

## **Comportamiento del INDOL en la elaboración de conservas de escombrios**

*Por F. Villalón Villalón y  
B. Sanz Pérez*

El grado de sensibilidad alcanzado en las técnicas analíticas de todo orden, y por lo tanto también en las aplicadas al reconocimiento bromatológico, han permitido estimar ciertos productos en los alimentos que antes sólo eran detectables cuando se encontraban en tal cantidad que casi eran apreciados organolépticamente.

Frecuentemente al revisar la bibliografía en torno a la inspección de pescados se lee en algunos trabajos que el indol es una sustancia cuya presencia se acompaña siempre de putrefacción, lo que se debía indudablemente a la falta de una técnica con la sensibilidad suficiente para estimar cantidades del orden de un  $\mu$ gr. Hoy que ello es posible, el indol puede servir para señalar, en algunos casos, el grado de frescura de ciertos alimentos e incluso sus límites de comestibilidad. En este orden de ideas ha sido separado de la putrescina, tiramina, cadaverina, etc., cuya aparición sí que corresponde a un franco estado de putrefacción. El indol es de presentación más precoz y disponiendo de una técnica de estimación cuantitativa adecuada, no es preciso esperar a que su olor "sui generis" se manifieste en estados de alteración avanzada; cantidades muy parecidas a las que sirven de testigo en la interpretación de esta técnica, que más tarde exponemos, se encuentran en ciertos aceites empleados en perfumería sintética (GORTNER, 1950).

El Instituto de Pescas Marítimas de Francia somete sistemáticamente todos los lotes de conservas lanzados al mercado, tanto de producción nacional como importados, a un control bromatológico analítico. De todos es conocida la imposibilidad de generalizar una técnica para ser aplicada a todos los pescados debido a que los resultados y consiguiente interpretación difieren con las familias e incluso con las especies de peces estudiadas. Así el contenido en óxido de trimetilamina es muy variable y guarda estrecha relación con el habitat, alimentación, clase y especie de pescado, zona de pesca, etc. En el mismo sentido varía la forma reducida de aquél BOURY, (1945). BEATTY, (1938-1939), dan las siguientes cifras: arenque 590 mgrs./100 grs. de pescado; raya 1.100 mgrs./100 grs., caballa 200 mgrs./100 grs.; estas cifras concuerdan con las señaladas por DYER (1952).

Lo que antecede nos explica el que desde hace algún tiempo el control bromatológico de las conservas de escómbridos en Francia incluya la determinación del indol, que es de enorme interés práctico pues permite deducir, a juzgar por los resultados de nuestro trabajo (ver más adelante) la calidad del pescado fresco antes de someterlo a la acción del calor durante la elaboración de la conserva. Esto exige, según SOUDAN, (1950) un conocimiento detallado de la especie objeto de examen ya que el contenido en indol varía en especies diferentes por lo que la interpretación de los resultados analíticos se hará en relación con el tipo de pescado en cuestión. Que se trata de una técnica muy eficaz lo demuestra el hecho de que conservas en las que organolépticamente no puede apreciarse signo alguno de alteración dan cifras de 15 a 20  $\mu$ grs. de indol/100 grs. de pescado, cantidades que siempre de acuerdo con el autor últimamente citado (1961) corresponden a un producto que aunque se libra al consumo está próximo a los límites de comestibilidad; a partir de 30  $\mu$ grs./100 grs. se establece su decomiso y sobrepasando esta cifra puede apreciarse organolépticamente sabor picante, olor ácido, poca consistencia, etc.

El indol es uno de los productos originados a partir del triptófano por acción microbiana; también derivan de este aminoácido por acción microbiana entre otras sustancias las siguientes: triptamina (indoletilamina), triptofol (alcohol indoletílico), (VOLCANI, 1940); ácido indoxílico (HIRAI, 1958); escatol, etc. Los gérmenes indológenos son muy frecuentes en el pescado: CLOUGHT (1923), CLOUGHT *et al.*, (1925) encontraron que en el salmón suponían un 31 por 100 del contaje mi-

crobiano total, señalando que su presentación era casi constante. SOUDAN, (1961) nos ha manifestado que en los contajes microbianos realizados con pescados de diferentes latitudes y sobre todo en los procedentes de aguas templadas o calientes estas especies están presentes en gran cantidad. Todo esto y las posibles contaminaciones por gérmenes indológenos durante la manipulación e industrialización del pescado justifican la importancia de la estimación del indol. DUGGAN y STRASBURGER (1960), estudiaron la correlación entre la cantidad de indol y la carga microbiana de los camarones encontrando un gran paralelismo; SANZ PEREZ (1960) destaca la importancia de estos gérmenes en ciertos mariscos.

Ya se ha dicho que el indol es un producto del metabolismo de algunas especies microbianas que poseen enzimas que hidrolizan el triptófano, más no es este enzima el único agente capaz de alterar la molécula de triptófano (MAILLOUX y TISSET, 1963).

La determinación del indol y su posible papel en la descomposición del pescado fue estudiada por SHTEMBERG y ROKHLINA (1930) con la técnica de CLOUGHT (*loc. cit.*), BOURY (1945) aplicó la misma metodología al control higiénico de las conservas; después fue modificada por WIERZCHOWSKI (1954, 1958) y finalmente, con algunas variaciones, puesta a punto por SOUDAN (*loc. cit.*)

Con el presente trabajo se pretende estudiar el efecto de diferentes temperaturas y tiempos de esterilización industriales sobre el triptófano naturalmente existente en el pescado congelado y la estabilidad del indol frente a los mismos tratamientos industriales.

## PARTE EXPERIMENTAL

*Material y métodos.*—Se utilizaron atunes (*Thynnus alalunga*) procedentes de aguas litorales de Mauritania. Inmediatamente de pescados se congelaron y conservaron a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta su llegada a puerto. El transporte al laboratorio se realizó envolviéndolos en nieve carbónica en cajas metálicas de doble pared.

En el laboratorio se mantuvieron a la misma temperatura citada: Diez ejemplares durante dos años y otros diez sólo dos meses. Transcurrido este tiempo se procede a su descongelación a temperatura de habitación ( $15-17^{\circ}\text{C}$ ) e inmediatamente se evisceran y cortan perpendicu-

larmente al raquis en trozos que permitan su mejor adaptación a botes cilíndricos de 1/5 de hojalata electrolítica. Antes de envasarse se procede a la eliminación de piel y espinas y se enlatan adicionando como cobertura en unos casos 25 ml. de una solución de cloruro sódico al 3 por 100 y en otros la misma salmuera adicionada de indol (en los cuadros correspondientes se señalan cantidades).

Con el fin de estudiar la estabilidad del indol en soluciones tamponadas o no (buffer de fosfato, pH 6) de cloruro sódico se preparó una salmuera al 3 por 100 a la que se adicionaron 10, 20 y 30  $\mu$ grs. de indol por 100 ml. respectivamente. Se envasó en botes idénticos a los empleados para el pescado.

Cerrados los botes que contienen pescado en unos casos y solución de ClNa e indol en otros, se someten a la acción esterilizante del calor (en los cuadros correspondientes se indican tiempos y temperaturas de esterilización) en un autoclave de laboratorio tipo Chamberlain. Terminado el tratamiento, tan pronto como la temperatura desciende a 50° C se someten a refrigeración con agua a 1,5° C en el mismo autoclave; seguidamente sumergiéndolos en agua se comprueban las condiciones del sertido de fondos y tapas y el estado de la sutura lateral para comprobar posibles fugas.

La técnica empleada, como ya se ha dicho, es la de SOUDAN (*loc. cit.*)

#### *Reactivos:*

Cloroformo.

Hidróxido sódico, solución al 10 por 100.

Acido tricloroacético, solución al 20 por 100.

Sulfato sódico, solución saturada.

Acido acético glacial.

Indol, solución 0,2 por 100 en alcohol etílico absoluto.

p-dimetilaminobenzaldehído, solución al 4 por 100 en ácido fosfórico al 85 por 100.

Todos los reactivos proceden de "British Drugs House", calidad "analar", salvo el hidróxido sódico y el ácido acético glacial que son "Probus" calidad reactivo y el indol que lo elabora "N. B. C."

*Toma de muestras y técnica analítica.*—De aquellos botes cuyos cierres se comprobó que eran herméticos, tras abrirlos con abrelatas corriente se toman 50 grs. de pescado y la proporción correspondiente

de cobertura determinada por cálculo. Se homogenizan en batidora "Turmix" durante tres minutos y a continuación se añaden 50 ml. de agua destilada y 50 de ácido tricloroacético al 20 por 100, continuando la homogenización otros tres minutos.

El homogenizado se filtra por papel Albet ordinario, recogíendose 75 ml. del filtrado que se llevan a pH 8 con hidróxido sódico al 10 por 100. Seguidamente se centrifugan a 3.000 rpm durante cinco minutos. Se recoge el sobrenadante, se adicionan 25 ml. de cloroformo lavando con agitación en un embudo de separación, se someten a centrifugación como antes y la capa clorofórmica obtenida se trasvasa a un matraz aforado de 100 ml.

El líquido restante se extrae dos veces con 20 ml. de cloroformo primero y con 15 después, siguiendo la metódica citada. El extracto dividido en dos porciones iguales se lava en embudo de decantación con 75 ml. de agua destilada y 5 ml. de sulfato de sodio. Los extractos clorofórmicos (60 ml.) una vez lavados se vierten en un matraz de forma semejante a la de un embudo de decantación sin llave de paso y se añaden 5 ml. de p-dimetilaminobenzaldehído, se agita fuertemente y se someten a centrifugación a 1.500 rpm. durante cinco minutos. Se retira la capa clorofórmica superior y a la inferior se le adicionan 45 ml. de ácido acético glacial.

Se preparan soluciones de indol en una mezcla de 50 ml. de agua destilada y 50 ml. de ácido tricloroacético al 20 por 100 de forma que contenga 0, 10, 20 y 30  $\mu$ grs. de indol. Se determinan colorimétricamente sus absorbancias con filtro verde y se establecen las curvas correspondientes en función de las concentraciones.

Leyendo en las mismas condiciones la solución problema y refiriendo estas lecturas a la curva patrón, se calcula la concentración de indol en los 50 grs. de pescado y cobertura de que se partió.

El mismo proceder se utilizó para estimar el indol en el pescado inmediatamente después de descongelado antes de adicionarle la salmuera para la preparación de la conserva.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En los cuadros I, II, III se resumen las variaciones experimentadas por el indol en las conservas de atún y en las soluciones de Cl Na sometidas a diferentes condiciones de esterilización.

En el cuadro I se aprecia claramente el efecto ejercido por la temperatura y duración del tratamiento esterilizante sobre el porcentaje de indol recuperado. Resalta especialmente el hecho de que la estabilidad del indol es función del tiempo y temperatura de esterilización, cuanto más se prolonga la acción del calor a una temperatura dada tanto menor es el indol recuperado en la salmuera esterilizada. De otro lado es claro el efecto que sobre este producto ejerce, a igualdad de tiempo la elevación de la temperatura. En otras palabras, el indol, como la mayoría de los componentes alimenticios acusa claramente el efecto perjudicial que sobre su estabilidad ejercen las temperaturas elevadas, sobre todo si su acción se prolonga bastante, hecho éste ya puesto de manifiesto por COPSON (1962) y GOLDBLITH *et al* (1961), entre otros.

Por lo que se refiere a la acción buffer en la estabilidad del indol, sobresale el hecho de que el porcentaje del recuperado es prácticamente el doble del estimado en idénticas condiciones cuando la salmuera adicionada de indol no lleva tampón. No sabemos cuál puede ser la razón de esta pérdida menor, más conviene recordar con MAILLOUX y TISSET (1963), el efecto ejercido por ciertos catalizadores (Sulfato de Cobre entre ellos) sobre la producción de indol a partir del triptófano, tal vez también estos catalizadores, no olvidemos que el cobre suele ser un contaminante de la sal común, influyen la estabilidad del indol frente al calor y el tampón por nosotros utilizado pueda, en las condiciones de nuestro experimento, interferir tal acción catalítica. Cualquiera que sea la causa el hecho indudable es una mejor recuperación (menor pérdida) en las soluciones salinas tamponadas.

Si se comparan los cuadros II y III se aprecia en primer lugar una mayor producción de indol en los botes que contienen aún que había sido almacenado dos años (cuadro II).

Ya inicialmente, en el pescado listo para enlatar, los valores de indol son el doble en el conservado más tiempo (22) de los hallados en el almacenado solo dos meses (11). Y en donde estas diferencias se hacen muy manifiestas es al comparar las dos últimas columnas de los cuadros mencionados. Aunque el contenido inicial de indol era menor en el pescado utilizado en el cuadro III y a pesar de adicionarle el doble aproximadamente con la cobertura, una vez terminado el tratamiento térmico (appertización) seguía con un contenido en indol muy inferior al de la conserva elaborada con pescado de dos años (cuadro II). Ello podría explicarse por una degradación proteica, tal vez de naturaleza

químico-física, que daría lugar a una mayor producción de triptófano a medida que se prolongaba el período de almacenamiento (SCHULTZ, 1960) y al efecto que sobre la conservación de este aminoácido en indol tienen las temperaturas de ebullición en presencia de agua (MAILLOUX y TISSET, *loc. cit.*).

Se puede concluir diciendo que la concentración de indol en una conserva de escombridos es un índice del estado de frescura del pescado con que se elaboró y de las condiciones de su tratamiento térmico.

# CUADRO I

Indol recuperado de la solución salina, tamponada o no después de sometida a diferentes temperaturas y tiempos de esterilización.

| Indol<br>adicio-<br>nado<br>μgrs/100<br>ml. | Esterilización |         | Indol             |      | Media aritmética del indol recu-<br>perado (en tanto por 100) |                     | Observaciones |                           |
|---|----------------|---------|-------------------|------|---|---------------------|---------------|---------------------------|
|   | °C             | Minutos | Absoluto<br>μgrs. | %    | Tempera-<br>tura (°C)   | Tiempo<br>(minutos) |               |                           |
| 10  | 105            | 75      | 8,2               | 82   | 105   | 75                  | 74,8          |                           |
| 10  | 110            | 55      | 2,2               | 22   | 110   | 55                  | 25,0          |                           |
| 10  | 110            | 65      | 1,5               | 15   | 110   | 65                  | 24,0          |                           |
| 10  | 110            | 75      | 1,8               | 18   | 110   | 75                  | 20,2          |                           |
| 10  | 115            | 55      | 2,5               | 25   | 115   | 55                  | 33,3          |                           |
| 10 a  | 115            | 55      | 7,6               | 76   | 115   | 55                  | 69,0          | Soluciones a, sin buffer. |
| 20  | 105            | 75      | 14,5              | 72,2 |   |                     |               |                           |
| 20  | 110            | 55      | 5,4               | 27,0 |   |                     |               |                           |
| 20  | 110            | 65      | 4,6               | 23,0 |   |                     |               |                           |
| 20  | 110            | 75      | 4,0               | 20,0 |   |                     |               |                           |
| 20  | 115            | 55      | 8,2               | 41,0 |   |                     |               |                           |
| 20 a  | 115            | 55      | 17,2              | 64,0 |   |                     |               |                           |
| 30  | 105            | 75      | 21,5              | 70,2 |   |                     |               |                           |
| 30  | 110            | 55      | 7,8               | 26,0 |   |                     |               |                           |
| 30  | 111            | 65      | 10,2              | 34,0 |   |                     |               |                           |
| 30  | 110            | 75      | 6,8               | 22,7 |   |                     |               |                           |
| 30  | 115            | 55      | 10,2              | 34,0 |   |                     |               |                           |
| 30 a  | 115            | 55      | 17,2              | 64,0 |   |                     |               |                           |

Las soluciones sin tampón corresponden en el cuadro a las que llevan en la primera columna una a a continuación de la cifra.

Las cifras señaladas en el cuadro son la media de diez análisis.

# CUADRO II

Variaciones del contenido en indol de las conservas de atún sometidas a diferentes temperaturas y tiempos de esterilización. (El atún empleado había sido conservado en congelación dos años).

| Esterilización           |                   | Cantidades de indol en μgrs.              |  |                                   |                               |                        |
|--------------------------|-------------------|---|--|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------|
|                          |                   | Peso del<br>pescado<br>envasado<br>(grs.) | Peso del<br>pescado y<br>cobertura<br>(grs.) | Inicial en<br>pescado<br>envasado | En<br>cobertura<br>(Cl Na 3%) | Total por<br>bote      |
| Tempera-<br>tura<br>(°C) | Tiempo<br>minutos |   |  |                                   |                               | Encontrado<br>por bote |
| 105                      | 75                | 157,9                                     | 180,8  | 34,7                              | 0                             | 34,7                   |
| 105                      | 75                | 155,7                                     | 178,2  | 34,2                              | 8,7                           | 42,9                   |
| 110                      | 55                | 154,0                                     | 175,9  | 33,9                              | 0                             | 33,9                   |
| 110                      | 55                | 153,2                                     | 176,4  | 33,8                              | 9,4                           | 43,2                   |
| 110                      | 65                | 164,9                                     | 181,3  | 36,3                              | 0                             | 36,3                   |
| 110                      | 65                | 160,2                                     | 181,6  | 35,2                              | 8,3                           | 43,5                   |
| 110                      | 75                | 153,3                                     | 169,0  | 33,8                              | 0                             | 33,8                   |
| 110                      | 75                | 166,1                                     | 182,6  | 36,6                              | 6,8                           | 43,4                   |
| 115                      | 55                | 158,3                                     | 177,1  | 34,8                              | 0                             | 34,8                   |
| 115                      | 55                | 158,8                                     | 181,0  | 35,0                              | 8,6                           | 43,6                   |
| & 22                     |                   |   |  |                                   |                               |                        |
|                          |                   |   |  |                                   |                               | 53                     |
|                          |                   |   |  |                                   |                               | + 18,3                 |
|                          |                   |   |  |                                   |                               | + 30,1                 |
|                          |                   |   |  |                                   |                               | + 5,7                  |
|                          |                   |   |  |                                   |                               | + 11,2                 |
|                          |                   |   |  |                                   |                               | + 14,7                 |
|                          |                   |   |  |                                   |                               | + 14,5                 |
|                          |                   |   |  |                                   |                               | + 23,7                 |
|                          |                   |   |  |                                   |                               | + 45,6                 |
|                          |                   |   |  |                                   |                               | + 15,7                 |
|                          |                   |   |  |                                   |                               | + 19,6                 |
|                          |                   |   |  |                                   |                               | 45,0                   |

Los valores indicados representan la medida de 10 análisis. & μgrs. de indol/100 grs. de pescado fresco (descongelado).

### CUADRO III

Variaciones del contenido en indol de las conservas de atún sometidas a diferentes temperaturas y tiempos de esterilización. (El atún empleado había sido conservado en congelación dos meses).

| Esterilización      |                   | Pesos del                                 |  |                                   | Cantidades de indol en $\mu$ grs. |                   |                        |      | Diferencia |     |
|---------------------|-------------------|---|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------|------|------------|-----|
| Temperatura<br>(°C) | Tiempo<br>minutos | Peso del<br>pescado<br>envasado<br>(g s.) | Peso del<br>pescado<br>y cobertura<br>(grs.) | Inicial en<br>pescado<br>envasado | En<br>cobertura<br>(Cl Na 3 %)    | Total por<br>bote | Encontrado<br>por bote |      | en peso    | %   |
| 105                 | 75                | 146,0                                     | 165,0  | 15,4                              | 0                                 | 15,4              | 22                     | & 11 | + 6,6      | 43  |
| 105                 | 75                | 154,0                                     | 170,4  | 16,3                              | 13,2                              | 29,5              | 45,4                   |      | + 15,9     | 54  |
| 110                 | 55                | 153,0                                     | 171,6  | 16,3                              | 0                                 | 16,3              | 25,2                   |      | + 8,9      | 55  |
| 110                 | 55                | 152,5                                     | 160,8  | 16,2                              | 13,9                              | 30,1              | 41,4                   |      | + 11,3     | 38  |
| 110                 | 65                | 149,9                                     | 165,6  | 15,9                              | 0                                 | 15,9              | 30,4                   |      | + 14,5     | 91  |
| 110                 | 65                | 151,4                                     | 171,6  | 16,0                              | 15,3                              | 31,3              | 57,5                   |      | + 26,2     | 84  |
| 110                 | 75                | 148,0                                     | 171,3  | 15,7                              | 0                                 | 15,7              | 25,2                   |      | + 9,5      | 60  |
| 110                 | 75                | 154,3                                     | 170,4  | 16,3                              | 12,2                              | 28,5              | 50,9                   |      | + 22,4     | 79  |
| 115                 | 55                | 152,3                                     | 171,8  | 16,1                              | 0                                 | 16,1              | 33,9                   |      | + 17,8     | 110 |
| 115                 | 55                | 154,8                                     | 170,3  | 16,4                              | 11,7                              | 28,1              | 57,1                   |      | + 29       | 103 |

Los valores indicados representan la medida de 10 nális. &  $\mu$  grs. de indol/100 grs. de pescado fresco (descongelado).

### RESUMEN

Siguiendo la técnica de SOUDAN se ha estudiado la conducta del indol durante la elaboración de conservas de escombridos en varios atunes sometidos a diferentes condiciones de esterilización.

Se llega a la conclusión siguiente: la concentración de indol en una conserva de escombridos es un índice del estado de frescura del pescado a partir del cual se ha preparado y señala también más o menos las condiciones de sus tratamientos térmicos.

### RESUME

Suivant la technique de SOUDAN on étudie la conduite de l'indol pendant l'élaboration des conserves d'escombrides dans plusieurs thons subissant de différents conditions de sterilisation.

On arrive à la conclusion suivante: la concentration d'indol dans une conserve d'escombrides est un indice de l'état de fraîcheur du poisson à partir duquel on a préparé celle-là et il signale aussi, plus ou moins, les conditions de ses traitements thermiques.

### SUMMARY

The indol's behaviour during processing of canned tuna fish under different retorting conditions has been studied with the Soudan's procedure.

It has concluded that the indol concentration in the canned fish can be used as an index of the original fish freshness and as a test of the thermal conditions during processing.

## BIBLIOGRAFIA

- BEATTY, S. A. (1938).—J. Fish. Res. Bd. Can, 4, 63-68.  
 ———. (1939).—J. Fish. Res Bd. Can, 5, 229-232.  
 BOURY, M. (1945).—Rev. Travaux. Office. Scient. Techni. Pe-  
 ches Marit, 49.  
 CLARKE, J. (1939).—Citado por DUGGAN (1946). J. Assoc. Off.  
 Agric. Chem, 20, 475.  
 CLOUGHT, R. W. (1923).—Chem. Abst. 3.550-51.  
 ———, SHOSTROM, O. E. (1925).—Univ. Washington. Publi-  
 cation in Fisheries, 1, 101-108.  
 COPSON, D. A. (1962).—*Microwave heating*. Avi Publishing Co.  
 Westport.  
 DUGGAN, R. E., STRASBURGER, J. (1945).—J. Assoc. Off. Agric.  
 Chem. 29, 77-78.  
 DYER, J. (1952).—J. Fish. Res. Bd. Can. 8, 314-324.  
 GOLDBLITH, S. A., JOSLYN, M. A. y NICKERSON, J. T. R. (1961).—  
*Thermal processing of foods*. Avi Publishing Co. Westport.  
 GORTNER, R. (1950).—*Outlines in Biochemistry*. John Wiley Sons,  
 Inc. New York.  
 HIRAI, K. (1958).—Bull. Oasaka Med. Sch. Suppl. III.  
 MAILLOUX, M., TISSET, C. (1963).—Bull. Ass. Diplom. Microbiol.  
 Faculte Pharmacie Nancy, 92), 4.<sup>o</sup> Trim. 1963.  
 SANZ PEREZ, B.—*Tesis doctoral*. Univ. Zaragoza. Febrero 1960.  
 SCHULTZ, H. W. (1960).—*Food Enzymes*. Avi Publishing Co.  
 Westport.  
 SOUDAN, F. (1961).—*Comunicaciones personales*. Inst. Peches.  
 Marit. París.  
 ———. (1950).—Inst. Pech. Marit. Notes Rappts, núm. 9.  
 París.  
 SHTEMBERG, A. T., ROKHLINA, S. L. (1939).—Chem. Abst. 4. 689.  
 VOLCANI, E. B. (1940).—*Studies on the microflora of the Dead*  
*Sea*. Tesis Univ. Jerusalén.  
 WIERZCHOWSKI, J., SEVERIN, M. (1954).—Chem. Abst. 5.932.  
 ———. (1958).—Resum. Analytique Peche Mondiale F. A. O.