 cm; se añadió una bomba conectada a un refrigerador con el cual se controló la temperatura del agua del acuario a través de un sistema cerrado, también se colocó una rejilla para separar los sensores y la bomba de los peces, la zona en la que estuvieron los peces fue tapada con una bolsa negra para evitar el efecto intenso de la luz, con lo que la lubina se sintiera protegida. Se colocaron sensores de O₂ y CO₂, así como un pH-metro para anotar todos los datos necesarios, además de una bombona de CO₂ como fuente de CO₂.

Como material animal se utilizaron lubinas de 301,6 gr de peso medio y 28,5 cm de longitud media, provenientes de las jaulas de la empresa ADSA y aclimatadas en las instalaciones del ICCM antes de la realización de los experimentos. Se dividieron en grupos de 6 lubinas por cada temperatura y concentración de CO₂, siendo las. Para la determinación de la eficacia de las diferentes concentraciones y temperaturas como

método de aturdimiento y su efecto en el bienestar del animal se realizaron grabaciones de 10 minutos, sobre las cuales se realizó un análisis visual con un paquete informático (Corel VideoStudio Pro x4) para establecer los tiempos de pérdida de consciencia, el cambio en el equilibrio, la frecuencia opercular y el grado de agresividad. Además, se tomaron medidas del pH y O₂ (mg/L) durante toda la experiencia. Previo a la introducción al acuario los peces fueron aclimatados en tanques auxiliares de 200 L. Los indicadores utilizados para determinar el efecto del aturdimiento y el bienestar animal fueron;

1.1. VERS

Para la medida de las VERs se aplicó un flash de luz con una linterna de luz blanca directamente sobre los ojos del pez. En función a la respuesta se pudieron clasificar tres estados o fases;

- Respuesta ocular a la luz → pez consciente
- Respuesta ocular anormal a la luz → pez semiconsciente
- No hay respuesta ocular a la luz → pez inconsciente

1.2. Frecuencia opercular (FO)

Para la medición de la FO se realizaron medidas en individuos en estado normal (sin estrés) en el tanque auxiliar, y en individuos aturdidos a los 10 minutos de permanencia en el acuario (tiempo máximo del experimento por grupo). Para la medición se contó el movimiento opercular durante 20 seg en cada uno de los 6 peces de cada grupo.

1.3. Equilibrio y manipulación

El estudio del equilibrio consistió en anotar en qué tiempo de exposición (en función a cada temperatura y concentración de CO₂) el pez sufrió un cambio en el equilibrio, en general este parámetro se basó en un cambio de natación normal a lateral (**figura 11**). Con respecto a la manipulación, consistió en si existía respuesta al aplicar presión en el pedúnculo caudal una vez el pez quedaba inmovilizado en el fondo del acuario (**figura 12**) anotándose el tiempo.



Figura 11. Ejemplo de pérdida de equilibrio (Fuente propia)



Figura 12: Ejemplo de inmovilización previa a la manipulación (Fuente propia)

1.4. Agresividad

Para la medición de la agresividad se establecieron 5 grados;

- Grado 0; natación normal
- Grado 1; choques contra el cristal
- Grado 2; natación rápida
- Grado 3; natación invertida y acelerada
- Grado 4; natación acelerada y brusca, con intentos de salto

2. Experimento nº 2: Medición de sangre residual en filete

En este experimento se buscó la forma establecer la observación visual y la medición de la hemoglobina residual en el músculo como métodos para valorar el desangrado eficaz en la lubina. Se utilizaron como material animal 54 lubinas del experimento 1 divididas en tres grupos de 18 peces cada uno; grupo control G1 (sin desangrar y sin aturdir), G2 (aturdidos y sin desangrar) y G3 (aturdidos y desangrados). Los peces

del G2 y G3 fueron aturdidos de acuerdo al sistema de aturdimiento aplicado en el experimento 1, exactamente con 4°C de temperatura y 47 mg CO₂/ L. Para el desangrado del grupo 3, se realizó un corte de los cuatro arcos branquiales. Se realizaron fotos tanto del pez entero como del filete en tandas de 6 pescados por cada grupo durante los días 0, 4 y 11 de almacenamiento en hielo. Esta observación visual se complementó con la medición del color tanto del pescado entero como de los filetes. Por otro lado, se realizó la medición de la hemoglobina en el día 0 de cada grupo.

2.1. Observación visual

Se comparó el aspecto visual de los tres grupos para valorar la presencia de sangre residual, y por tanto la eficacia del desangrado. Para ello se realizaron fotografías del pescado entero y del filete sobre una superficie blanca bajo una lámpara de luz blanca, una vez hechas se realizó una descripción de cada grupo. Para el pescado entero se describió si existían petequias en la zona opercular y ventral (**figura 13**). Con respecto al filete se estableció una escala en función al color; muy rojizos y oscuros (grado 3), ligeramente oscuros (grado 2) y blanquecinos (grado 1). (**figura14**).

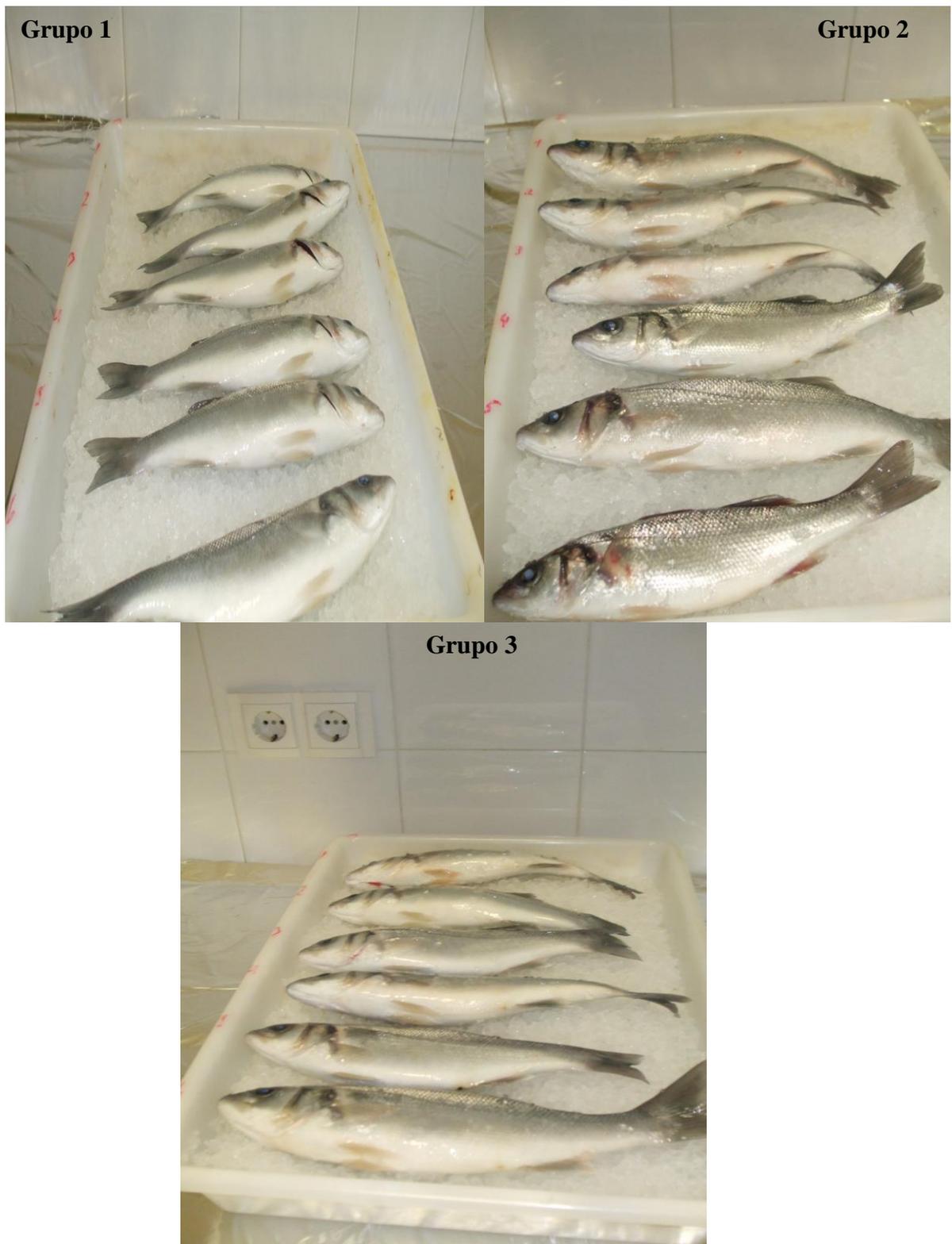


Figura 13: Comparación del color del pescado entero del día 0 de los tres grupos (Fuente propia)

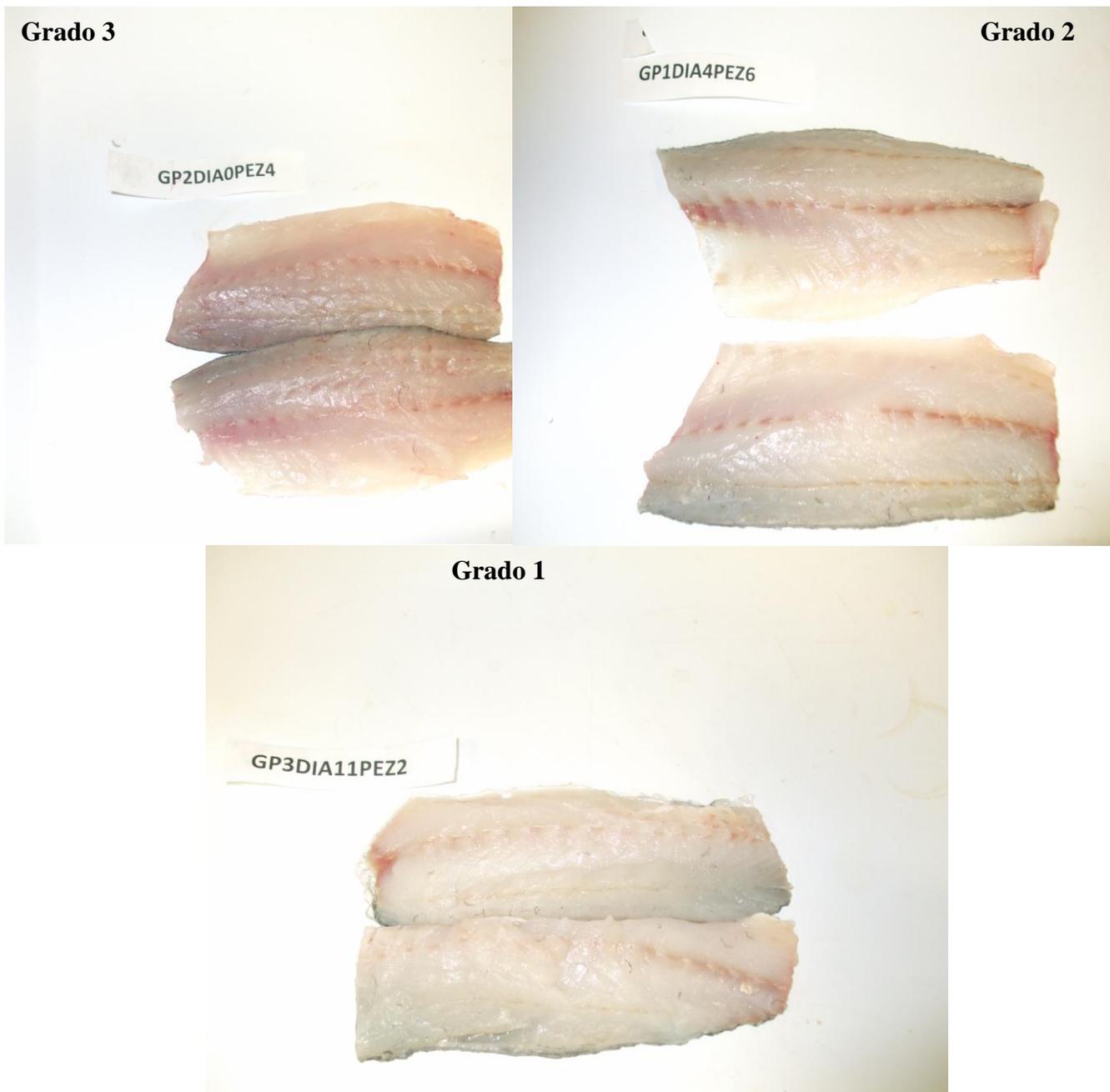


Figura 14: Escala en función al color; muy rojizos y oscuros, ligeramente oscuros y blanquecinos (Fuente propia)

2.2. Medición del color

La medición del color se realizó en dos partes, una primera de la piel del pescado y otra del filete. Se utilizó un colorímetro (Minolta CR-200), determinando el espacio de color definido por la norma CIE (Commission International d'Eclairage, 1976) en tres planos; el plano cromático de coordenadas a^* (valores positivos corresponden a tonos rojos y negativos a verdes), el plano cromático de coordenadas b^* (valores positivos tonos amarillos y negativos azules), y el plano L^* (luminosidad). Hay que tener en cuenta y recordar como se dijo en el apartado 4.4.1 que cuando se trata del análisis de sangre residual se habla de filetes con valores de luminosidad alto (concentración baja o nula de sangre residual), valores de amarillo (concentración media de sangre residual en función a la tonalidad del amarillo) y valores rojos (concentración alta de sangre residual en función a la tonalidad del rojo). Se tomaron mediciones en la zona opercular, entre las aletas ventrales y la zona dorsal del tercio posterior por duplicado. Con respecto a los filetes se midió la zona anterior (cerca del opérculo) y la zona posterior (pedúnculo).

2.3. Medición de hemoglobina

La medición de la hemoglobina se realizó siguiendo la modificación de Olsen *et al.*, (2008) de la técnica de determinación de hemo-pigmentos totales de Horsney (1956). Se tomaron dos réplicas de 7,5 g de cada muestra (preferiblemente de la zona anterior y posterior) y se homogenizaron, colocándose en tubos de centrifuga dejándose durante 24 h a -80°C . Tras las 24 h las muestras se liofilizaron 24 h, una vez liofilizadas se volvieron a homogenizar. A continuación se preparó el reactivo de acetona, el cual estaba formado por 80% de acetona, 18% de agua des ionizada y 2% de ácido clorhídrico (37% HCl), y se añadió 12,5 ml de reactivo a cada muestra. La

mezcla se agitó en un vortex durante 1 min, y se mantuvo en el frigorífico durante 3h a 4°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 15 min a 2.500 G (Centrifuge Eppendorf 5804R). La fase líquida obtenida (aprox. 1,5 ml) se pasó a un eppendorf y se volvió a centrifugar durante 15 min a 10.000 G (Centrifuge Sigma 4K15). Por último, se midió la densidad óptica del sobrenadante realizando dos lecturas de cada muestra en el espectrofotómetro (Fotómetro UV-Visible Evolution 300, Termo Scientific) a 512 nm. El resultado se comparó con una curva de hemoglobina bovina (Sigma-Aldrich). La concentración de hemoglobina se calculó con la fórmula:

$$\text{Hemoglobina mg/ g de músculo (peso seco)} = \frac{[(\text{ODmuestra} - \text{ODblanco}) / \text{pendiente}]}{\text{gr muestra}}$$

Donde OD es densidad óptica.

Para la obtención de la curva de hemoglobina se tomó un mix de músculo de 250 g y se homogenizó. Tras la homogenización se realizaron 8 muestras por duplicado de 7,5 g del mix inicial, dejándose durante 24 h a -80°C. Tras las 24 h las muestras se liofilizaron durante 24 h, una vez liofilizadas las muestras se homogenizaron. Se les inoculó hemoglobina bovina en una serie de 8 diluciones de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 mg, y se añadió 12,5 ml de reactivo de acetona previamente preparado. Se continuó con el mismo procedimiento aplicado a las muestras.

3. Experimento n°3: Comparación de la calidad entre individuos desangrados y aturridos, aturridos y no desangrados y no aturridos

Para el análisis de la calidad se establecieron los mismos grupos que en el experimento anterior; grupo control G1 (sin desangrar y sin aturdir), G2 (aturridos y sin desangrar) y G3 (aturridos y desangrados). Los análisis se hicieron los días 0, 4 y 11 de almacenamiento en hielo. En cada día se aplicaron métodos sensoriales (QIM), métodos físicos (pH y textura), métodos químicos (TBARs) y métodos microbiológicos (determinación de la bacteria *S. putrefaciens*, bacteria específica del deterioro) para establecer la calidad de los filetes de cada grupo (G1, G2 y G3) y la comparación entre cada uno.

3.1. QIM (Quality Index Method)

A lo largo de cada día del muestreo se siguió el protocolo propuesto por Tejada y Huidobro (2006) modificado para la lubina. Con la ayuda de un panel de 5 jueces del Grupo de Investigación en Acuicultura, tanto investigadores como personal laboral se (**figura 15**) evaluaron los pescados a partir de 7 parámetros; apariencia (piel y mucosidad cutánea), carne (elasticidad), olor, ojos (cornea y forma), branquias (color y olor) (**figura 16**).

PARAMETROS	ATRIBUTOS	puntos	códigos de cada muestra						
Apariencia	Piel	Muy Brillante	0						
		Brillante	1						
		Apagada	2						
Carne	Mucosidad cutánea	Clara-transparente	0						
		Ligeramente turbia	1						
		Elasticidad	0						
Olor		Elástica	0						
		Marcada tras presión	1						
		Fresco	0						
		Neutro	1						
Ojo	Córnea	A pescado	2						
		Pasado/Agrio	3						
		Clara-traslúcida	0						
	Forma	Ligeramente opaca	1						
		Opaca / Con sangre	2						
		Convexo	0						
Branquias	Color	Plano	1						
		Cóncavo	2						
		Brillante / Rojo oscuro	0						
	Olor	Rojo parduzco	1						
		Fresco	0						
		Neutro	1						
Indice de calidad (0-15 puntos)		Suma total de puntos de demérito							

Figura 16: Ficha de puntuación de calidad para un QIM



Figura 15: Realización del método QIM por parte de algunos miembros del panel de jurados (Fuente propia)

Una vez completas se realizó una media de la puntuación de cada pez.

3.2. pH

Se realizó la medición del pH de todos los individuos con un pH-metro portátil (CRISON modelo 507) a nivel del pedúnculo caudal tras realizar el corte de la cola.

3.3. TPA (Texture Profile Analysis)

El análisis de textura se hizo tanto sobre filete como sobre el pescado entero con un texturómetro Stable Micro Systems TA.XT2 (Surrey, Inglaterra) a partir de un TPA (Texture Profile Analysis) (**figura 17**). Se trabajó siguiendo el protocolo de Ginés *et al.*, (2004); para el pescado entero, se utilizó una probeta de 25 mm de diámetro, a una velocidad de cruceta de 5 mm/s hasta deformar la pieza un total de 7 mm, comprimiéndola dos veces en un intervalo de 5 segundos. Para la preparación de la muestra se tomó un filete por individuo, al que tras retirar la piel, se dividió en dos piezas cuadradas (2,5 x 2,5 cm) mantenidas en frío hasta el análisis se utilizó para la compresión un plato de aluminio de 100 mm de diámetro, a una velocidad de 0,8 mm/s hasta deformar la pieza un 60%, comprimiéndola dos veces en un intervalo de 30 segundos. Los parámetros a calcular fueron: fracturabilidad, dureza, elasticidad, cohesividad, gomosidad, masticabilidad, adhesividad y resistencia.



Figura 17: Texturómetro Stable Micro Systems TA.XT2 (Surrey, Inglaterra) (Fuente propia)

3.4. TBARs

Para la determinación de los TBARs se siguió el protocolo descrito por Alvarez *et al.*, (1998). En primer lugar se pesaron 2 g de músculo blanco de cada pescado por duplicado a los que se le añadieron 4 ml de TCA al 10%. Se llevó al Ultraturrax hasta alcanzar una buena homogenización. Todas las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 min a 4°C (Centrifuge Sigma 4K15). Transcurrido este tiempo se filtró 2 ml de cada muestra y se pasaron a un tubo de plástico limpio a través de un filtro de papel añadiéndose 2 ml de TBA (éste se preparó pesando 0,5764 g de TBA para 200 ml, agitándose durante 1 hora y dejándose enfriar en la nevera), tras la filtración se tomaron 2 ml de la mezcla. También se preparó un blanco formado por 2 ml de TBA y 4 ml de TCA. A continuación se calentaron las muestras, incluido el blanco, durante 20 min a 90°C, pasado este tiempo se introdujeron rápidamente en hielo para cortar la reacción. Por último, se leyó la absorbancia de las muestras a 532 nm en un espectrofotómetro (Fotómetro UV-Visible Evolution 300, Termo Scientific).

3.5. Determinación de la bacteria *S. Putrefaciens*

En cada muestreo tras el fileteado se tomó una pequeña muestra de filete para realizar la determinación de la *S. putrefaciens*. Seleccionamos esta bacteria porque ha sido identificada como la bacteria específica del deterioro del pescado de aguas templadas almacenado aeróbicamente en hielo, produciendo sulfhídrico en condiciones anaeróbicas (Dalgaard *et al.*, 1993). El procedimiento a realizar fue el siguiente: se preparó el medio de cultivo de agar de hierro con tiosulfato de sodio y L-cisteína, para ello se tomaron 500 ml de agua miliQ y se le añadió agar de hierro en polvo y 0,2 g de L-cisteína, agitándose bien la mezcla. Tras esto se midió el pH para dejarlo en torno a 7,3 – 7,4. Una vez preparado el medio de cultivo se preparó una solución de peptona salina de 45 ml por muestra. Tras esto todo el material, incluyendo el medio de cultivo, la peptona y unos 400 ml de agua miliQ se autoclavaron a 121°C durante 30 min para su desinfección. Mientras se tomó 5 g de músculo de cada muestra y se introdujeron en una bolsa digestiva, añadiéndole solución de peptona (auto-clavada) homogeneizándose la mezcla durante 2 minutos. Con la dilución resultante se realizaron diluciones decimales por duplicado con el mismo diluyente (solución salina de peptona), todo este procedimiento se realizó en un medio esterilizado. Se tomó 1 ml de cada dilución y se dispersó en las placas de petri, y a continuación se añadió el medio de cultivo tibio y se esperó unos 15 min. Por último, se dejó incubar a 25 °C durante 3 días, transcurrido este tiempo se realizó el conteo de las colonias (puntos negros) pasándose a unidades formadoras de colonias log (UFC) / g (**figura 18**).



Figura 18: Colonias de *Shewanella putrefaciens* (fuente propia)

Todos los resultados fueron tratados con el paquete informático SPSS con una diferencia significativa $P < 0,05$.

Resultados

1. Experimento n°1: Aturdimiento con combinación de CO₂ y frío

1.1. Aturdimiento con 4°C de temperatura

En la **Tabla II** se presentan los resultados de aturdimiento obtenidos con 4°C de temperatura. Se pudo observar una disminución del tiempo de aturdimiento con respecto al aumento de la concentración de CO₂, exceptuando en el último rango de concentración donde se observó un aumento, debido al factor individual que afectó considerablemente al establecimiento de los límites de los parámetros. Con respecto a la FO la media inicial estuvo en torno a 20-25 mientras que la final a 10-14. A su vez, la agresividad permaneció baja, entre 0 y 1, en las dos primeras concentraciones, pero subió hasta alcanzar el grado 2 en la última concentración de CO₂. El tiempo de la pérdida del equilibrio también disminuyó con respecto al aumento de CO₂.

Tabla II. Tiempos de respuesta de los peces (mínimo y máximo para cada valor de pH, O₂ y CO₂) a la temperatura de 4 °C

Parámetros	pH, O ₂ y CO ₂ mg/L		
	(8,6) (9,6) (25)	(7,3) (9,5) (47)	(6,9) (9,3) (70)
Equilibrio (min)	2'40" – 5'03"	3'00" – 3'52"	2'08" - 2'52"
Manipulación (min)	6' - 8'	4' - 5'	5' - 7'
Agresividad (grado)	0-1	0-1	0-2

1.2. Aturdimiento con 7°C de temperatura

En la **Tabla III** se presentan los resultados de aturdimiento obtenidos con 7°C de temperatura. Se pudo observar una clara disminución del tiempo de aturdimiento con respecto al aumento de la concentración de CO₂, a su vez también un aumento de la agresividad, de 0 a 2. Con respecto a la FO la media inicial fue de 19-24 reduciéndose hasta 9-12 alcanzándose la inconsciencia. El tiempo de la pérdida del equilibrio también disminuyó con respecto al aumento de CO₂, siendo menor en la última concentración en comparación a los 4°C.

Tabla III. Tiempos de respuesta de los peces (mínimo y máximo para cada valor de pH, O₂ y CO₂) a la temperatura de 7 °C

Parámetros	pH, O ₂ y CO ₂ mg/L		
	(8,1) (8,7) (25)	(7,7) (8,6) (47)	(7,3) (8,3) (70)
Equilibrio (min)	5'00" – 6'58"	3'40" – 6'30"	1'50- 2'40
Manipulación (min)	5' - 9'	4' - 9'	4' -7'
Agresividad (grado)	0-1	0-1	0-2

1.3. Aturdimiento con 11°C de temperatura

En la **Tabla IV** se presentan los resultados de aturdimiento obtenidos con 11°C de temperatura. La evolución del comportamiento de los peces a 11°C fue similar que en los dos casos anteriores; hubo una disminución del tiempo de aturdimiento con el progresivo aumento de la concentración de CO₂, así como un aumento de la agresividad de 0 a 2. Con respecto a la FO la media inicial fue 19-25 reduciéndose hasta 14-15 alcanzándose la inconsciencia. El tiempo de la pérdida del equilibrio también disminuyó con respecto al aumento de CO₂.

Tabla IV. Tiempos de respuesta de los peces (mínimo y máximo para cada valor de pH, O₂ y CO₂) a la temperatura de 11 °C

Parámetros	pH, O ₂ y CO ₂ mg/L		
	(7,3) (7,5) (25)	(7,7) (7,7) (47)	(7,3) (7,6) (70)
Equilibrio (min)	3'00" – 5'00"	2'54" – 4'40"	2'07"-4'00"
Manipulación (min)	5' - 9'	4' - 9'	4' - 7'
Agresividad (grado)	0-1	0-1	0-2

Los resultados obtenidos de las VERs para las concentraciones de 25, 47 y 70 mg CO₂/L se muestran respectivamente en las **figuras 19, 20 y 21**. A los 4°C en las concentraciones 25 y 47 mg CO₂/L todos los peces quedaron inconscientes, no mostraron respuesta visual evocada, transcurridos 8 y 5 minutos respectivamente. Mientras, que en la concentración de 70 mg CO₂/L dos peces quedaron semiconscientes, respuesta anormal a la luz, este fenómeno se repitió en las otras dos temperaturas. A los 7°C al igual que en el caso de 4°C, en las dos primeras concentraciones todos los peces no mostraron respuesta frente a la luz, exceptuando uno en la concentración de 25 mg CO₂/L, mientras que a 70 mg CO₂/L la mitad quedo inconsciente y la otra semiconsciente. Por último, a los 11°C los resultados fueron totalmente diferentes a 4°C y 7°C, a 25 mg CO₂/L 2 peces permanecieron

conscientes, uno semiconsciente y dos inconscientes. A 47 mg CO₂/L el número de inconscientes aumento a cuatro y uno semiconsciente. Por último, a 70 mg CO₂/L el número de conscientes se redujo a tres y el de semiconsciente aumento a dos.

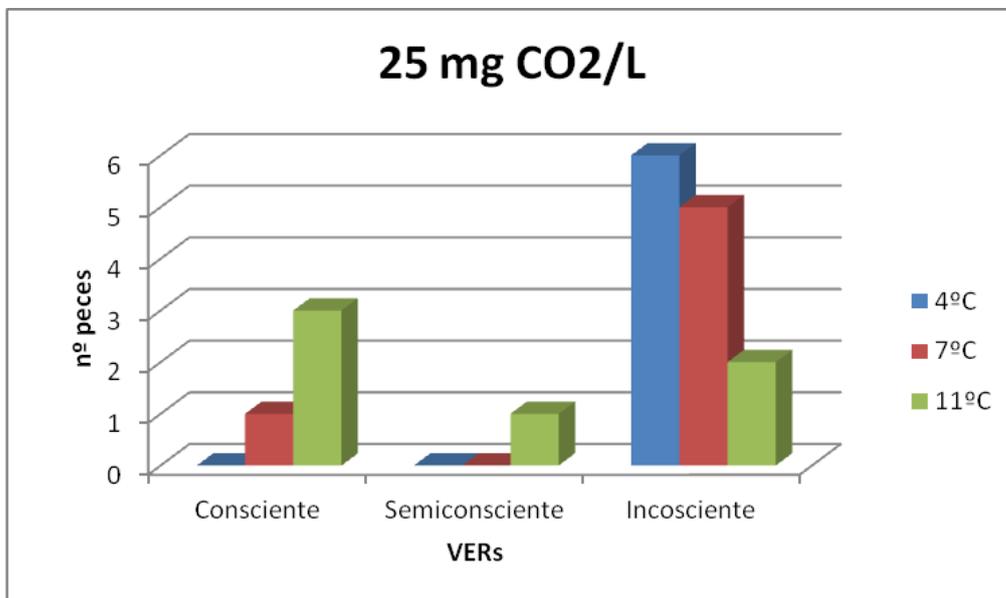


Figura 19: Resultados de las VERs por pez con 25 mg CO₂/L a 4°C, 7°C y 11°C

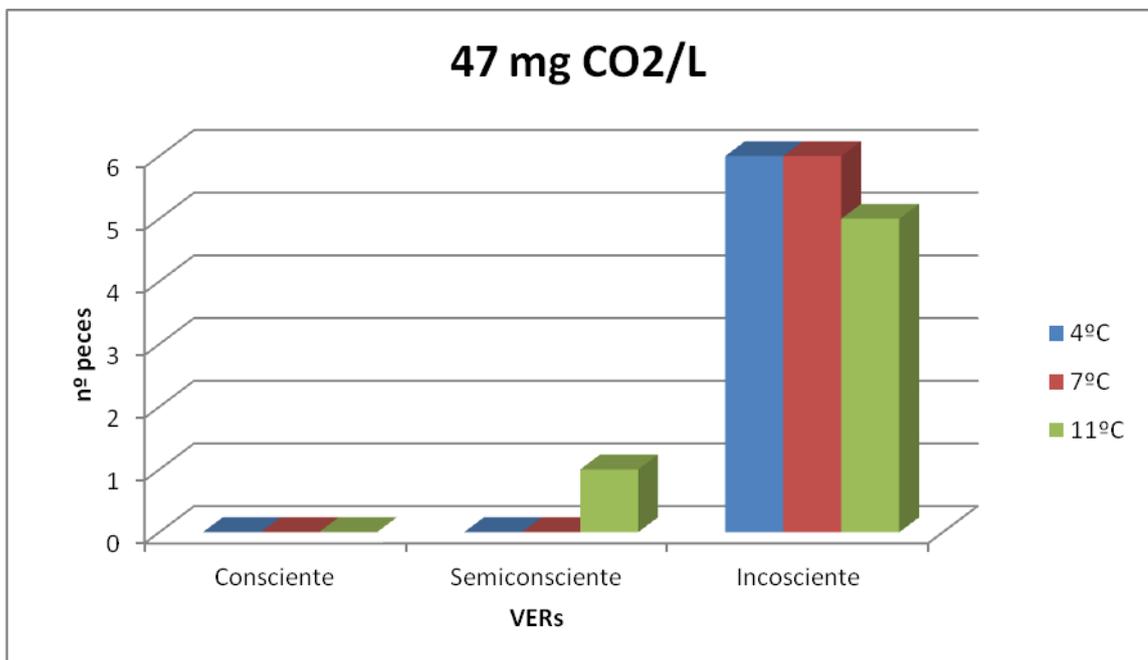


Figura 20: Resultados de las VERs por pez con 47 mg CO₂/L a 4°C, 7°C y 11°C

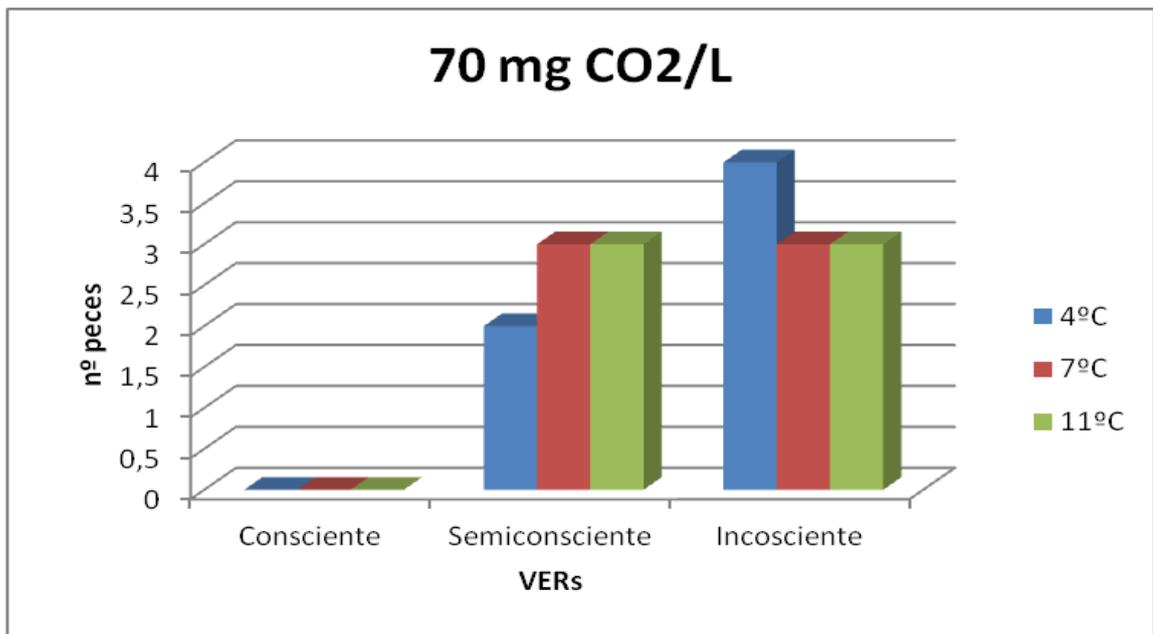


Figura 21: Resultados de las VERs por pez con 70 mg CO₂/L a 4°C, 7°C y 11°C

2. Experimento n° 2: Medición de sangre residual en filete

2.1. Observación visual

A través de un análisis comparativo de las fotos obtenidas de los pescados de los tres grupos se obtuvieron los siguientes resultados; en el pescado entero en el día 0 el color del vientre en el G1 y G3 eran totalmente blanco, sin enrojecimiento en la zona opercular, mientras que en el segundo grupo se observó enrojecimiento en la zona opercular (pescados 3, 5 y 6) y en la zona ventral posterior (pescados 1, 3 y 6). En el día 4, el color era igual que en el día 0 en el G1, salvo un enrojecimiento en la zona opercular en el pescado 1, y en el tercer grupo, en el G2 se volvió a observar enrojecimiento en la zona opercular (pescado 2) y en la zona ventral posterior (pescados 2, 4 y 5). Por último, en el día 11 el patrón era el mismo, exceptuando el G2, en el cual todos los pescados mostraron una coloración blanquecina en la zona ventral, salvo el pescado 5. Con respecto a los filetes; en el día 0 la coloración del primer y segundo grupo era similar, oscura y rojiza (grado 3), siendo bastante fuerte

en los pescados 6 y 3 del G1, mientras el G3 tuvo una coloración más clara (grados 1 y 2). En el día 4, la tendencia es una disminución del color en todos los grupos, manteniéndose el tercer grupo con una coloración más clara (grados 1 y 2). Al día 11, los filetes de todos los grupos mostraron un mayor emblanquecimiento (grado 2), siendo los del G3 los de mayor grado con gran diferencia (grado 1).

2.2. Medición del color

Los resultados obtenidos en pescado entero se muestran en la **Tabla V**; con respecto a la medición de la zona opercular hubo una alta significancia en relación al día, grupo y en la interacción del grupo y día, los valores de la luminosidad fueron disminuyendo a lo largo del tiempo de conservación en hielo, pasando de valores de $84,9 \pm 2,8$ (G1) y $81,0 \pm 3,5$ (G2) hasta llegar a $79,3 \pm 4,9$ y $62,6 \pm 12,7$ respectivamente, mientras que en el tercer grupo se observó un aumento de $59,6 \pm 8,1$ a $67,3 \pm 8,2$. Los valores de *a* permanecieron prácticamente constantes en los dos primeros grupos, mientras que en el tercero se produjo una disminución desde $3,1 \pm 0,9$ hasta $-0,6 \pm 0,5$. La evolución del valor *b* fue similar a *a*, a lo largo del tiempo desde el día 0 hasta el día 11 el valor se mantuvo constante, exceptuando el día 4 del primer grupo ($2,0 \pm 1,7$) y el día 0 del segundo ($4,9 \pm 1,1$). En la zona ventral, también se dio una alta significancia en relación al día, grupo e interacción del grupo y día, exceptuando el factor grupo en *L*; este permaneció constante durante todo el tiempo de conservación, *a* aumento en los primeros grupos desde $-3,0 \pm 0,2$ hasta $-1,4 \pm 0,3$ y desde $-2,2 \pm 0,7$ hasta $-0,9 \pm 0,2$ respectivamente, mientras que en el tercero *a* bajó de $2,4 \pm 0,9$ a $-0,9 \pm 0,3$. El valor *b* permaneció constante en el G3, mientras que el G2 aumentó desde $3,5 \pm 0,6$ hasta $6,3 \pm 0,7$, y en el G1 de $3,4 \pm 0,7$ a $4,0 \pm 0,8$. Por último, en la zona dorsal del tercio posterior hubo una alta significancia en relación al día,

grupo y la interacción del grupo y día en la luminosidad y a, exceptuando la interacción del grupo y día en este caso, mientras que en b hubo significancia en el grupo y día. L aumentó de $53,0 \pm 3,3$ a $56,8 \pm 9,4$ en el primer grupo y de $41,0 \pm 1,6$ a $49,3 \pm 2,4$ en el tercero, al contrario disminuyó en el segundo desde $47,4 \pm 4,6$ hasta $44,3 \pm 3,9$, a permaneció constante en el G1, mientras en el G2 aumentó bruscamente desde $-7,2 \pm 14,8$ hasta $-0,8 \pm 0,3$, y en el G3 disminuyó de $0,8 \pm 0,5$ a $-1,4 \pm 0,1$. b disminuyó en los tres grupos, siendo esta disminución más acusada en el primer grupo, de $1,6 \pm 0,6$ a $0,9 \pm 1,4$.

Tabla V. Valores de color de los tres grupos en la zona de opérculo, vientre y lomo, así como la diferencia significativa (P<0,05) de los factores día, grupo y día*grupo

Grupo	G1			G2			G3			P < 0,05			
	Día	0	4	11	0	4	11	0	4	11	Día	Gru	D*
											po	po	G
Opérculo L		84,9±2,8	57,3±6,9	79,3±4,9	81,0±3,5	66,3±0,5	62,6±2,7	59,6±8,1	72,5±3,3	67,3±8,2	0,001	0,019	0,000
Opérculo a		-	-	-	-	-	0,2±1,9	3,1±0,9	-	-	0,000	0,000	0,000
Opérculo b		1,4±1,0	1,7±1,0	1,7±0,5	0,4±1,9	0,7±0,3	-	9,1±1,0	5,4±1,0	6,7±1,0	0,013	0,002	0,012
Vientre L		93,7±2,3	95,2±0,8	94,4±1,3	95,4±1,5	88,7±2,0	90,9±0,7	86,2±5,2	89,0±1,5	88,9±1,6	0,000	-	0,000
Vientre a		-	-	-	-	-	-	2,4±0,9	-	-	0,005	0,000	0,000
Vientre b		3,4±0,7	3,7±1,0	4,0±0,8	3,5±0,6	7,4±1,1	6,3±0,7	6,6±1,2	6,1±1,4	6,6±0,7	0,000	0,000	0,000
Lomo L		53,0±3,3	48,4±5,1	56,8±9,4	47,4±4,6	40,4±2,8	44,3±3,9	41,0±1,6	46,6±5,2	49,3±2,4	0,012	0,000	0,009
Lomo a		-	-	-	-	-	-	0,8±0,5	-	-	-	-	-
Lomo b		1,5±0,3	1,5±0,3	1,3±0,3	7,2±14,8	0,8±0,3	1,1±0,4	5,0±2,2	1,1±1,0	1,4±0,1	0,008	0,004	-

Con respecto a la medición de color de los filetes, los resultados se muestran en la **Tabla VI**; en la zona anterior hubo una alta significancia en relación al día, grupo e interacción del grupo y día, exceptuando esta última en L y a. El valor L mostró un crecimiento constante con respecto al tiempo de conservación en hielo, dándose los mayores valores en el tercer grupo, que se pasó de $44,6 \pm 1,7$ (día 0) a $55,3 \pm 3,9$ (día 11). a sufrió una disminución a lo largo de los 11 días, siendo más fuerte en el segundo grupo, que pasó de $2,1 \pm 0,9$ (día 0) a $0,1 \pm 0,8$ (día 11). Al contrario que el valor a, b aumentó siendo el grupo con mayor diferencia el segundo, que pasó de $-3,0 \pm 0,6$ (día 0) a $0,6 \pm 0,7$ (día 11). La evolución en la zona posterior fue similar; se dio una alta significancia en día y grupo (exceptuando L), solo hubo un caso en la interacción entre grupo y día (valor b). L aumentó progresivamente de valores en torno al 50 hasta el 60, siendo el crecimiento más acusado el del primer grupo, desde $50,1 \pm 1,5$ (día 0) hasta $63,6 \pm 3,5$ (día 11), el valor a disminuyó en todos los grupos dándose la mayor disminución en el G2, desde $2,3 \pm 1,1$ (día 0) hasta $-0,6 \pm 0,6$ (día 11). Por último, b tuvo una evolución creciente, siendo el segundo grupo el que mayor crecimiento registró, desde $-1,5 \pm 0,6$ (día 0) hasta $3,1 \pm 1,1$ (día 11).

Tabla VI. Valores de color de los tres grupos en la zona anterior y posterior del filete, así como la diferencia significativa ($P < 0,05$) de los factores día (D), grupo (G) y día*grupo (D*G)

Grupo	G1			G2			G3			P < 0,05			
	Día	0	4	11	0	4	11	0	4	11	D	G	D*G
Anterior L		43,0±2,2	48,3±2,5	53,0±,31	43,1±2,1	45,0±2,4	50,4±,2,5	44,6±1,7	46,3±3,7	55,3±3,9	0,000	0,02	-
Anterior a		1,5±1,6	0,3±1,1	0,4±1,3	2,1±0,9	-0,4±0,9	0,1±0,8	-1,0±0,9	-1,7±0,3	-1,8±0,3	0,000	0,000	-
Anterior b		-2,9±0,4	-3,2±0,7	-2,0±0,8	-3,0±0,6	-0,2±0,6	0,6±0,7	-0,5±1,3	-1,0±1,3	0,3±0,9	0,000	0,000	0,000
Posterior L		50,1±1,5	58,4±4,0	63,6±3,5	50,5±2,8	54,1±3,7	60,9±2,1	53,1±2,7	55,2±3,0	60,3±5,0	0,000	-	-
Posterior a		1,5±1,0	0,2±0,7	0,2±0,9	2,3±1,1	-0,6±1,1	-0,6±0,6	0,3±0,6	-1,4±0,3	-1,5±0,3	0,000	0,000	-
Posterior b		-2,1±0,6	-1,7±1,2	-0,6±1,2	-1,5±0,6	1,3±1,6	3,1±1,1	1,6±0,7	0,3±1,4	2,1±1,5	0,000	0,000	0,000

2.3. Medición de la hemoglobina

Con respecto a la aplicación de la medición de la hemoglobina a través de la técnica modificada de Olsen (2008) los datos obtenidos se muestran en la **figura 22**. Se observó una clara diferencia entre el G3 y los otros dos, siendo la diferencia significativa ($P = 0,004$); la media del G1 y G2 fue respectivamente $0,56 \pm 0,15$ y $0,50 \pm 0,07$ mg Hemoglobina/g músculo, mientras que la del G3 fue $0,32 \pm 0,08$ mg Hemoglobina/g músculo.

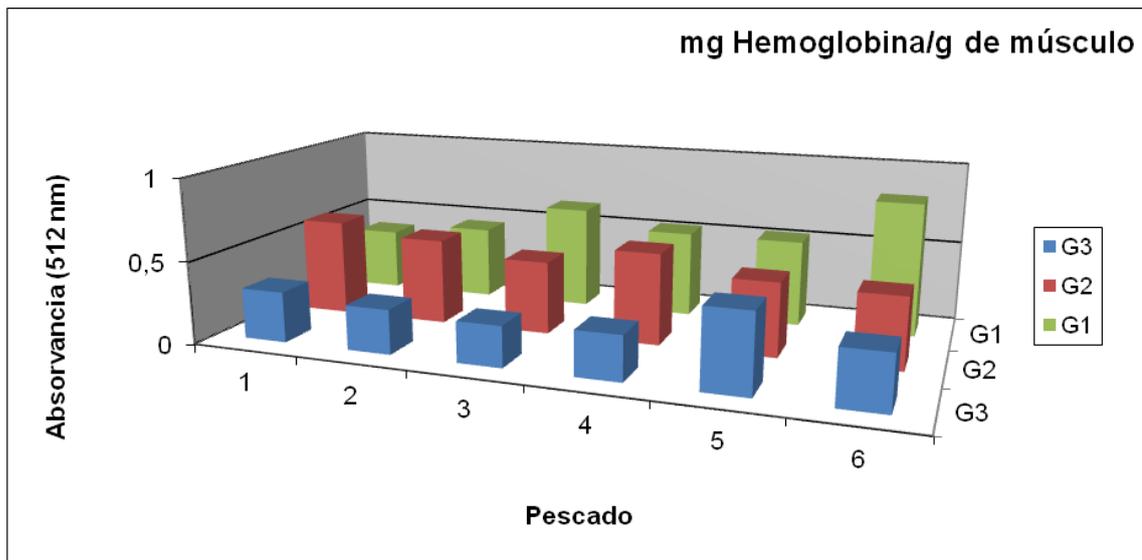


Figura 22: Concentración de mg Hemoglobina/g de músculo por pescado de los tres grupos al día 0

3. Experimento n°3: Comparación de la calidad entre individuos desangrados y aturridos, aturridos y no desangrados y no aturridos

3.1. QIM (Quality Index Method)

Los datos obtenidos con respecto a los puntos de demérito de cada grupo a lo largo del tiempo de conservación en hielo se muestran en la **figura 23**. En el día 0 los valores fueron similares en los tres grupos, siendo exactamente $1,00 \pm 0,00$ (G1), $0,80 \pm 0,34^a$ (G2) y $0,80 \pm 0,31$ (G3), al día 4 aumentó alcanzando $2,80 \pm 0,4$ (G1), $4,23 \pm 0,78$ (G2) y $1,44 \pm 0,33$ (G3). En el día 11, los valores alcanzados fueron $7,23 \pm 0,63$ (G1), $7,34 \pm 0,45$ (G2) y $7,47 \pm 0,33$ (G3).

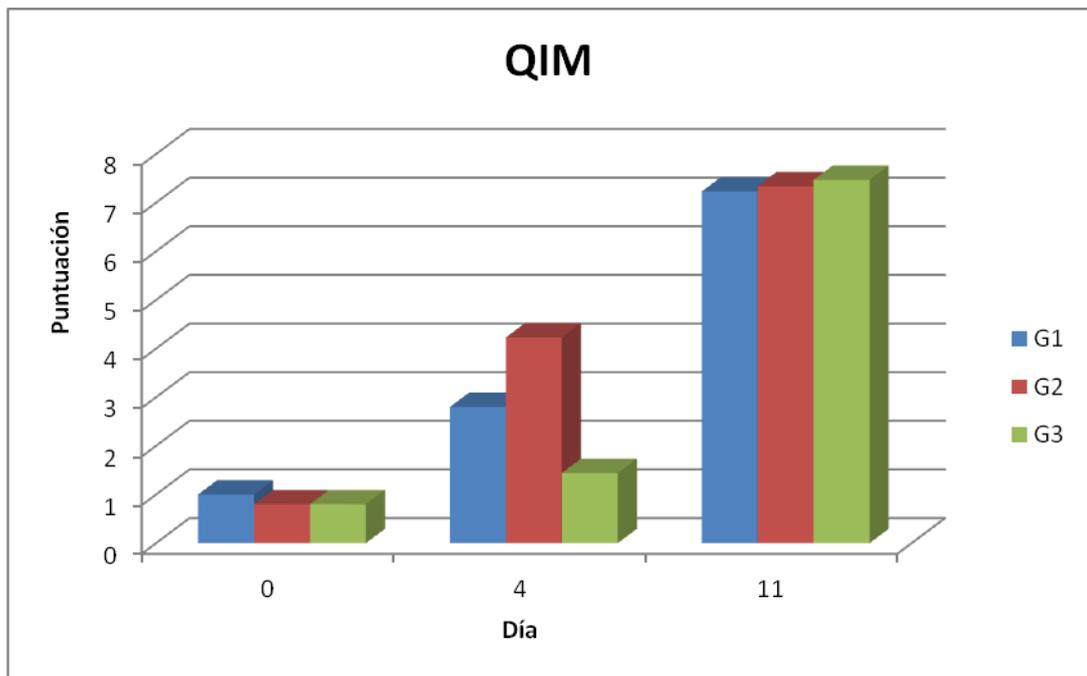


Figura 23: Evolución de los puntos de demérito de los tres grupos a lo largo de los 11 días de conservación en hielo

3.2. pH

Como se observa en la **figura24** el valor del pH fue aumentando progresivamente durante los días de conservación en hielo. El valor inicial de los tres grupos fue $5,99 \pm 0,69$, $5,93 \pm 0,68$ y $5,94 \pm 0,56$ respectivamente, a partir de aquí el pH alcanzó valores de $6,02 \pm 0,87$, $5,98 \pm 0,53$, y $5,99 \pm 0,30$ en el día 4, y por último en el día 11 se llegó a valores de $6,29 \pm 0,10$, $6,11 \pm 0,98$ y $6,09 \pm 0,98$. El pH más bajo se dio en el tercer grupo en todos los días de conservación en hielo, seguido por el segundo grupo.

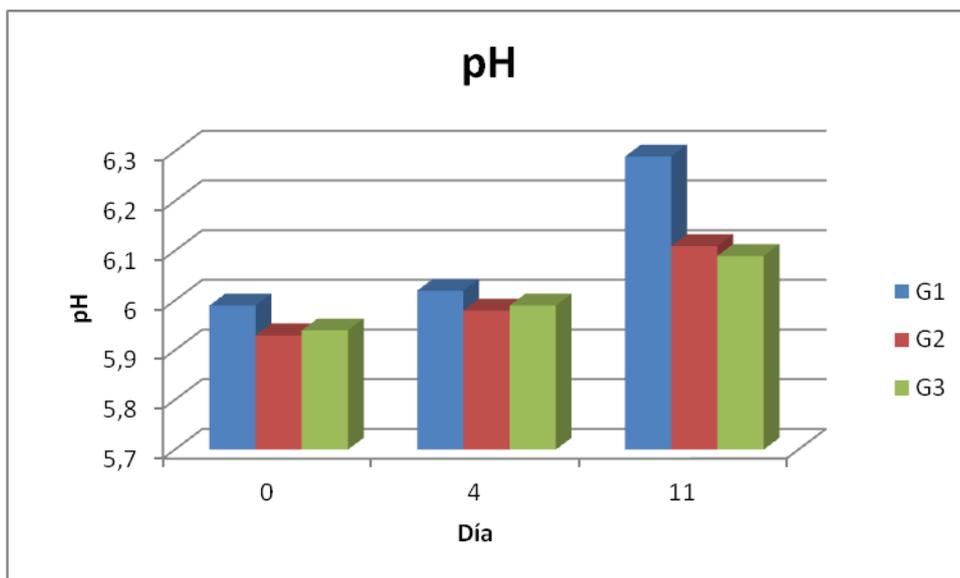


Figura 24: Evolución del pH de los tres grupos durante los días 0, 4 y 11

3.3. TPA (Texture Profile Analysis)

La **Tabla VII** muestra los resultados obtenidos con el análisis de textura del pescado entero, como se observa hubo diferencia significativa en muy pocos parámetros. La cohesividad aumentó en los dos primeros grupos a lo largo de los días de conservación en hielo, mientras que en el tercero disminuyó de $0,8 \pm 0,10$ (día 0) a $0,7 \pm 0,1$ (día 11), además hubo diferencia significativa con respecto al grupo. La gomosidad disminuyó en todos los grupos, siendo ésta pequeña en el primero de $17,9 \pm 9,3$ (día 0) a $17,0 \pm 4,2$ (día 11). La masticabilidad disminuyó en el G2 y G3, mientras que el G1 permaneció prácticamente constante, de $15,2 \pm 8,2$ (día 0) a $15,1 \pm 4,3$ (día 11). La resistencia permaneció constante en todos los grupos a lo largo de los 11 días, con un valor medio de $0,5 \pm 0,0$, también hubo diferencia significativa con respecto al día y a la interacción entre día y grupo. La dureza disminuyó en los dos primeros grupos, mientras que en el tercero aumentó de $24,9 \pm 7,4$ (día 0) a $25,4 \pm 5,6$ (día 11), hubo diferencia significativa con respecto al día y al grupo. Con

respecto a la elasticidad aumentó en el G1 de $0,7\pm0,3$ (día 0) a $0,9\pm0,0$ (día 11), disminuyó en el G2 de $0,9\pm0,1$ (día 0) a $0,8\pm0,0$ (día 11) y permaneció constante en el G3 en $0,9\pm0,1$. Se puede observar que existe un efecto del aturdimiento en la textura del pescado entero, así lo muestra la diferencia de la evolución de algunos parámetros (gomosidad y masticabilidad) del segundo y tercer grupo con respecto al primero.

Tabla VII. Evolución de los parámetros del TPA del pescado entero, así como la diferencia significativa (P<0,05) de los factores día (D), grupo (G) y día*grupo (D*G)

Grupo	G1			G2			G3			P<0,05		
	0	4	11	0	4	11	0	4	11	D	G	D*G
Cohesividad	0,3±,01	0,2±,02	0,2±,03	0,2±0,	0,2±,0	0,2±,03	0,2±,0	0,2±,0	0,2±0,1	0,001	-	-
				3	2		2	2				
Gomosidad	18,4±3,	14,0±2,	12,9±3,	23,3±6	15,7±2	11,5±5,	18,6±2	15,9±5	13,0±4,	0,003	-	-
	5	8	4	,1	,5	1	,2	,3	5			
Masticabilidad	6,5±1,1	4,3±0,9	4,0±0,0	7,4±2,	4,8±0,	3,6±1,6	6,4±1,	5,01±1	3,9±1,9	0	-	-
				5	0		6	,9				
Resistencia	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,	0,1±0,	0,1±0,0	0,1±0,	0,1±0,	0,1±0,0	0,004	-	-
				0	0		0	0				
Adhesividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,1±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,	0,1±0,	0,1±0,0	0,1±0,	0,1±0,	0,1±0,0			
				1	0		0	0				
Fractura	6,7±14,	14,4±1	20,0±1	9,9±21	11,8±1	7,5±11,	16,1±2	11,2±1	10,3±1	-	-	-
	5	0,8	1,4	,7	2,0	3	6,9	1,5	0,2			
Dureza	71,4±1	65,5±9,	60,2±1	88,7±1	70,4±7	54,4±1	77,9±7	70,5±2	53,8±8,	0,02	-	-
	2,1	6	1,2	5,5	,9	8,5	,0	0,6	4			
Elasticidad	0,4±0,0	0,3±0,0	0,3±0,0	0,3±0,	0,3±0,	0,3±0,0	0,3±0,	0,3±0,	0,3±0,0	0,012	-	-
				0	0		1	0				

La **Tabla VIII** muestra los resultados obtenidos con el análisis de textura del filete; en primer se observó una diferencia significativa con respecto al día en la mayoría de los parámetros. La evolución de los parámetros fue prácticamente igual en todos los grupos, la gomosidad y dureza disminuyeron durante el tiempo de conservación,

dándose los cambios más bruscos en el tercer grupo, exceptuando la dureza en la cual el G2 pasó de $88,7 \pm 15,5$ (día 0) a $54,4 \pm 18,5$ (día 11). A su vez, la adhesividad permaneció constante en todos los grupos con un valor medio de $-0,1 \pm 0,0$. Los parámetros de cohesividad, resistencia y elasticidad disminuyeron del día 0 al 11 en el G1, mientras que en el resto de grupos permanecieron constantes, siendo los respectivos valores $0,2 \pm 0,3$, $0,1 \pm 0,0$ y $0,3 \pm 0,0$. A partir de los resultados se puede observar que el aturdimiento tuvo efecto en la textura del filete.

Tabla VIII. Evolución de los parámetros del TPA del filete, así como la diferencia significativa ($P<0,05$) de los factores día (D), grupo (G) y día*grupo (D*G)

Grupo	G1			G2			G3			P<0,05		
	0	4	11	0	4	11	0	4	11	D	G	D*G
Cohesividad	0,3±0,01	0,2±0,02	0,2±0,03	0,2±0,03	0,2±0,02	0,2±0,03	0,2±0,02	0,2±0,02	0,2±0,01	0,00	-	-
										1		
Gomosidad	18,4±3,	14,0±2,	12,9±3,	23,3±6,	15,7±2,	11,5±5,	18,6±2,	15,9±5,	13,0±4,	0,00	-	-
	5	8	4	1	5	1	2	3	5	3		
Masticabilidad	6,5±1,1	4,3±0,9	4,0±0,0	7,4±2,5	4,8±0,0	3,6±1,6	6,4±1,6	5,01±1,	3,9±1,9	0	-	-
								9				
Resistencia	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,00	-	-
										4		
Adhesividad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,1±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0			
Fractura	6,7±14,	14,4±1	20,0±1	9,9±21,	11,8±1	7,5±11,	16,1±2	11,2±1	10,3±1	-	-	-
	5	0,8	1,4	7	2,0	3	6,9	1,5	0,2			
Dureza	71,4±1	65,5±9,	60,2±1	88,7±1	70,4±7,	54,4±1	77,9±7,	70,5±2	53,8±8,	0,02	-	-
	2,1	6	1,2	5,5	9	8,5	0	0,6	4			
Elasticidad	0,4±0,0	0,3±0,0	0,3±0,0	0,3±0,0	0,3±0,0	0,3±0,0	0,3±0,1	0,3±0,0	0,3±0,0	0,01	-	-
										2		

3.4. TBARs

Como se observa en la **figura 25** en el día 0 los valores de absorbancia fueron constantes en los tres grupos, $0,07\pm0,05$ (G1), $0,07\pm0,02$ (G2) y $0,07\pm0,01$ (G3). Al día 4 el G1 y el G2 aumentaron hasta $0,08\pm0,01$, mientras que el G3 se mantuvo

constante con un valor similar que el día 0, $0,07\pm 0,02$. Por último, en el día 11 aumentó en el G1 ($0,10\pm 0,03$) y G2 ($0,11\pm 0,01$), nuevamente el valor del G3 se mantuvo constante, $0,07\pm 0,00$.

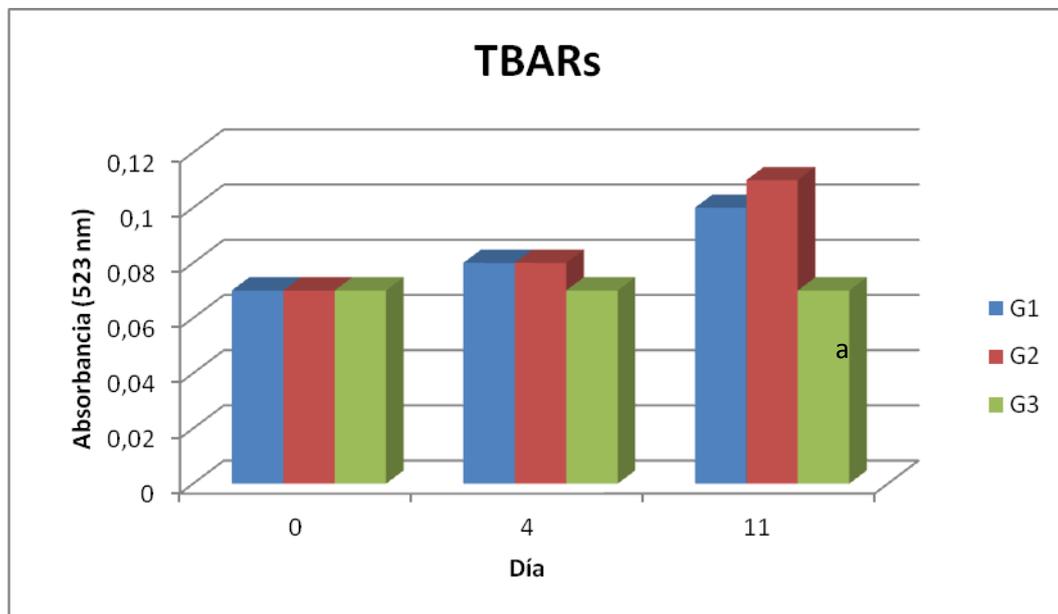


Figura 25: Desarrollo de los TBARs de los tres grupos durante los días 0, 4 y 11, donde a es ($P < 0,05$) con respecto al grupo

3.5. Determinación de la bacteria *S. putrefaciens*

Los resultados con respecto a la determinación de la *S. putrefaciens* fueron negativos, no se encontró presencia de la bacteria en ninguno de los cultivos realizados, exceptuando un caso, el día 11 del G2, en el cual se detectó en pequeño porcentaje, entre $1-15 \log_{10}^{-1}$.

Discusión

1. Experimento n°1: Aturdimiento con combinación de CO₂ y frío

Por si solos, la utilización de frío (agua más hielo) o la narcosis de CO₂ no cumplen los requisitos para aturdir satisfactoriamente a los peces durante el sacrificio, ambos métodos producen movimientos de lucha por parte del pez afectando a la calidad del producto como se explicó en capítulos anteriores. Como se observa en las en los resultados obtenidos existen patrones claros de la evolución del comportamiento de los peces; el aumento progresivo de la concentración de CO₂ supone un ligero aumento de la agresividad. Como informaron Robb *et al.*,(2002), Roth *et al.*, (2002, 2006); Olsen *et al.*, (2006) la saturación del agua con CO₂ genera un estado de hipercapnia en el que entra el pez, esta induce a que el pH en sangre y musculo sufra una caída brusca, debido a una baja difusión del CO₂ en la sangre, como resultado visible se observan movimientos de lucha y fuga constante del pez, indicando que el pez está sufriendo en todo momento aumentando su estrés y por tanto la calidad del filete. Debido a esto, en nuestra experiencia se utilizaron concentraciones bajas de CO₂.

Aún así, el estado de agresividad fue mucho menor que en experimentos anteriores debido a la aplicación de temperaturas frías, como indicaron Yokoyama *et al.*, (1989) la respuesta hiperactiva del CO₂ se reduce en cierta medida por la reducción de la temperatura, Erikson *et al.*, (2006) aplicaron la combinación de narcosis de CO₂ con frío para aturdir salmón Atlántico obteniéndose buenos resultados; los peces no sufrieron movimientos bruscos durante el desangrado ni durante el sacrificio, indicando que la combinación de CO₂ con frío es un buen método de aturdimiento, que cumple los requisitos del bienestar del animal. Los resultados obtenidos

corresponden a los obtenidos por los autores anteriores, la aplicación del frío redujo la agresividad generada por la saturación de CO₂. A su vez también se observó que a 70 mg CO₂/L el tiempo de inmovilización es rápido, entre 4 y 7 minutos, pero casi la mitad de los peces en todas las temperaturas no alcanzaron la inconsciencia, mostrando respuesta al estímulo de la luz blanca, por lo que en el supuesto caso en que los peces fueran sacrificados con esta concentración un alto porcentaje estaría sufriendo durante todo el proceso, afectando al bienestar y a la calidad del producto. Este suceso también fue observado por Kestin *et al.*, (1995) y Robb *et al.*, (2000) a través de una serie de experiencias con salmón Atlántico basadas en el aturdimiento con CO₂ utilizando las VERs (respuestas visuales evocadas) y otros indicadores de la respuesta cerebral, obteniendo que el tiempo entre el cese de la actividad física del pez y la pérdida de conciencia era alto (460-600 segundos), por lo que la mayoría de los peces que eran sacrificados tras ser narcotizados con CO₂ eran conscientes durante todo el proceso.

Tras lo explicado anteriormente, la concentración de 47 mg CO₂/L en combinación con el frío fue la concentración de CO₂ idónea para el aturdimiento, ya que ni es baja como la de 25 mg CO₂/L que supone un aturdimiento muy lento, ni es excesivamente alta como la de 70 mg CO₂/L que no llegó a alcanzar la inconsciencia en un alto porcentaje de los individuos.

Con respecto a la temperatura, las lubinas utilizadas en la experiencia estaban aclimatadas a temperaturas entre 16°C y 20°C, por lo que el aumento progresivo del tiempo de aturdimiento a 4°C, 7°C y 11°C respectivamente corresponden a lo indicado Robb (2001); la hipotermia es más eficaz para los peces aclimatados a las aguas por encima de 8-10°C, actuando como un sedante, por el contrario en los peces de aguas frías, por debajo del rango anterior, la aplicación del frío para aturdir no es

muy eficaz. Se observó que a 4°C el tiempo en que los peces tardan en pasar a la inconsciencia es menor que a 7°C y 11°C, quedando totalmente inconsciente el total de individuos, teniendo estas dos últimas temperaturas un efecto sedante similar, por lo que dentro del rango de temperaturas seleccionadas la temperatura de 4°C fue la idónea para aturdir a la lubina ya que el tiempo de aturdimiento es menor, todos los peces llegan a la inconsciencia y el grado de agresividad es ligeramente menor que en las otras dos temperaturas.

2. Experimento nº 2: Medición de sangre residual en filete

2.1. Observación visual

En la observación visual del pez entero no se ha detectado diferencia entre el G1 y el G3, cuando debería haberla, ya que en pruebas anteriores al experimento realizado los pescados analizados mostraban una importante cantidad de petequias en la zona ventral y opercular, correspondiéndose con lo expuesto por Erikson *et al.*, (2010); Roth *et al.*, (2009); Olsen *et al.*, (2008), los cuales indicaron que el proceso de sacrificio si tiene importancia en la formación de las manchas de sangre residual, siendo un gran factor los ambientes hipercapnicos e hipóxicos. Al contrario en los resultados obtenidos no se observaron estas petequias en el G1, esto se debe al volumen de peces sacrificados, en todos los trabajos estudiados así como a nivel industrial los peces están hacinados durante el sacrificio en tanques en gran cantidad, lo que produce movimiento de lucha, golpes y aplastamiento de unos peces contra otros, aumentando el movimiento muscular y por tanto la hipoxia en los peces. En nuestro caso solo se sacrificaron 18 peces en un volumen suficiente de agua más hielo, observándose la ausencia de movimientos bruscos de lucha. En el G2, se

observó enrojecimiento en las zonas ventrales y algo en las zonas operculares, esto es debido a la exposición a condiciones de hipoxia, hipercapnia o simplemente una mayor actividad muscular son capaces de disminuir la acumulación de sangre en los intestinos y cambiar el flujo circulatorio en los músculos. En nuestro caso la aplicación de CO₂ como medio de aturdimiento supuso para los peces un aumento de la hipercapnia generando un aumento de la presión arterial de los vasos, especialmente en la zona del vientre, dando lugar a petequias. Al contrario en el G3 aunque los peces fueron aturridos con CO₂, el efecto del desangrado supuso la eliminación de la presión arterial eliminando buena parte del volumen de sangre, evitando por tanto la aparición de las petequias. Con respecto a los resultados obtenidos en los filetes, podemos afirmar que la observación visual es un método aceptable para determinar la diferencia entre peces desangrados y no desangrados; los filetes del G1 y G2 fueron más rojizos y oscuros, mientras que los del G3 fueron más blanquecinos, manteniéndose esta tendencia a lo largo de los 11 días de conservación en hielo. Esto concuerda con lo explicado por Erikson *et al.*, (2010); Roth *et al.*, (2009); Olsen *et al.*,(2008); generalmente los filetes de pescados sin desangrar tienen una coloración rojiza, mientras que en los pescados desangrados es blanquecina.

2.2. Medición del color

La mayoría de las mediciones realizadas en los trabajos anteriores se basan en el filete, ya que las especies estudiadas se comercializan en este formato, mientras la lubina se comercializa entera. La medición del color en el pescado entero tuvo grandes diferencias significativas con respecto al grupo y al día, el grado de

luminosidad (L) en la zona opercular disminuyó a lo largo de los 11 días de almacenamiento, exceptuando el G3, esto fue debido al corte de branquias, en el día 0 todavía había sangrado del pescado, al pasar de una temperatura fría a temperatura ambiente el tiempo de coagulación disminuye, acumulándose algo de sangre en la zona. Esto a su vez se complementa con los valores de a, el cual en el día 0 fue positivo, lo que corresponde a tonalidades rojas y paso a negativo en el día 11, tonalidades verdes, este fenómeno ocurrió en las tres zonas medidas, al contrario el valor a aumentó en el G1 y G2, es decir, las tonalidades rojizas aumentaron en el G1 y G2, mientras que en el G3 disminuyeron. Con respecto a la zona del vientre la luminosidad también disminuyó, dándose los valores más bajos en el G3, lo cual se contrarresta con lo explicado en el apartado anterior; el G3 carece de petequias, pero mostró valores más bajos de L, mientras que el G2 si tiene petequias y valores más altos de L. Esto es debido a la zona de medición del color, exactamente se midió entre las aletas ventrales, y en el G2 las petequias aparecían en la zona ventral posterior y algo en la anterior, pero encima de las aletas ventrales. Por último, en la zona dorsal del tercio posterior, en el G1 y G3 se produjo un oscurecimiento de la piel, mientras que en el G2, se redujo.

Con respecto al color del filete los resultados obtenidos se corresponden en gran medida a los obtenidos con la observación visual, se observó una diferencia significativa con respecto al día y también al grupo (zona anterior) en los tres grupos. Aún así los valores de mayor interés fueron el a y b, según Erikson *et al.*, (2010); Roth *et al.*, (2009); Olsen *et al.*, (2008) cuando se trata del análisis de sangre residual se habla de filetes con valores de luminosidad alto (concentración baja o nula de sangre residual), valores de amarillo (concentración media de sangre residual en función a la tonalidad del amarillo) y valores rojos (concentración alta de sangre

residual en función a la tonalidad del rojo). En nuestro caso los valores de a fueron más altos en el G1 y G2, lo que indica una alta concentración de sangre residual en el músculo, mientras que en el G3 fue baja, a su vez los valores de b fueron contrarios, mayores en el G3 y menores en G1 y G2, lo que indica que el G3 tiene una concentración media de sangre residual menor que los otros dos grupos. Con respecto al valor L, su tendencia fue un aumento en todos los grupos debido a la oxidación de las hemoproteínas, hemoglobina y mioglobina. En resumen, la concentración de sangre residual fue alta en el G1 y G2, e intermedia-baja en el G3.

2.3. Medición de la hemoglobina

A partir de los resultados obtenidos, la concentración de hemoglobina del G1 fue ligeramente más alta que la del G2, aún así fueron similares, sin diferencias significativas. En el caso del G3, la concentración de la hemoglobina fue casi la mitad que en los otros dos grupos, esto coincide con lo expuesto en otros trabajos en los cuales se indica que el corte de los arcos branquiales es un buen método de desangrado (Roth *et al.*, 2005; Erikson *et al.*, 2010). Aunque el volumen de sangre que se elimina es mucho menor que con el método de evisceración, ya que los peces tienen la capacidad de reducir la presión arterial en el lado venoso, creando un diferencial de presión y manteniendo el flujo de sangre, y aplicando la evisceración la mayor parte de la sangre en la musculatura posterior está centrada en la zona de los túbulos renales, rompiendo la resistencia ejercida por los riñones sobre la sangre. Se descartó la evisceración ya que según los resultados del informe de Taliadourou *et al.*, (2003), basados en análisis microbiológicos y sensoriales, sugieren que la lubina eviscerada tiene un periodo más corto de vida útil que sin eviscerar, debido a un aumento de la actividad microbiana. Con respecto a la técnica aplicada para la

medición de la hemoglobina residual podemos constatar que es una técnica con una mayor eficacia y precisión que el conteo visual, como indicaron (Clark *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 2008). También es segura, repetible y rápida en comparación a otras técnicas químicas cuyos productos pueden afectar al filete como el cianuro, monóxido de carbono o nitrógeno.

3. Experimento n°3: Comparación de la calidad entre individuos desangrados y aturcidos, aturcidos y no desangrados y no aturcidos

3.1. QIM

Existe una alta correlación entre el tiempo de conservación y la puntuación del método, lo que indica una degradación de la calidad a lo largo del tiempo. Knowles *et al.*, (2007) obtuvo valores de positivos en la aplicación del aturdimiento eléctrico en lubina. A su vez comparo este tipo de aturdimiento con el aturdimiento con hielo obteniendo valores similares hasta el día 10 post-mortem. Tejada *et al.*, (2006) aplicaron el método QIM para determinar las características sensoriales de lubinas y doradas almacenadas en hielo. El único inconveniente es que se requiere de un panel de asesores entrenados. Por otro lado, se observó una diferencia significativa entre los tres grupos, obteniéndose resultados contrarios a los obtenidos por Huidobro *et al.*, (2001) en dorada, donde contrastaron lotes de peces sin lavar comparados con lotes lavados con agua de grifo y almacenados en las mismas condiciones para su posterior evaluación sensorial hasta los 11 días de almacenamiento, no encontraron diferencias significativas dependientes del tiempo para cualquiera de los parámetros considerados. Los mejores resultados (menor puntuación) fueron en el G3 durante los primeros 4 días. Lo que indica que el desangrado no solo mejora el aspecto visual

sino la calidad en los primeros 4 días de conservación en hielo obteniéndose además una calidad similar al G1 y G2, esta conclusión se puede complementar con los resultados obtenidos en los TBARs, en los cuales se produjo una reducción del efecto de la oxidación lipídica en el G3, en comparación a los otros dos grupos. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Robb *et al.*, (2003) y Roth *et al.*, (2007), los cuales exponen que el método de desangrado tiene poca influencia en la calidad de los filetes, pero si tiene importancia en el aspecto visual del producto.

3.2. pH

La medición del pH debido a la acumulación del ácido láctico es considerada un buen método para determinar la calidad del filete en el progreso de la etapa de post-mortem. El pH del pescado fresco esta alrededor de 6,5 en diferentes especies y tiende a disminuir tras el sacrificio. Según varios autores los peces aturdidos con CO₂ muestran un descenso más brusco del pH que los peces asfixiados con hielo. Acerete *et al.*, (2009) obtuvieron valores de pH similares comparando el aturdimiento y sacrificio con narcosis de CO₂ y hielo (agua más hielo) en lubina. Por otro lado, se ha observado que tanto el corte de branquias como la reducción de la temperatura genera una reducción rápida del pH y la aparición del rigor (Roth *et al.*, 2006). En nuestra experiencia la utilización del pH como herramienta para diferenciar la calidad entre grupos de peces aturdidos con CO₂ y agua fría, así como desangrados con otros grupos de sacrificio clásico (con agua y hielo, sin aturdimiento ni desangrado) únicamente sólo tuvo diferencias significativas en el último día. Esto se debe a que la producción de componentes básicos de la degradación de compuestos

nitrogenados derivados por el crecimiento de bacterias fue baja, debido a las óptimas condiciones de almacenamiento.

3.3. TPA

Los cambios registrados en la textura del pez entero mostraron una evolución decreciente en la mayoría de los parámetros (gomosidad, masticabilidad y dureza). La cohesividad aumentó en el G1, mientras que en los otros dos grupos disminuyó, y la elasticidad tuvo una evolución constante en los G2 y G3, y creciente en el G1. La resistencia permaneció constante a lo largo del tiempo de conservación en los tres grupos. Los resultados obtenidos no concuerdan con los de Carbonell *et al.*, (2003) donde se estudiaron los cambios en la dorada indicando que la dureza y los parámetros derivados, la masticabilidad y la interacción entre pescado fresco y congelado no disminuyeron significativamente en el tiempo. Mientras que con los resultados de Ginés *et al.*, (2002) si, en estos se obtuvo una disminución de la dureza en pez entero en torno al 15 % antes de los 11 días de conservación en hielo en dorada.

Después del estado de post-rigor, el músculo pierde firmeza en proporción directa al tiempo de conservación en hielo. Según los trabajos de la textura desarrollados por Ayala *et al.*, (2010), todos los parámetros, excepto la elasticidad, cambiaron con el tiempo de almacenamiento del pescado, disminuyendo significativamente la mayoría de ellos en el día 5. En nuestro caso ésta tendencia se cumple en la mayoría de los parámetros de todos los grupos. La elasticidad permaneció constante en los grupos 2 y 3 siguiendo un comportamiento similar al de Ayala *et al.*, (2010), mientras en el primer grupo disminuyó. La adhesividad fue constante mientras que en los trabajos

de Ayala *et al.*, (2010) aumentó significativamente como resultado del tiempo de almacenamiento mostrando el valor más alto al final del estudio. En informes anteriores se ha observado que la respuesta del salmón Atlántico durante el aturdimiento con CO₂ genera estrés agudo y reacción de fuga (Robb, 2001), dando lugar a la aparición temprana del rigor mortis y por tanto del ablandamiento del músculo (Roth *et al.*, 2006). En nuestro trabajo este proceso se expresa en una brusca disminución de la dureza en los grupos aturdidos con CO₂, segundo y tercer grupo.

La fuerza del rigor tiene un impacto directo en la calidad del filete, los peces que tienen un alto grado de actividad previa al sacrificio muestran un alto grado de desgajamiento. El desgajamiento ocurre cuando los miotomos se separan del miosepto, esto causa un daño importante en el filete, volviéndose poco apetecible para el consumidor, además este fenómeno genera que el procesamiento del filete sea más difícil. El desgajamiento es un serio problema en el tratamiento de filetes de salmón Atlántico. Puede ser el resultado de la aplicación de una gran fuerza de contracción sobre el tejido conectivo en el miosepto de una alta proporción de fibras musculares durante el rigor. La fuerza de la fibra muscular está directamente afectada por el grado de actividad de los músculos antes del sacrificio (Johansson, 2001). El desgajamiento se expresa particularmente en una disminución de la fractura y la dureza del filete, como indicaron Caballero *et al.*, (2009) la adhesividad en dorada (*Sparus aurata*) disminuyó hasta los 14 días de conservación en hielo. Varios autores (Mochizuki y Sato, 1994; Jerret *et al.*, 1996; Sigholt *et al.*, 1997; Robb, 1998) destacaron la gran fuerza generada sobre las fibras musculares durante el sacrificio, obteniéndose filetes más duros en peces aturdidos previamente que otros sacrificados sin aturdir.

3.4. TBARs

La evolución de los TBARs concuerda con lo explicado en apartados anteriores, la oxidación lipídica empieza a iniciarse desde el primer día de conservación en hielo aumentando progresivamente, aún así las diferencias no son notables hasta el día 11 de conservación, por lo que los valores entre el día 0 y 4 son prácticamente similares en los tres grupos. Cabe destacar que en el G3 se produjo una reducción del valor de los TBARs en el día 11 con respecto a los otros dos grupos, este resultado es lógico ya que al desangrarse el pez se pierde un importante volumen de sangre por lo que la concentración de hemina o Fe procedente de la hemoglobina se reduce limitando el efecto de la oxidación lipídica. La hemina o el Fe procedente de la hemoglobina y la mioglobina durante la hemólisis actúan como catalizadores lipídicos en paralelo a la formación de óxidos, peróxidos de H y radicales de hidroxilo oxidando los lípidos localizados en el músculo. Estos catalizadores tienen una gran importancia en la fase de iniciación de la oxidación lipídica, ya que los iones metálicos, como el Fe, actúan como sustrato para enzimas como la lipoxigenasas, principal enzima en la oxidación de lípidos cuyo efecto es la formación de hidroperóxidos, iniciando y acelerando el proceso de oxidación (Undeland, 2001). También, indicar que como muestras para la medición de los TBARs se tomó músculo blanco, este tiene una baja concentración de pro-oxidantes, entre los que cabe destacar la hemoglobina, por lo que los niveles de oxidación lipídica son menores con respecto a otras zonas del pescado como la piel y el músculo rojo. Aún así los filetes obtenidos en los tres grupos tenían una baja concentración de músculo rojo en relación al blanco, por lo que la selección del músculo blanco es correcta en la medición de TBARs para nuestra experiencia. Además, hay que añadir que al mantener los pescados en hielo prolonga el tiempo de coagulación mejorando el desangrado, reduciéndose aún más el volumen de sangre,

como indicó Olsen *et al.*, (2006). En conclusión, podemos indicar que el desangrado tiene un efecto positivo en la calidad del filete, ya que reduce el efecto de la oxidación lipídica, el cual junto a la degradación microbiológica es una de las principales causas del deterioro.

3.5. Determinación de la bacteria *S. putrefaciens*

Con respecto a la determinación de la *S. putrefaciens* no fue detectada su presencia durante los primeros 11 días de almacenamiento en hielo en condiciones aeróbicas. Estos resultados se contradicen con los obtenidos por Poli *et al.*; (2004); Paleologos *et al.*; (2003); Taliadourou *et al.*, (2003), en los cuales se detectaba la presencia de la *S. putrefaciens* en lubina en los primeros 13 días de almacenamiento, en concentraciones bajas (0,5 y 1 log₁₀⁻¹). Esto puede deberse a varios factores, el primero es el tiempo de almacenamiento, como se ha observado en los trabajos nombrados anteriormente, la *S. putrefaciens* alcanza el 90% de la microflora a partir del día 14. También, las condiciones ambientales son diferentes, la temperatura media en Canarias oscila entre 18 y 23° C, mientras que en la zona del mediterráneo se producen altas variaciones, en verano (21-27° C) y en invierno (10-15° C), lo que puede llegar a condicionar un aumento de la presencia de la *S. putrefaciens*. Además, se ha observado que en otras especies de aguas templadas como el carbonero (*Pollachius virens*) y el eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) no se ha detectado la presencia de la *S. putrefaciens* hasta los 13-14 días de conservación en hielo (Karl y Meyer, 2007). Cabe destacar que no hemos detectado la presencia de *S. putrefaciens* en lubina cuando se ha conservado sin eviscerar en hielo, pero en pruebas anteriores realizadas se detectó en altas concentraciones en filetes de lubina conservados durante varios días en hielo, siendo lógico ya que el filete está expuesto

a un medio aeróbico en todo momento acelerándose el proceso de difusión de enzimas bacterianas hacia el interior del músculo y de la difusión externa de nutrientes, aumentando exponencialmente la *S. putrefaciens*. Como resultado de lo expuesto anteriormente, podemos llegar a la conclusión de que la presencia de la bacteria *S.putrefaciens* en lubina entera es prácticamente nula durante los primeros 11 días de conservación en hielo, mientras que si es fileteado su concentración es alta. A su vez no se ha observado efecto del desangrado.

Conclusión

- La concentración de 47 mg CO₂/L en combinación con el frío es la concentración de CO₂ idónea para el aturdimiento, ya que es una concentración intermedia, ni es baja como la de 25 mg CO₂/L que supone un aturdimiento muy lento, ni es excesivamente alta como la de 70 mg CO₂/L que no llega a alcanzar la inconsciencia en un alto porcentaje de los individuos.
- La temperatura de 4°C es la idónea para aturdir a la lubina ya que el tiempo de aturdimiento es menor, todos los peces llegan a la inconsciencia y el grado de agresividad es ligeramente menor que en las otras dos temperaturas.
- El desangrado no solo mejora el aspecto visual sino la calidad en los primeros 11 días de conservación en hielo. A su vez para la medición de la sangre residual en filete se debe realizar un estudio conjunto de la observación visual, la medición del color y la hemoglobina, para obtener resultados competentes y debatibles.
- El aturdimiento con 4°C de temperatura y 47 mg CO₂/L mejora la textura y por tanto la calidad del producto durante los primeros 11 días de conservación en hielo.

- La bacteria *S. putrefaciens* no fue detectada durante los primeros 11 días de almacenamiento en hielo en condiciones aeróbicas en lubina (*Dicentrarchus labrax*).

Referencias

Abe, H., Okuma, E. 1991. Effect of temperature on the buffering capacities of histidine-related compounds and fish skeletal-muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57 (11), 2101-2107.

Acerete, L., Reig, L., Alvarez, D., Flos, R., Tort, L. 2009. Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 287 139–144.

Alvarez, M.J., López-Bote, C.J., DiezIEZ, A., Corraze, G., Arzel, J., Dias, J., Kaushik, S. y Bautista, J.M., 1998. “Dietary fish oil and digestible protein modify susceptibility to lipid peroxidation in the muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *British Journal of Nutrition*. 80, 281-289.

Ana, B.C., y Francisco P.P. Hemopigmentos. En: *Principios de la fisiología animal*. Ed. Síntesis, Madrid, España, 1998. pp. 143-145.

Ana, B.C., Francisco P.P., Salvador, B.D., Lambooij, B., Kloosterboer, K., Gerritzen, M.A., Andre, G., Veldman, M. 2006. Electrical stunning followed by decapitation or chilling of African catfish (*Clarias gariepinus*): assessment of behavioural and neural parameters and product quality. *Aquaculture Research*, 2006, 37, 61-70.

Anon. 1995. The welfare of animals (*Slaughter or Killing*) Regulations 1995. Statutory Instrument 1995 No. 731. HMSO, London.

Anon. 1995. Operating Manual for the Product Certification Schemes for Scottish Quality Farmed and Smoked Scottish Quality Salmon. Scottish Quality Salmo Ltd, Inverness.

Apromar, Informe anual, 2011.

Aubourg, P., y Sotelo, C. G. 1997. Quality assessment of sardines during storage by measurement of fluorescent compounds. *Journal of Food Science* , Vol. 62 Issue 2, 295.

Ayala, M.D., García, A., Abdel, I., Ramírez, Z.G. 2010. Effect of thermal treatment on muscle tissue structure and ultrastructure of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* . *Aquacult Int* 18, 1137–1149.

Ayala, M.D., López, O., Blanco, A., García, A., Abellán, E., Ramírez, Z.G. 2005. Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., after cooking and freezing. *Aquaculture*, 250, 215-231.

Bernier, N J ., and Randall, D J. 1994. Carbon dioxide anaesthesia in rainbow trout: effects of hypercapnic level and stress on induction and recovery from anaesthetic treatment . *Journal of Fish Biology* vol. 52, no. 3, 621-637

Buttkus, H. 1963. Red and White muscle of fish in relation to rigor Mortis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* vol. 20, no. 1, 45-58.

Caballero, M.J., Betancor, M., Escrig, J.C., Montero, D., Espinosa de los Monteros, A., Castro, P., Ginés, R., Izquierdo, M. 2009. Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* 291, 210-216.

Caronell, I., Durán, L., Izquierdo, L., Costell, E. 2003. Textura of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Instrumental and sensory measurement. *Journal of Texture Studies*. 34, 203-217.

- Cecchini, S., Saroglia, M., Caricato, G., Terova, G., Sileo, L. 2001. Effects of graded environmental hypercapnia on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) feed intake and acid/base balance. *Aquaculture Research*, 32, 499-502.
- Clark, E.M., Mahoney, A.W., Carpenter, C.E. 1995. Heme and Total Iron in Ready-to-Eat Chicken. *J. Agric. Food Chem.* 45, 124-126.
- Conell, J. J. Control of fish quality. En: Fishing News Books, Oxford, UK, 1995.
- Dalgaard, P. 1995. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *Food Microbiology* 26, 305-317.
- Dalgaard, P. 1995. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Food Microbiology* 26, 319-333.
- Erikson, U. 2008. Live Chilling and Carbon Dioxide Sedation at Slaughter of Farmed Atlantic Salmon: A Description of a Number of Commercial Case Studies. *Journal of Applied Aquaculture*, Vol. 20.
- Erikson, U. Rigor Measure. En: *Farmed Fish Quality*. Ed. S.C.Kestin and P.D.Warris. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, 2001. pp: 283-297.
- Erikson, U., Hultmannb, L., Steenc, J.E. 2006. Live chilling of Atlantic salmon (*Salmo salar*) combined with mild carbon dioxide anaesthesia I. Establishing a method for large-scale processing of farmed fish. *Aquaculture* 252, 183– 198.
- Erikson, U., Misimi, E., Fismen, B. 2010. Bleeding of anaesthetized and exhausted Atlantic salmon: body cavity inspection and residual blood in pre-rigor and smoked fillets as determined by various analytical methods. *Aquaculture Research*, 41, 496-510.

Erikson, U., Sigholt, T., Rustad, T., Einarsdottir, I.E., Jorgensen, L. 1999. Contribution of bleeding to total handling stress during slaughter of Atlantic salmon. *Aquaculture International* 7, 101–115.

FAO. Departamento de Pesca y Acuicultura.

Ginés, R., Palicio, M., Zamorano, M.J., Argüello, A., López, J.L., Afonso, J.M. 2002. Starvation before slaughtering as a tool to keep freshness attributes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture International* 10, 379-389.

Ginés, R., Valdimarsdottir, T., Sveinsdottir, K., Thorarensen, H. 2004. Effects of rearing temperature and strain on sensory characteristics, texture, colour and fat of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Food Quality and Preference* 15, 177–185.

Gram, L. 1990. The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 10, 303-316.

Grottum, J.A., y Sigholt, T. 1996. Acute toxicity of carbon dioxide on European seabass (*Dicentrarchus labrax*): Mortality and effects on plasma. *Comparative Biochemistry and Physiology* 115 (4), 323-327

Hozbor, M.C., Saiz, A.I., Yeannes, M.I., Fritz, R. 2006. Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). *LWT* 39, 99–104.

Huidrobo, A., Pastor, A. 2001. Washing effect on the quality index method (QIM) developed for raw Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) . *Eur. Food Res. Technol.* 212, 408–412.

- Huidrobo, A., Pastor, A., Tejada, M. 2000. Quality Index Method Developed for Raw Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Journal of Food Science, Vol. 65, No. 7.
- Hultin, H.O. 1992 Biochemical deterioration of fish muscle. Developments in food science, Vol. 30, 125-138.
- Iwamoto, M., Yamanaka, H., Watabe, S., Hashimoto, K. 1987. Effect of storage-temperature on rigor-mortis and ATP degradation in plaice *Paralichthys-olivaceus* muscle. Journal of Food Science 52, 1514-1517.
- Johansson, L. Sensory Analysis. En: Farmed Fish Quality. Ed. S.C.Kestin and P.D.Warris. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, 2001. pp:335-339.
- Karl, H., Meyer, C., Digre, H., Erikson., U., Misimi. E., Lambooi, B., Van de Vis, H. 2010. Electrical stunning of farmed Atlantic cod *Gadus morhua*: a comparison of an industrial and experimental method. Aquaculture Research, 41, 1190-1202.
- Karl, H., y Meyer, C. 2007. Effect of Early Gutting on Shelf Life of Saithe. Journal of Consumer Protection and Food Safety.
- Kestin, S., Wottom, S., Adams, S. 1995. The effect of CO2 concussion or electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on fish welfare. Abstract of poster for Aqua Nor'95, Trondheim, Norway 9 to 12 August 1995. EAS Especial Publication 23, EAS, Gent, Belgium, p.380.
- Kestin, S.C., Van de Vis, J.W., Robb, D.H.F. 2002. Protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of methods use to stun and kill them. Veterinary Record, 150, 302.

Kestin, S.C., Wotton, S.B., Gregory, N.C. 1991. Effect of slaughter by removal from water on visual evoked activity in the brain and reflex movement of rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Record*, 128, 443-6.

Knowles, T.G., Brown, S.N., Warriss, P.D., Lines, J., Tinaewo, A., Bravo, A., Carvalho, H., Goncalves, A. 2007. Effect of electrical stunning at slaughter. *Aquaculture Research*, 38, 1732-1741.

Korhonen, Reino, W., Lanier, T.C., Giesbrecht, F. 1990. An Evaluation of Simple Methods for Following Rigor Development in Fish. *Journal of Food Science*, Vol. 55 Issue 2, 346-348.

Kyranas, V.R., y Lougovois, V.P. Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 319-328.

Lambooy, B., Gerritzen, M.A., Reimert, H., Burggraaf, D., Ancre, G. 2008. Evaluation of electrical stunning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Research*, 2008, 39, 50-58.

Lefrancois, C. y Domenici, P. 2006. Locomotor kinematics and behaviour in the escape response of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to hypoxia. *Marine Biology* 149, 969–977.

Olsen, S.H., Sorensen, N.K., Larsen, R., Elvevoll, E.O., Nilsen, H. 2008. Impact of pre-slaughter stress on residual blood in fillet portions of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) - Measured chemically and by Visible and Near-infrared spectroscopy. *Aquaculture* 284, 90–97.

Olsen, S.H., Sorensen, N.K., Stomo, S.K., Elvevoll, E.O. 2006. Effect of slaughter methods on blood spotting and residual blood in fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 258, 462–469.

Paleologos, E.K., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. 2004. Biogenic amine formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiology*, 549–557.

Parisi, G., Franci, O., Poli, B.M. 2002. Application of multivariate analysis to sensorial and instrumental parameters of freshness in refrigerated sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during shelf life. *Aquaculture* 214, 153–167.

Periago, J., Ayala, D., Lopez-Albors, O., Ab el, I., Martinez, C., Garcia-Alcazar, A., Ros, G., Gil, F. 2005. Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, Vol. 249 Issue 1-4, 175-188

Pickett, G.D., Pawson, M.G. 1994. *Sea Bass Biology, exploitation and conservation*.

Poli, B.M., Parisi, G., Scappini, F., Zampacavallo, G. 2005. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter management. *Aquaculture International* 13, 29–49.

Poli, B.M., Parisi, G., Scappini, F., Zampacavallo, G., Borderías, A.J., Sánchez-Alonso, I. 2011. First Processing Steps and the Quality of Wild and Farmed Fish. *Journal of Food Science* Vol. 76, Nr. 1.

Robb, D.H.F. Measurement of Fish Flesh Colour. En: *Farmed Fish Quality*. Ed. S.C.Kestin and P.D.Warris. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, 2001. pp 298-306.

Robb, D.H.F. Phillips, A.J., Kestin S.C. 2003. Evaluation of methods for determining the prevalence of blood spots in smoked Atlantic salmon and the effect of exsanguinations method on prevalence of blood spots. *Aquaculture* 217, 125– 138.

Robb, D.H.F. The Relationship Between Killing Methods and Quality. En: *Farmed Fish Quality*. Ed. S.C.Kestin and P.D.Warris. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, 2001. pp: 220-233.

Robb, D.H.F. Welfare of Fish at Harvest. En: *Fish Welfare*. Ed. Edward J.Branson. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2008. pp. 217-240.

Robb, D.H.F., Wottom, S.B., Mckinstry, J.L., Sorensen, N.K., Kestin, S.C. 2000. Commercial slaughter methods used on Atlantic salmon: determination of the onset of brain failure by electroencephalography. *The Veterinary Record*, September 9,

Robb, D.H.F., y Roth B. 2003. Brain activity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following electrical stunning using various field strengths and pulse durations. *Aquaculture* 216, 363–369.

Roth, B., Imstrand, A., Gunnarsson, S. 2007. Slaughter quality and rigor contraction in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*); a comparison between different stunning methods . *Aquaculture* 272, 754–761.

Roth, B., Obach, A., Hunter, D., Nortvedt, R., Ovarzun, F. 2009. Factors affecting residual blood and subsequent effect on bloodspotting in smoked Atlantic salmon fillets. *Aquaculture* 297, 163–168.

Roth, B., Schelvis- Smit, R., Stien, L.H., Foss, A., Nortvedt, R., Imstrand, A. 2007. Exsanguination of Turbot and the Effect on Fillet Quality Measured Mechanically,

by Sensory Evaluation, and with Computer Vision. Journal of Food Science Vol. 72, Nr. 9.

Roth, B., Slinde, E., Robb, D.H.F. 2006. Field evaluation of live chilling with CO₂ on stunning Atlantic salmon (*Salmo salar*) and the subsequent effect on quality. Aquaculture Research, 37, 799-804.

Roth, B., Torrissen, O.J., Slinde, E. 2005. The effect of slaughtering procedures on blood spotting in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 250, 796– 803.

Sankar, C.N.R., Lalitha, K.V., Jose, L., Manju, S., Gopal, T.K.S. 2008. Effect of packaging atmosphere on the microbial attributes of pearlspot (*Eetroplus suratensis Bloch*) stored at 0–2°C. Food Microbiology 25, 518–528.

Sigurgisladottir, S., Hafsteinsson, H., 1999. Textural properties of raw salmon fillets as related to sampling method. Journal of Food Science, Vol. 64, 99.

Taliadourou, D., Papadopoulos, V., Domvridou, E., Savvaidis, I.N. 2003. Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. J Sci Food Agric 83, 1373–1379.

Tejada, M., Huidobro, G., Mohamed, G.F. 2006. Evaluation of Two Quality Indices Related to Ice Storage and Sensory Analysis in Farmed Gilthead Seabream and Seabass. Food Science and Technology International.

Torrissen, O.J., Sigurgisladottir, S., Slinde, E. Texture and Technological Properties of Fish. En: Farmed Fish Quality. Ed. S.C.Kestin and P.D.Warris. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, 2001. pp: 42-57.

Tzikas, Z., Ambrosiadis, I., Soultos, N., Georgakis, S. 2007. Quality assessment of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) and blue jack mackerel (*Trachurus picturatus*) during storage in ice. *Food Control* 18, 1172–1179.

Undeland, I. Lipid Oxidation in Fatty Fish During Processing and Storage. En: *Farmed Fish Quality*. Ed. S.C.Kestin and P.D.Warris. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, 2001. pp: 261-275.

Undeland, I., Arkoudelos, J., Stamatib, N., Samarasa, F. 2007. Quality attributes of farmed eel (*Anguilla anguilla*) stored under air, vacuum and modified atmosphere packaging at 0 °C. *Food Microbiology* 24, 728–735.

Undeland, I., Arkoudelos, J., Stamatib, N., Samarasa, F., Grottum, J.A., Sigholt, T. 1996. Acute Toxicity of Carbon Dioxide on Seabass (*Dicentrarchus labrax*): Mortality on Plasma Ions. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 115A, No. 4, 323-727.

Van de Vis, H., Kestin, S., Robb, D., Oehlenschlager, J., Lambooi, B., Munkner, H., Kloosterboer, M., Tejada, A., Huidrobo, H., Ottera, B., Roth, N., Sorensen, L., Akse, H., Byrne, P., Nesvada. 2003. Is humane slaughter of fish possible for industry?. *Aquaculture*.

Yamaguchi, K., Nakamura, T., Toyomizu, M. 1984. Preferential lipid oxidation in the skin of round fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, Vol. 50, no. 5, 869-874.

Yokoyama, Y., Yoshikawa, H., Ueno, S., Mitsuda, H. 1989. Application of CO sub-anesthesia combined with low temperature for long-term anesthesia in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, Vol 55, No. 7, 1203-1209.