

Sensor colorimétrico para el monitoreo del deterioro del pescado

Angélica Domínguez Aragón

Centro de investigación en Materiales Avanzados
angelica.dominguez @cimav.edu.mx

Jorge Luis Olmedo Martínez

Centro de investigación en Materiales Avanzados
Jorge.olmedo@cimav.edu.mx

Claudia Alejandra Hernández Escobar

Centro de investigación en Materiales Avanzados
Jorge.olmedo@cimav.edu.mx

Erasto Armando Zaragoza Contreras

Centro de investigación en Materiales Avanzados
armando.zaragoza @cimav.edu.mx

Temática general: Materiales

Resumen

Se desarrolló un método colorimétrico basado un copolímero de *orto*-fenilendiamina-*co*-anilina para su aplicación en un sensor óptico que detecte la presencia de la variedad de aminas volátiles (bases volátiles nitrogenadas totales (NBVT)) que son producidas durante el proceso de deterioro del pescado (mojarra tilapia), con el propósito de poder indicar su grado de frescura. Este copolímero fue sintetizado por medio de polimerización vía oxidativa. Se utilizó un enfoque cinético para correlacionar la respuesta al amoníaco, dimetilamina y trimetilamina del copolímero con el del deterioro del pescado. Los niveles de NBVT y patrones de crecimiento microbiano (*Pseudomonas spp*) en filetes de pescado (tilapia) en proceso de deterioro correlacionaron bien con los cambios de color del sensor. Estas respuestas permitieron monitorear en tiempo real el proceso de deterioro en condiciones de refrigerador (10°C). Por lo que el copolímero *orto*-fenilendiamina-*co*-anilina es un apropiado material funcional para ser utilizado como un sensor químico colorimétrico para determinar en tiempo real la frescura del pescado (tilapia) y determinar si tiene la frescura adecuada para ser consumido.

Palabras clave: Aminas volátiles, sensor de la frescura del pescado, *orto*-fenilendiamina-*co*-anilina

Abstract

A colorimetric sensor based on a copolymer of *ortho*-phenylenediamine-co-aniline to detect volatile amines (total volatile basic nitrogen, TVBN) was developed. The amines are produced during the fish spoilage process of tilapia; thus, the sensor's propose is to indicate the freshness. The copolymer was synthesized by oxidative pathway. The levels of T-VBN and microbial growth patterns (*Pseudomonas spp*) in tilapia fillets in spoilage process correlated well with the copolymer color change. These responses allowed to monitor in real time the tilapia spoilage process in refrigerated conditions (10°C). So that, *ortho*-phenylenediamine-co-aniline is appropriate as functional material to be used as a colorimetric chemical sensor to determine in real time the fish freshness (tilapia) and thus, determine if the fish has the enough freshness for be consumed.

Keywords: Volatile amines, fish freshness sensor, orto-Phenylenediamine-co-aniline

Introducción

La calidad y el control de la frescura son fundamentales para la industria alimentaria, ya que estos atributos determinan en gran medida la aceptación del consumidor. La frescura del pescado es fundamental para su calidad; ésta depende de varios factores como: temperatura, tiempo de anaquel, tipo de muerte y procesamiento. La frescura y calidad del producto final son dependientes de diferentes cambios que ocurren después de la muerte del pescado, tales como físicos, químicos, bioquímicos y microbiológicos (Bremner and Sakaguchi, 2000)

En los productos marinos, el número de microorganismos en la superficie de la piel y las branquias, conocidos como organismos de deterioro específicos (SSO), aumentan gradualmente después de la muerte y se extienden dentro de los diversos tejidos (Hamada-Sato et al., 2005). Estos microorganismos son generalmente *Pseudomonas spp* (Gram and Huss, 1996), las cuales se han utilizado con éxito para la predicción de la vida de pescado fresco almacenado aeróbicamente (Taoukis et al., 1999). Las aminas volátiles tales como trimetilamina (TMA), dimetilamina (DMA) y NH₃ (amoníaco) son productos de la degradación microbiana, y la combinación de éstas se conoce como bases volátiles nitrogenadas totales (NBVT), estos son los responsables del olor y sabor característico en el pescado después de haber pasado la fase inicial de frescura.

Por lo tanto, los niveles de NBVT son un indicador potencial del deterioro del pescado (Pacquit et al., 2006) debido a que estos compuestos volátiles son básicos (pH > 6). Un índice de calidad y de gran importancia es el pH, ya que éste indica el inicio de las actividades propias de la degradación. Para la determinación del NBVT, tradicionalmente se utilizan métodos basados en la microdifusión o en la destilación, sin embargo, estos métodos pueden ser costosos, y consumen tiempo.

Entre los polímeros conductores, la polianilina (PAni), ha recibido un gran interés debido a su alta conductividad, buena reversibilidad redox, reversibilidad de dopaje ácido/dedopaje básico, propiedades opto-electrónicas y estabilidad en el medio ambiente (Bhadra et al., 2009). Estas propiedades son favorables para diversas aplicaciones, tales como supercapacitores, celdas solares, sensores y recubrimientos anticorrosivos (I. Iwuoha, 2012).

En el presente trabajo se reporta el sensado de la frescura del pescado, usando por primera vez, un sensor basado en *orto*-fenilendiamina-*co*-anilina. La especie estudiada fue Tilapia (*Cichlidae family*). El funcionamiento del sensor se basa en el cambio de color del copolímero (de rojo a Amarillo) causado por la absorción de las aminas generadas (trimetilamina, dimetilamina y amoniaco) durante el proceso del deterioro del pescado refrigerado a 10°C. El cambio de color está relacionado con el proceso de protonación-deprotonación del copolímero y fue corroborado por espectroscopia de UV-Vis.

Desarrollo

Síntesis de *o*-fenilendiamina-*co*-anilina

El copolímero de *o*-fenilendiamina-*co*-anilina se sintetizó en solución utilizando como agente oxidante persulfato de amonio (APS), se utilizó una relación molar 1:1 de los monómeros y como dopante ácido clorhídrico 1:1 con respecto a la anilina y 2:1 con respecto a la *o*-fenilendiamina, y el persulfato de amonio (APS) en una relación molar 1:1.25 con respecto a los monómeros.

En un vaso (vaso 1) se mezcló 0.01 moles (1 g) de anilina con 0.01 moles de HCl (1.08 g), en otro vaso (vaso 2) se mezcló 0.01 moles (1.16 g) de *o*-fenilendiamina con 0.02 moles (2.16g) de HCl. En un vaso de precipitado (250 mL), provisto con agitación magnética se colocaron 90 mL de agua destilada, y la sal de anilinio (vaso 1), así como la sal de *o*-fenilendiamina (vaso 2), se agitó por 10 min a temperatura ambiente; posteriormente se agregó 0.026 moles (6.11g) de APS, disuelto en 10 mL de agua destilada y se polimerizó por 24 h a una temperatura de 4°C. El producto se purificó por medio de lavados con una solución de ácido clorhídrico (0.1 M).

Aplicación de las películas sobre sustrato de acetato

Se utilizó como sustrato una hoja de acetato de 1 x 0.5 cm². Se aplicó una capa del copolímero previamente sintetizado sobre el sustrato por medio de "spray coating" tratando que quedara de manera uniforme, tal y como se muestra en la *Figura 1*.



Figura 1. Sensor de *o*-fenilendiamina-*co*-anilina

Respuesta colorimétrica al pH

Para conocer el efecto del pH en el comportamiento óptico de la polianilina y C-C se realizó un estudio variando el pH de 1 a 13.

Se disperso 0.5 g de polímero sintetizado en 10 mL de N-metil pirrolidona, después se agregó una gota de solución preparada en 5 mL de solución acuosa ácida o básica pH específico (1-13) y por último se midió la absorbancia de cada solución con un espectrofotómetro en una longitud de onda de 200 a 1100 nm.

Respuesta colorimétrica al vapor de aminas (NH₃, DMA, TMA)

Preparación de las soluciones de aminas:

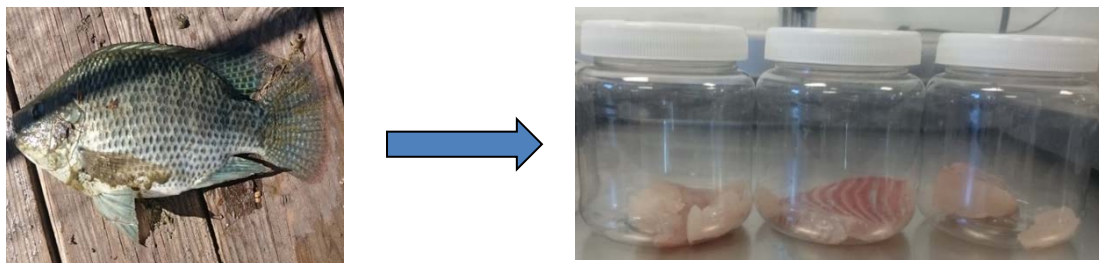
Se preparó una solución de cloruro de amonio 1 M, y se añadió hidróxido de sodio 0.4 M para generar vapor de amoníaco, se ajustó el pH de la solución con el hidróxido de sodio y se prepararon 3 soluciones de pH 8, 9 y 10. Se repitió el procedimiento con el clorhidrato de dimetilamina y clorhidrato de trimetilamina para obtener vapor de dimetilamina y trimetilamina, ajustando el pH de las soluciones a 8, 9 y 10.

La respuesta del copolímero a las aminas volátiles en términos de su cambio de color se realizó usando mediciones de absorbancia. Se colocó la película del polímero 1 cm encima de 20 mL de la solución de amina previamente preparada por 5 min y se midió la absorbancia con un espectrofotómetro en un rango de longitud de onda de 200 a 1100 nm. Se repitió el procedimiento con tiempos de 15, 30, 45 y 60 min con el fin de conocer el tiempo de respuesta colorimétrica a la exposición de los diferentes vapores de aminas con diferentes concentraciones.

Prueba del deterioro del pescado

Se obtuvo un pescado recién capturado (mojarra tilapia) de una granja acuícola ubicada en Ciudad Aldama, Chihuahua, fue fileteado y dividido en 5 partes. Cada parte (20 g) de muestra fue metida asépticamente en un contenedor esterilizado de 250 mL. Un sensor fue pegado en la tapa del recipiente, a 5 cm encima de la muestra de pescado. Todas las muestras fueron almacenadas en un refrigerador a 10 °C, el color del sensor de la primera muestra fue analizado después de 24 h, la segunda después de 48 h y así sucesivamente hasta 96 h.

La respuesta de los sensores a las aminas volátiles generadas por el proceso de descomposición del pescado en términos de su cambio de color se realizó usando mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro en el intervalo de 200 a 1100 nm.



Simultáneamente a la prueba del deterioro del pescado el nivel de nitrógeno básico volátil total (NBVT) fue medido por el método de destilación y también se realizó un análisis microbiológico del crecimiento de *Pseudomonas spp* con respecto al tiempo.

Resultados

Respuesta colorimétrica al pH

En el espectro electromagnético de absorción a pH de 1, se observan 3 pequeñas bandas alrededor de 420, 450 y 490 nm (rojo). De pH 2 a 4 la banda de 490 nm se desplaza a 480 nm, conservando las bandas de 420 y 450 nm (naranja). En pH 5 desaparecen las dos bandas de 450 y 480 nm, dejando sólo una banda alrededor de 430 nm (naranja), y en el intervalo de pH de 6 a 13 es observado un corrimiento de esta única banda de absorción de 434 nm a 415 nm (amarillo) (*Figura 2*).

Las tres bandas de absorción apreciadas en pH de 1-4 fueron adscritas a: La primera (420 nm) es la existencia de unidades iminas en el anillo quinoide, la segunda (450 nm) a la transición $n-\pi^*$ de los anillos de fenazina conjugados, y la última (480-490 nm) debido a una transición de transferencia de carga en el anillo quinoide (Stejskal, 2015).

Los espectros de absorción de C-C en estado dedopado a pH de 5 a 13 muestran una única banda de absorción alrededor entre 415 y 430 nm, la cual fue atribuida a la excitación polarónica de anillo benzoide al quinoide (Al-Hussaini et al., 2017).

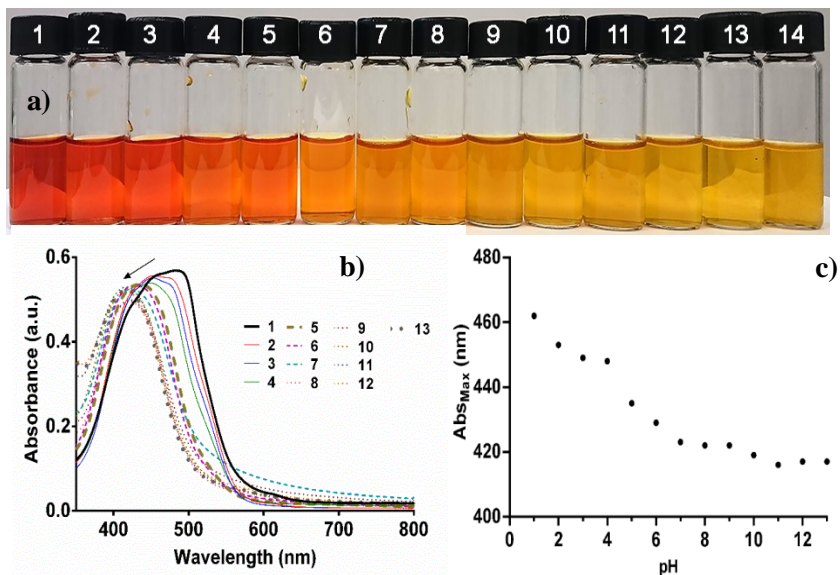


Figura 2. a) Colores de C-C de pH 1-13, b) espectros de UV-vis de C-C de pH 1-13, c) longitud de onda del pico máximo de los espectros de UV-vis de C-C de pH 1-13

Respuesta colorimétrica al vapor de aminas (NH₃, DMA, TMA)

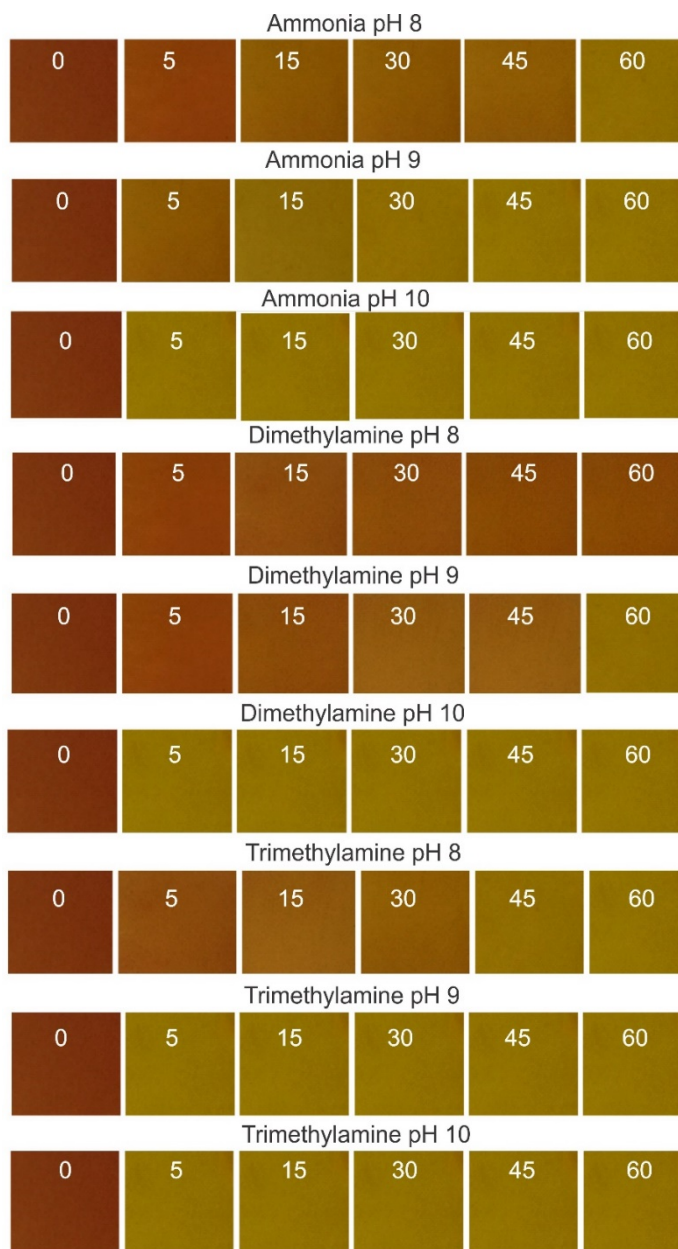


Figura 3. Respuesta colorimétrica de C-C al vapor de aminas con respecto al tiempo

En la *Figura 3* se muestra la respuesta colorimétrica de C-C de los diferentes vapores de aminas con respecto al tiempo. El pH de los vapores de aminas fue suficiente para generar un pH en el medio suficiente para desprotonar al copolímero y obtener C-C base y así, de esta manera, observar el cambio de rojo a amarillo, por ejemplo, las moléculas de amoníaco toman protones del copolímero protonado, formando amonio energéticamente favorable (NH₄⁺). Esto provoca la transición del copolímero en su forma dopada (rojo) a su forma dedopada (amarillo) (*Figura 4*).

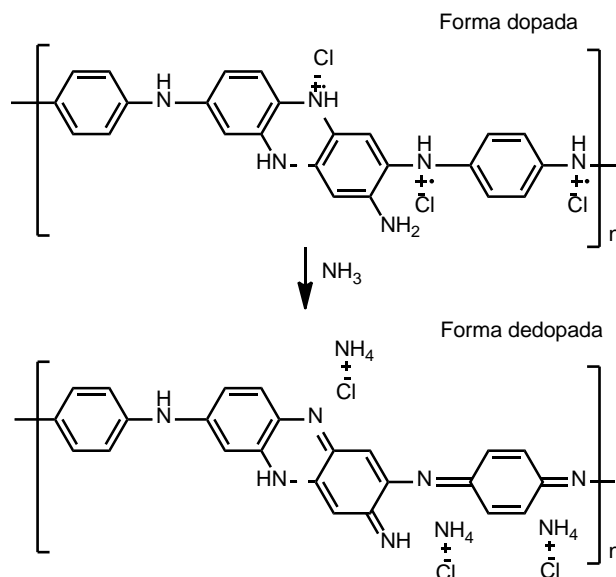


Figura 4. Representación esquemática de la reacción química de C-C con amoniaco

También se observa que las tonalidades entre rojo-amarillo variaron dependiendo de la amina, así como el tiempo de exposición.

Prueba del deterioro del pescado

Los niveles de NBVT y UFC/g (*Pseudomonas* spp) fueron usados como indicadores para determinar la frescura del pescado, y correlacionar estos niveles con la respuesta óptica de los sensores.

En la *Figura 5* se muestra que el valor de inicial de NBVT del pescado fresco fue de 8.25 mg/100 g y luego aumentó hasta 54.54 mg/100 g al 4° día de almacenamiento.

De acuerdo con la unión europea (Comission decision 1995-95/149/EEC) el límite de consumo de NBVT es 25-35 mg/100 g. Este nivel es alcanzado a las 53 h de almacenamiento, tal y como se muestra en la *Figura 5*. Esto implica que, de acuerdo con este análisis, la muestra de tilapia pasa al nivel de rechazo pasando el segundo día de almacenamiento.

Con respecto al análisis microbiológico, se observó un crecimiento exponencial con respecto al tiempo (*Figura 5*) el valor inicial del pescado fresco fue de 3.1×10^3 UFC/g, aumentando hasta 1.58×10^{15} UFC/g en el 4° día de almacenamiento. Según estudios realizados (Koutsoumanis, 2001), el nivel de rechazo es alcanzado en valores de 107 UFC/ g de *Pseudomonas* spp, en el presente estudio este nivel fue alcanzado pasando las 48 h de almacenamiento, al igual que el límite de NBVT (25 mg/100g), esto se debe al hecho de que la generación de bases volátiles está relacionada directamente con el aumento de la población microbiana. Por lo tanto, el análisis microbiológico confirma que el límite de aceptación es dentro de las primeras 48 h de almacenamiento, pasando este periodo alcanza el nivel de rechazo, por lo tanto, no es apto para ser consumido.

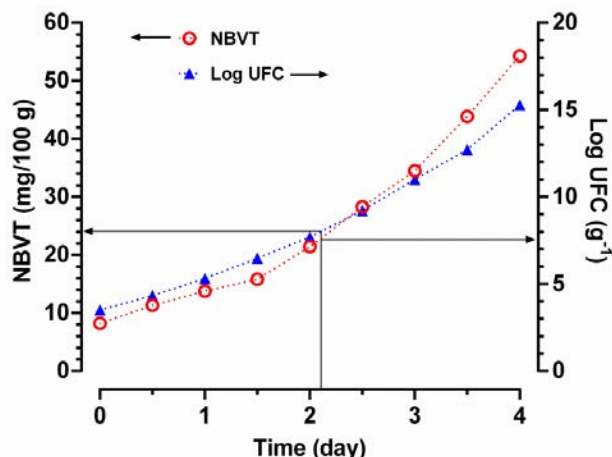


Figura 5. Cambios de valores de UFC de *Pseudomonas* spp, NBVT de tilapia con respecto al tiempo de almacenamiento a 10°C.

Con respecto a las mediciones del cambio de color del sensor, dentro de las primeras 48 h de exposición se mantiene en tonalidad rojo-naranja, a las 72 h se observa un cambio de color a amarillo, esto se ve claramente reflejado en los espectros de UV-vis (*Figura 6*) donde se puede observar que desaparecen las bandas de 470 y 450 nm dejando sólo una banda a 430 nm. Cabe destacar que cuando en los espectros sólo se observa la banda de 430 nm implica que ocurrió un dedopaje en el copolímero por el incremento de NBVT, tal y como se mencionó en la sección de sensado de aminas.

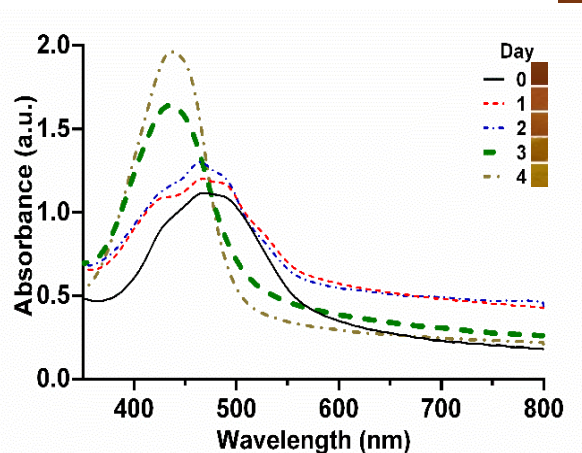


Figura 6. Espectros de C-C en diferentes tiempos de exposición (días)

Se hizo una correlación del nivel NBVT con la respuesta del sensor (*Figura 7*), como ya se mencionó anteriormente, de acuerdo con lo analizado, al tercer día de almacenamiento pasa al nivel de rechazo.

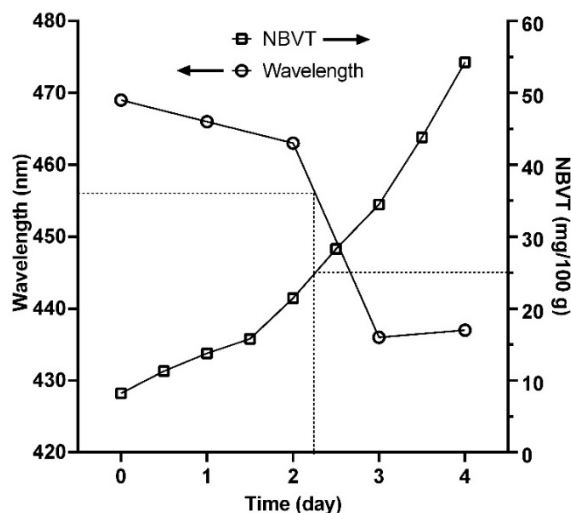


Figura 7. Correlación del nivel de NBVT con la respuesta del sensor de C-C con respecto al tiempo

El sensor presentó un cambio en sus espectros del segundo al tercer día, ya que la banda máxima cambió de posición, debido a esto, se puede decir que éste sensor sí respondió a las aminas generadas por el proceso de descomposición del pescado, y se ve claramente que los cambios de color indicaron cuándo el pescado está fresco y cuándo no (Figura 8), por lo que puede funcionar como un sensor óptico indicador de frescura.

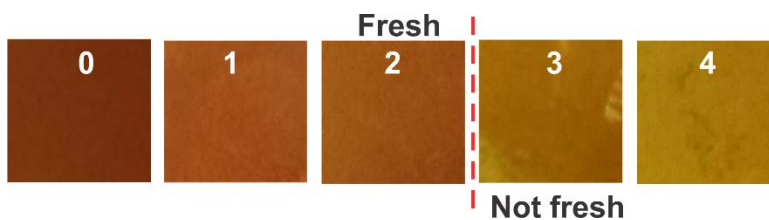


Figura 8. Respuesta colorimétrica de C-C con respecto al tiempo (días)

Así, el copolímero respondió con precisión al incrementar la concentración de bases volátiles, ya que el cambio de color está relacionado con los niveles más altos de población microbiana en la muestra de pescado.

Además, los cambios visuales de color son indicadores útiles de una aproximada población microbiana, y por lo tanto, indicadores del deterioro de las muestras de pescado. Claramente, este enfoque puede usarse para indicar la presencia de altas poblaciones microbianas en muestras de pescado e identificar si no es apto para consumirse.

Conclusiones

Las películas de o-fenilendiamina-co-anilina fueron sensibles a las aminas volátiles, con una respuesta lineal a los vapores de amoniaco, dimetilamina y trimetilamina. La respuesta de o-fenilendiamina-co-anilina correlacionó bien con el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas* spp y producción de aminas volátiles (NBVT), es decir, hubo respuesta clara durante y después de pasar los niveles de aceptación de estos indicadores, por lo que películas de este copolímero pueden ser empleadas para monitoreo, en tiempo real, del deterioro de la tilapia. Sensores desarrollados a partir de o-fenilendiamina-co-anilina pueden ser una herramienta muy útil para monitorear el estado del pescado y, de esta manera, prevenir consumirlo cuando ya no tiene el grado de frescura adecuado.

Referencias

- Al-Hussaini, A. S., A. M. Elias, and M. A. Abd El-Ghaffar, 2017, New Poly(aniline-co-o-phenylenediamine)/Kaolinite Microcomposites for Water Decontamination: *Journal of Polymers and the Environment*, v. 25, p. 35-45.
- Bhadra, S., D. Khastgir, N. K. Singha, and J. H. Lee, 2009, Progress in preparation, processing and applications of polyaniline: *Progress in Polymer Science*, v. 34, p. 783-810.
- Bremner, H. A., and M. Sakaguchi, 2000, A Critical Look at Whether 'Freshness' Can Be Determined: *Journal of Aquatic Food Product Technology*, v. 9, p. 5-25.
- Gram, L., and H. H. Huss, 1996, Microbiological spoilage of fish and fish products: *International Journal of Food Microbiology*, v. 33, p. 121-137.
- Hamada-Sato, N., K. Usui, T. Kobayashi, C. Imada, and E. Watanabe, 2005, Quality assurance of raw fish based on HACCP concept: *Food Control*, v. 16, p. 301-307.
- I. Iwuoha, K. M. M. a. P. M. N. a. R. F. A. a. G. M. a. S. M. M. a. N. N. a. M. M. a. P. B. a. E., 2012, Electronics of conjugated polymers (I): polyaniline: *International Journal of Electrochemical Science*, v. 7, p. 1189-11875.
- Koutsoumanis, K., 2001, Predictive Modeling of the Shelf Life of Fish under Nonisothermal Conditions: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 1821-1829.
- Pacquit, A., K. T. Lau, H. McLaughlin, J. Frisby, B. Quilty, and D. Diamond, 2006, Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage: *Talanta*, v. 69, p. 515-520.
- Stejskal, J., 2015, Polymers of phenylenediamines: *Progress in Polymer Science*, v. 41, p. 1-31.
- Taoukis, P. S., K. Koutsoumanis, and G. J. E. Nychas, 1999, Use of time-temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions: *International Journal of Food Microbiology*, v. 53, p. 21-31.