

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA

“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



Efecto del congelamiento sobre la peroxidación lipídica en el músculo de 2 especies de pescados almacenados en una planta pesquera

Tesis para obtener el Título de Licenciada en Biología

Emma Aída Sánchez Acuña

Lima – Perú

2020

Este trabajo está dedicado para todas aquellas personas que perseveran, que no se rinden y que luchan por sus sueños y metas. Lo único que me queda decir es que: "Los Tiempos de Dios son Perfectos"

AGRADECIMIENTOS

No quisiera empezar estas primeras líneas sin antes agradecer a Dios Padre, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por darme fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis padres César Augusto y Flor de María por su apoyo incondicional, por los valores que me han inculcado, por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación y sobre todo por ser mi ejemplo de vida a seguir. Esta tesis también es vuestra tesis. Gracias de todo corazón.

También me complace agradecer el apoyo y los medios recibidos en la Corporación Hayduk, durante mis prácticas profesionales en el área de Calidad CHD, donde conocí y aprendí de grandes profesionales sobre el rubro pesquero, ya que sin ellos gran parte de esta tesis no se hubiera podido llevar a cabo.

A mi asesora de tesis, MSc. Ana Colarossi Salinas, por su invaluable apoyo durante la realización de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de este tiempo.

Quiero agradecer finalmente a todas las personas que, aun sin saberlo, han contribuido en numerosas ocasiones a la realización de esta tesis, ayudándome a desear culminarla y ver todos mis esfuerzos de superación profesional y personal reflejados en él.

Gracias.

RESUMEN

Los productos de la pesca son muy perecederos por lo que es necesario emplear cadena de frío desde la extracción hasta el ingreso del producto a planta o venta final al consumidor para evitar su deterioro. La conservación en estado congelado es un método muy efectivo para prolongar su vida útil y evitar así la peroxidación lipídica; la cual es la segunda causa de deterioro de los alimentos, después de la acción de los microorganismos, modificando su valor nutricional y atributos organolépticos.

Sin embargo, también en función del método de congelación utilizado, el tiempo y temperatura de conservación, la especie, etc., pueden ocurrir diferentes alteraciones en el producto que se traduzcan en una pérdida de calidad pudiendo llegar al fin de su periodo de vida comercial o al rechazo por parte del consumidor.

En este estudio se evaluó la peroxidación lipídica, el contenido de proteínas y grasa en el músculo de 2 especies de pescado, *Scomber japonicus*, comúnmente conocido como “caballa” y a *Sarda chiliensis chiliensis* llamado “bonito” ambas especies de importancia comercial y nutricional, tanto en el mercado interno como externo.

Dichas especies se conservaron a temperaturas de -18°C por 6 meses sin ser sometidas a ningún proceso de glaseado u otro pre-tratamiento en cámaras de congelación, siguiendo el deterioro según el índice de compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en el tiempo.

Los resultados muestran que hay cambios en la peroxidación, encontrando el mayor incremento de MDA a los 2 meses de conservación a -18°C , indicando el deterioro de las muestras, sin embargo los cambios en la composición de proteínas y grasas se hicieron evidente en el análisis proximal a los 6 meses.

A pesar de ello, en este estudio, la técnica de TBARS no nos ha sido útil para hacer el seguimiento de la peroxidación por tiempos más prolongados a los dos meses posiblemente por los cambios bioquímicos que ocurren en la muestra durante el periodo de almacenamiento, que interfieren con esta metodología.

Palabras clave: *Scomber japonicus*, *Sarda chiliensis chiliensis*, peroxidación lipídica, contenido de proteínas.

ABSTRACT

Seafood products are highly perishable, and for that reason, it is necessary to use a cold chain process, from the moment of the extraction to the plant entry and final sale to the consumer, in order to avoid spoilage. Conservation in the frozen state is a very effective method, in order to prolong the shelf life by avoiding lipid peroxidation; which is the second most important cause of food spoilage, after the action of microorganisms, the lipid peroxidation modifies the nutritional value and organoleptic attributes of the food.

However, depending on the freezing method used, the storage time, the temperature, the species, etc., different alterations may occur in the product, that could result in the loss of quality, and may cause the end of the commercial shelf life of the seafood, and the consumer rejection.

*In this study, lipid peroxidation, protein and fat content in muscle portions of 2 species of fish were evaluated. *Scomber japonicus*, commonly known as "mackerel", and *Sarda chiliensis chiliensis*, also known as "bonito". Both species are considered as very important commercially and nutritionally species, both in internal and external markets.*

Both species samples were preserved at temperatures of -18°C for six months, without being subjected to any glazing process or other pre-treatment in freezing chambers. Deterioration was followed over time, according to the index of thiobarbituric acid reactive compounds (TBARS).

The results showed that there are changes in peroxidation, finding the greatest increase in MDA after 2 months of storage at -18°C, indicating the change in the samples, however changes in the composition of proteins and fats were evident in the analysis. proximal at 6 months.

Despite this, in this study, the TBARS technique has not been useful for monitoring peroxidation for longer periods than two months, possibly due to the biochemical changes that occur in the sample during the storage period, which interfere with this methodology.

Keywords: *Scomber japonicus, Sarda chiliensis chiliensis, lipid peroxidation, protein content.*

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AGMI: Ácidos Grasos Monoinsaturados

AOAC: Sociedad Oficial de Química Analítica

ATP : Adenosín Trifosfato

DHA : Docosaheptaenoico

EPA : Eicosapentaenoico

FAO : Organización para la Agricultura y la Alimentación

HDL : Lipoproteína de alta densidad

LDL : Lipoproteína de baja densidad

MDA : Malondialdehído

pH : Potencial de Hidrogeno o de Hidrogeniones

PUFA : Ácidos grasos poliinsaturados

TBA : Ácido tiobarbitúrico

TEP : Solución Estándar Stock MDA

VLDL : Lipoproteína de muy baja densidad

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	14
III. OBJETIVO.....	14
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
1. Materiales.....	16
1.1 Material biológico.....	16
1.2 Material de laboratorio e insumos	17
1.3 Equipos.....	18
2. Metodología	18
2.1. <i>Análisis proximal de las 2 especies de pescado</i>	19
2.1.1 <i>Proteína (Metodo Kjeldahl)</i>	19
2.1.2 <i>Grasa (Metodo de Bligh y Dyer)</i>	20
2.1.3 <i>Humedad</i>	21
2.1.4 <i>Ceniza</i>	22
2.2 <i>Evaluación de la Peroxidación de las muestras</i>	23
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN.....	32
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	37
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
IX. ANEXOS	41

I. INTRODUCCIÓN

Las especies marinas representan un grupo de alimentos importantes en la dieta humana por su aporte en constituyentes fundamentales como aminoácidos, ácidos grasos esenciales, vitaminas liposolubles y minerales. El pescado es uno de los alimentos más completos ya que tiene un excelente valor nutritivo, caracterizándose y distinguiéndose de los demás alimentos de origen animal por su alta composición de lípidos insaturados y porque proporciona una gran cantidad de proteínas, vitaminas y minerales.

Del total de recursos hidrobiológicos destinados al consumo humano directo (CHD), el 52% (648 mil TM) se destina a la elaboración de congelados. (INFOPECA, 2010). Entre las principales especies de origen marítimo extraídas para la comercialización como congelados son el bonito y la caballa, debido a que ambas especies aparte de ser recursos pesqueros de alto consumo y preferencia por los peruanos (PRODUCE, 2015), en su composición tiene todos los aminoácidos esenciales, además de un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), minerales y vitaminas, lo que convierte a ambas en un alimento de alta calidad nutricional (Dávalos, 2016).

1.1 Características del Bonito

El bonito (*Sarda chiliensis chiliensis*) es un teleósteo perteneciente a la familia Scombridae, que puede alcanzar hasta 70 cm de longitud a la horquilla. Su cuerpo es alargado, moderadamente robusto, cabeza grande puntiaguda, tronco cubierto por escamas diminutas y presenta quilla lateral (ventral pectoral). Su color es azul acero perdiéndose gradualmente en gris plateado en las partes inferiores. Vive en áreas corrientes de afloramiento que se caracterizan principalmente por la temperatura relativamente baja, que oscilan entre 15°C y 22°C (Samamé, 1997).

Colette, 2011, señala que el bonito presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	: Animalia
Phylum	: Chordata
Clase	: Actinopterygii
Orden	: Perciforme
Familia	: Scombridae
Género	: <i>Sarda</i>
Especie	: <i>Sarda chiliensis chiliensis</i>

Sarda chiliensis chiliensis, se encuentra en la costa occidental de América del Sur desde Colombia hasta Chile (Collette y Chao, 1975), citado por Colette et al., 2011).

Es una especie pelágica y oceanódroma que se encuentra en la costa y forma cardúmenes por tamaño. Son carnívoros que se alimentan de peces pequeños (preferentemente de anchoveta, *Engraulis rigens*) y crustáceos (Collette y Nauen, 1983); citado por Colette et al., 2011.

Realiza migraciones diarias con movimientos verticales, aparentemente relacionados con los desplazamientos de la anchoveta. Estacionalmente se manifiestan por una concentración en las aguas superficiales costeras durante la primavera y verano, el bonito adulto desaparece en forma notaria durante el otoño e invierno (Samamé, 1997)

Los machos pueden madurar y desovar a un año de edad y a una longitud de aproximadamente 51 cm. Las hembras suelen procrear más de una vez por temporada a partir de los 2 años de edad. Sin embargo, la mayoría tiene aproximadamente 69 cm de largo o tres años de edad en el primer desove. No

es probable que viva más de seis años. El tiempo de generación se estima en alrededor de 3-4 años (Collette, 2011).

Los primeros estudios realizados en el Perú sobre los aspectos reproductivos de *Sarda chiliensis chiliensis* comenzaron con Schweigger (1947), quien menciona como periodo reproductivo de setiembre a marzo. Asimismo, Chirinos determinó el periodo de mayor reproductividad, los cuales se dan entre los meses de octubre a marzo sucede un intenso desarrollo gonadal. (Chirinos de Vildoso, 1960)

1.2 Características de la caballa

La caballa (*Scomber japonicus*) es un pez teleósteo perteneciente a la familia de los escómbridos de hábitos pelágicos-costeros, el cual tiene un cuerpo muy delgado con 2 aletas dorsales separadas, con unas aletas pectorales cortas. Su coloración es azul oscuro, con la panza blanca. Mide entre 25 y 45 cm de longitud y puede alcanzar 4.5 kg de peso.

Es característico de la caballa su dorso de color verde brillante con bandas negras ondulantes que se prolongan hasta la mitad del costado del animal. El vientre y la mitad del flanco son de color blanco plateado.

(Mendo Aguilar, 1984), señala que la caballa presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	: Animalia
Phylum	: Chordata
Clase	: Actinopteryggi
Orden	: Perciformes
Familia	: Scombridae
Especie	: <i>Scomber japonicus</i>

La caballa (*Scomber japonicus*) es un escómbrido de hábitos pelágicos-costeros. Vive sobre el talud continental, distribuyéndose desde la superficie hasta los 300m de profundidad (Lozano Rey, 1952) (Collette, 1986).

Es una especie típicamente gregaria y migratoria. Los individuos de esta especie realizan migraciones estacionales, principalmente para invernar y alimentarse (Collette & Nauen, 1983). En el Océano Pacífico han sido descritos, para *Scomber japonicus*, gran cantidad de movimientos migratorios, tanto en la costa japonesa (Watanabe, 1970); como en la americana (Schaefer, 1980).

S. japonicus es una especie oportunista y no selectiva, que preda principalmente sobre zooplancton, pequeños peces, pequeños crustáceos. Puede competir por el alimento con aquellas especies con las que forma cardúmenes mixtos (Kramer 1969). Se ha observado canibalismo en esta especie (Schaefer, 1980).

En lo referente a su reproducción, la época de puesta va de mayo a julio para las caballas del Atlántico y entre marzo y abril para las caballas del mediterráneo. Cada hembra de caballa pone, en aguas abiertas, entre 200.000 y 450.000 huevos. Las larvas eclosionan pasados unos pocos días de su puesta.

1.3 Valor nutritivo de los peces

Los principales componentes químicos de la carne del pescado son: agua, proteína y lípidos (FAO, 1998). Los compuestos minoritarios en el músculo de pescado incluyen los minerales, las vitaminas, los carbohidratos y los compuestos nitrogenados no proteicos (FAO, 1998).

El contenido de hidratos de carbono en el músculo de pescado es muy bajo, generalmente inferior al 0.5% (Belitz, 1997). Las proteínas del músculo de pescado (15-28%) contienen todos los aminoácidos esenciales y su valor biológico es semejante a las proteínas de la leche, huevos o carne de mamíferos.

Los peces presentan un alto contenido de grasas insaturadas. Se han encontrado que la grasa de diferentes especies hidrobiológicas contiene entre el 17 y 21% de ácidos grasos saturados y entre 79 y 83% de ácidos insaturados; así el perfil lipídico de los peces difiere sustancialmente al de los mamíferos, los peces contienen una menor proporción de ácidos grasos saturados, mayor proporción de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) especialmente del tipo omega 3. Los ácidos grasos específicos del pescado son el eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA), ambos son ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga de la familia omega 3 (ω -3). (Villanueva Escobedo, 2015)

Quizás el auge actual más conocido e importante del consumo de productos pesqueros, después del valor proteico, está relacionado con la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados, la cual es recomendada para la prevención de enfermedades cardiovasculares, ya que se ha observado una disminución en la sangre de las lipoproteínas LDL y VLDL (transportan el colesterol a los tejidos), favoreciendo el transporte del colesterol por parte de las HDL hacia el hígado, donde es transformado en ácido cólico (Rodríguez, 2000). El consumo de ácido grasos poliinsaturados, especialmente del grupo conocido como omega-3, ha sido estudiado y difundido ampliamente a nivel internacional, las principales ventajas de su consumo según Kirpal. (2003), en la prevención y tratamiento de enfermedades coronarias, hipertensión, arritmias, artritis y desarrollo del sistema neurológico en fetos, a través del consumo de pescado por las madres embarazadas. (Ross, 2010); (Castro Gonzalez, 2013).

Entre los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son componentes dietarios que participan en múltiples procesos fisiológicos, donde cumplen un rol estructural en los fosfolípidos de las membranas celulares. Dentro de los PUFA cabe destacar a los ácidos grasos esenciales (linoleico y linolenico), pero sobre todo los de la denominada serie (ω -3), entre los más característicos son el docosahexaenoico (DHA, C22:6) y el eicosapentaenoico (EPA, C20:5). Numerosos estudios dietéticos y nutricionales muestran a los PUFA de la serie omega-3

como responsables de la acción positiva de los productos marinos frente a determinadas enfermedades.

Sin embargo, la composición química de los peces varía considerablemente entre las diferentes especies y también entre individuos de una misma especie, dependiendo de la edad, sexo, tejido muscular, medio ambiente y estación del año. Las variaciones en la composición química del pez están estrechamente relacionadas con la alimentación, nado migratorio y cambios sexuales relacionados con el desove. (Eslava, 2009)

1.3.1 Consecuencias de consumir los PUFA en pelágicos rancios

Los pescados grasos al tener un alto contenido de PUFA va a sufrir cambios asociados a la oxidación lipídica, los cuales constituyen la principal causa de deterioro de la carne, ya que provocan la aparición de olores y sabores desagradables y la alteración del color y, por lo general altera la calidad organoléptica del producto. Por tanto, producen una disminución del valor nutritivo de la carne (Armenteros *et al*, 2012), ocasionando la generación de compuestos potencialmente nocivos para la salud relacionados con el riesgo de padecer diversas patologías. Se cree que la ingesta de lípidos oxidados tiene un gran impacto sobre la salud del consumidor, y además ciertos productos procedentes de la oxidación de lípidos están involucrados en el desarrollo de enfermedades como el cáncer y la cardiopatía coronaria (Armenteros *et al*, 2012).

1.4 Alteraciones post-mortem

Por otro lado, lo que desde un punto de vista nutritivo puede ser una ventaja, no lo es desde un punto de vista tecnológico. Los productos marinos son altamente perecederos, por ser muy susceptible a alteraciones producidas por cambios autolíticos, microbiológicos y químicos (Ashie *et al.*, 1996) y entre otros motivos por su composición lipídica altamente insaturada.

Las especies marinas constituyen un grupo de alimentos fácilmente deteriorables a lo largo del procesamiento empleado para su consumo (Salas Maldonado, 2008). En el caso de los productos pesqueros, al ocurrir la muerte del animal inmediatamente comienzan cambios irreversibles de naturaleza química, bioquímica y posteriormente se produce el desarrollo de microorganismos que pueden afectar a la estructura muscular y/o provocar su deterioro.

Tras la muerte del pez se detiene la circulación sanguínea, y por tanto no llega oxígeno al músculo. Sin embargo, se consume energía para mantener la temperatura y la integridad estructural de sus células. Así el músculo empieza a ver mermadas las reservas de ATP mientras que simultáneamente se incrementan los niveles de ADP y Fosfato. La fosfocreatina proporciona la energía suficiente para incrementar los niveles de ATP, hasta que ésta se consume y comienza a utilizarse una ruta alternativa catalizada por la adenilato quinasa o mioquinasa, que produce ATP a partir de dos moléculas de ADP obteniendo ATP y AMP (Martínez, 1997). Se produce la degradación de glucógeno a glucosa utilizando las reservas de oxígeno debido a los altos niveles de AMP, que activan la enzima fosforilasa b. Cuando no hay suficiente oxígeno para el metabolismo aerobio, se produce la glucólisis anaerobia para producir ATP, incrementando los niveles de ácido láctico y disminuyendo el pH (FAO, 1998; Martínez, 1997). Llega un momento en el que la cantidad de ATP no es suficiente para mantener en reposo el potencial de membrana y el secuestro de los iones libres de Ca^{2+} entre las células musculares (Martínez, 1997) lo cual tiene múltiples efectos a nivel intracelular. En particular, los iones Ca^{2+} se unirán a la troponina C y permitirán la existencia de interacción entre la actina y la miosina de tal forma que el músculo se contrae produciendo el estado de rigor mortis (Martínez, 1997). El aumento de Ca^{2+} también provocará la activación de diferentes hidrolasas, se unirá a membranas, interaccionará directamente con el disco Z y provocará la solubilización de proteínas contráctiles (Martínez, 1997). Además, los bajos niveles de pH citosólico favorecen la actividad de las

proteasas y se producirá una degradación de estructuras que terminarán provocando cambios en la ultra estructura y en definitiva un ablandamiento de los tejidos (FAO, 1998).

La bajada del pH y del porcentaje de azúcares y el aumento del contenido en nitrógeno no proteico facilitarán el crecimiento bacteriano (Leroi, 2010). En la superficie de la piel, las bacterias colonizan una amplia extensión de la base de las escamas. Las bacterias más importantes en el deterioro del pescado son psicrotrofas (crecimiento posible a 0 °C y óptimo alrededor de 25 °C) gram negativas como *pseudomonas spp.*, *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum* y muchas bacterias de la familia de las vibrionaceae (Leroi, 2010).

1.5 Técnicas de conservación

Con el propósito de retardar estos fenómenos se han empleado técnicas como la conservación en hielo, congelación, secado, salado, ahumado, enlatado entre otras. Estos procesos permiten adicionalmente estabilizar mejor el precio y la disponibilidad de los recursos pesqueros, los cuales oscilan según la temporada, ubicación geográfica y la demanda, pero sus productos sometidos a algún proceso tecnológico tienen un precio menos variable y se puede disponer de ellos en cualquier momento y lugar e inclusive en áreas geográficas distantes a la presencia de estos recursos (Valls, 2003). En productos pesqueros la refrigeración y la congelación son las principales técnicas empleadas para su conservación y ambas están basadas en el principio de que todas las reacciones que causan su deterioro dependen de la temperatura. Es por ello que, en las industrias pesqueras, dentro de las embarcaciones después de realizar la pesca, si no se conserva correctamente, el pescado se estropea, pierde su valor comercial e incluso puede llegar a no ser apto para el consumo humano. El pescado al ser capturado, sufre de estrés y fatiga en el intento de liberarse de las redes, también puede recibir golpes o heridas provocadas por el propio estilo de pesca o por otros animales marinos. Todo ello hace que el pescado adquiera un mal aspecto y que se acelere su proceso de degradación. Ante esto, los tripulantes de la embarcación realizan ciertas acciones como: el lavado del pescado con agua en cubierta, el

trato al pescado y la aplicación de frío. En las técnicas de conservación de productos pesqueros se puede afirmar que, en condiciones de refrigeración, las mayores variaciones que se presentan son el resultado del crecimiento de los microorganismos, mientras que en congelación son ocasionados por fenómenos químicos y físicos (Haard., 1992a).

La congelación constituye el principal método de conservación de pescado cuando se pretende mantener durante tiempos prolongados. Por ejemplo, a nivel mundial en 2010 un 29,3 % del pescado destinado al consumo humano se comercializó congelado (FAO, 2012). Además, un porcentaje muy alto del pescado que se elabora ha sido mantenido previamente en estado congelado. Datos recogidos por la FAO muestran que del 14 % del pescado sometido a transformación (pescado elaborado o en conserva), el 55,2 % fue comercializado congelado (FAO, 2016). En la actualidad, con objeto de asegurar la muerte de larvas de parásitos presentes en los productos pesqueros, la congelación es obligatoria para operadores de alimentos que pongan en el mercado productos de la pesca, en caso de que el producto se consuma crudo o poco cocinado o para productos sometidos a tratamientos como marinado, salado, etc. que sean insuficientes para matar los parásitos (EC 1276/2011). Así, una vez que la actividad microbiana se encuentra detenida, entran en juego otras vías de alteración como la acción de las enzimas endógenas, el pardeamiento no enzimático, y finalmente la oxidación no enzimática de lípidos; como resultado, la fracción lipídica adquiere un papel relevante, debido fundamentalmente a la fácil alterabilidad de sus ácidos grasos polinsaturados

1.6 El problema de la oxidación de los lípidos en productos pesqueros y sus derivados.

Entre las distintas vías de alteración que pueden actuar sobre un alimento de origen marino, destaca la facilidad a la oxidación que experimenta la fracción lipídica, debido a su alta proporción en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), como el eicosapentaenoico (EPA)(C20:5) y docosahexaenoico (DHA) (C20:6), que pueden curar enfermedades de la piel (Huss, 1998).

La oxidación de los lípidos origina atributos sensoriales desagradables, que se asocian a la rancidez, durante el procesado y almacenamiento del pescado graso. La rancidez reduce dramáticamente la vida útil y el período comercial del pescado graso y de los productos enriquecidos en lípidos marinos. La oxidación de los lípidos transcurre por un mecanismo de radicales libres, caracterizado por tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Frankel, 1998). Entre las reacciones de iniciación de la oxidación, se distinguen tres tipos fundamentales de procesos:

1. Reacciones de autooxidación: Implican la sustracción de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno de un ácido graso (RH), rindiendo un radical alquilo (R·) (Halliwell y Gutteridge, 1985). El radical alquilo reacciona fácilmente con el oxígeno molecular en su estado fundamental, oxígeno triplete ($3 O_2$), para formarse un radical peroxilo (ROO·). ROO· puede sustraer un átomo de hidrógeno de un nuevo ácido graso para formar un peróxido lipídico (ROOH) y un nuevo radical alquilo (R·). Éste es el proceso más común por el cual los ácidos grasos son oxidados (Erickson, 2002).

2. Reacciones de fotooxidación: La formación de los peróxidos lipídicos, también denominados hidroperóxidos, se produce por adición directa del oxígeno molecular en estado excitado, oxígeno singlete ($1 O_2$), sobre un doble enlace del ácido graso. El oxígeno singlete se forma principalmente por acción de la luz, por ello la oxidación iniciada por este proceso suele denominarse fotooxidación (Frankel, 1998).

3. Reacciones enzimáticas: Las enzimas facilitan que el oxígeno triplete reaccione con el ácido graso para formar un hidroperóxido. Los principales grupos de enzimas implicados en este proceso son las enzimas microsomiales, las peroxidasas y las dioxigenasas. Las lipoxigenasas y las ciclooxigenasas, son dioxigenasas que producen hidroperóxidos por este mecanismo (Erickson, 2002). En las reacciones de propagación, los radicales peroxilo (ROO·) formados en las reacciones de iniciación, generan nuevos radicales alquilo (R·), por sustracción de un átomo de hidrogeno a un ácido graso insaturado, y un hidroperóxido

lipídico. Los hidroperóxidos generados también pueden fragmentarse por acción térmica, o descomponerse por la catálisis de metales de transición, lo que genera nuevos radicales que autocatalizan el proceso de oxidación (*Frankel, 1998*). Los mecanismos de autooxidación y de fotooxidación dan lugar a distintos hidroperóxidos. De este modo, con el estudio de los hidroperóxidos formados puede conocerse el proceso que controla la oxidación del sistema. La autooxidación rinde principalmente hidroperóxidos con un sistema de dobles enlaces conjugados, mientras que la fotooxidación origina similares proporciones de hidroperóxidos conjugados y no conjugados (*Frankel, 1998*).

En las últimas etapas de la oxidación, los radicales reaccionan entre ellos para formar especies no radicales. Estas reacciones se denominan reacciones de terminación de la oxidación (*Erickson, 2002*).

Los hidroperóxidos son compuestos sin sabor y olor, y frecuentemente se hace referencia a ellos como los productos primarios de la oxidación. La descomposición de los hidroperóxidos origina los productos secundarios de la oxidación: aldehídos, cetonas y alcoholes, que son sustancias volátiles con atributos sensoriales a muy bajas concentraciones, siendo las responsables de los aromas y sabores asociados a la rancidez (*Frankel, 1998*). Los aldehídos, generados en la degradación oxidativa de los hidroperóxidos, pueden reaccionar con compuestos que contienen grupos aminos libres, para formar compuestos de interacción, también denominados productos terciarios. Entre los productos de interacción destacan las bases de Schiff, las cuales bajo ciertas condiciones polimerizan originando pigmentos de color parduzco. La formación de los productos terciarios, también puede afectar al sabor y a la textura del alimento (*Aubourg, 1999*).

Generalmente, en el inicio de la oxidación se observa el denominado período de inducción, que se caracteriza por un lento desarrollo de la oxidación, seguido por un periodo de propagación, en el que aumenta exponencialmente la velocidad de la oxidación y la formación de los productos de oxidación de los lípidos (*Frankel, 1998*). A la vista de los

mecanismos expuestos, es evidente que la oxidación lipídica en el músculo de pescado es un proceso complejo, en cuya cinética están implicados factores externos, como la temperatura y el contenido de oxígeno de la atmósfera circundante, y factores internos, como la concentración y tipo de lípidos, y el balance entre las sustancias antioxidantes y pro oxidantes del músculo (*Pazos, 2005*).

Debido a la complejidad del proceso, frecuentemente se ha hecho uso de sistemas más sencillos, sistemas modelo, con la finalidad de descifrar los procesos que rigen la oxidación de los lípidos en el músculo. Los sistemas modelo más empleados para el estudio de los factores que afectan al desarrollo de la rancidez en el músculo de pescado son: las suspensiones de membranas de pescado (*Han y Liston, 1987; Mcdonald y Hultin, 1987*), el músculo de pescado picado y lavado (*Richards y Hultin, 2001; Undeland y col., 2002*) y el músculo de pescado picado (*Undeland y col., 1998*). Los sistemas modelo también pueden consistir en la modificación de uno o varios factores para acelerar el proceso de oxidación. Así, es habitual el aumento de la temperatura para estudios preliminares del desarrollo de la rancidez en el pescado congelado. Como se ha indicado anteriormente, la oxidación de los lípidos repercute negativamente en los atributos sensoriales, pero además afecta negativamente, al valor nutricional, a la toxicidad y en aspectos tecnológicos, debido a la interacción de los productos de oxidación de los lípidos con las proteínas (*Kolakowska y col., 2000*).

1. 7 Evaluación de la calidad de los productos pesqueros

Se han desarrollado numerosas metodologías para la evaluación de la frescura y la calidad de los productos pesqueros, cada una de ellas tiene sus alcances y sus limitaciones, en ocasiones un método de análisis puede expresar el grado de deterioro de una especie de pescado mientras que en otras especies su valor como índice puede ser limitado. La evaluación de la calidad de los productos pesqueros puede realizarse mediante numerosos métodos que se dividen en: sensoriales, microbiológicos, químicos y físicos. (*Valls Puig, 2007*)

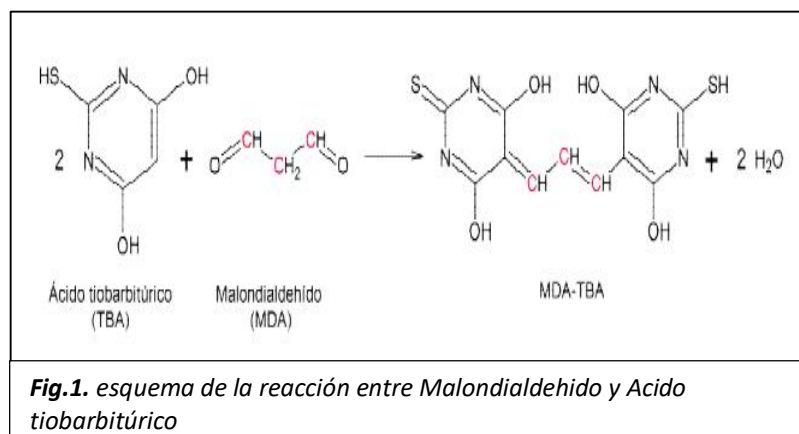
Así a manera de ejemplo, en estudios efectuados en condiciones de refrigeración las técnicas se basan principalmente en los cambios autolíticos (pH, ácido láctico, patrón de degradación del ATP) y microbiológicos (crecimiento de microorganismos y del análisis de algunos de los productos que generan), mientras que en congelación se basan en alteraciones físicas (textura, deshidratación, quemadura por frío, etc.) y químicas (rancidez, alteraciones de las proteínas). La evaluación de la calidad de los productos pesqueros puede realizarse mediante numerosos métodos que se dividen en: sensoriales, microbiológicos, químicos y físicos. Algunos han demostrado ser inadecuados para un determinado propósito y otros han sido útiles solo en situaciones muy específicas o para un número limitado de especies o productos, mientras que otros han resultado muy efectivos para diagnosticar la calidad de estos alimentos.

1.7.1. Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)

La utilización de la reacción con TBA para medir la peroxidación lipídica se remonta al año 1944 cuando Kohn y Liversedge (1944) observaron que tejidos animales incubados aeróbicamente con TBA producían un color rosado. Bernheim y colaboradores (1948) descubrieron que el color rosado se debía a un complejo formado por productos de oxidación de ácidos grasos no saturados y TBA. Yu y Sinnhuber (1957) reportaron que malondialdehído (MDA) era la principal sustancia reactiva al TBA aunque más tarde otros investigadores informaron que otros productos de oxidación podían estar involucrados, como aldehídos no saturados (por ej.: 4-hidroxi-alquenos) y varios precursores de estas sustancias no volátiles no identificados. La principal sustancia reactiva al TBA, el malondialdehído, es un dialdehído de tres carbonos altamente reactivo, generado como uno de los principales bioproductos de la peroxidación de ácidos grasos polinsaturados (Janero, 1990) y también durante el metabolismo de ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas (Marnette, 1999). MDA puede combinarse con diversos grupos funcionales de proteínas, lipoproteínas, ARN y ADN (Sevilla y col, 1997). La determinación de los niveles de MDA en materiales biológicos es un método conveniente, sensible y ampliamente

utilizado para estimar cuantitativamente la extensión de la peroxidación lipídica. Se han descrito diversas técnicas para determinar MDA, como el ensayo de TBA espectrofotométrico, HPLC (Kakuda y col, 1981) y cromatografía gaseosa. La determinación de MDA por este último precisa de su derivatización (Hamberg y col, 1968; Lakshminarayana y Cornwell, 1986; Tomita y col, 1990).

El método espectrofotométrico del TBA es el más comúnmente utilizado para la cuantificación de MDA. La reacción ocurre por ataque del MDA sobre el grupo metileno activo del TBA (Figura 6.2). Un mol de MDA reacciona con dos moles de TBA en medio ácido y a alta temperatura. La velocidad de esta reacción depende de la concentración de TBA, la temperatura y el pH. El pigmento generado posee un pico máximo de absorbancia a 532-535 nm y otro secundario a 245-305 nm (Sinnhuber y col, 1958). El ensayo de TBA puede determinarse también por un procedimiento espectrofluorométrico dado que el espectro de excitación del pigmento TBA-MDA posee un máximo a 532 nm (Yagi, 1984). La especificidad de este método es similar al del método espectrofotométrico, debido a que otros compuestos originados en la degradación de peróxidos lipídicos también pueden generar fluorescencia (Shimasaki y col, 1977).



Los ácidos grasos saturados por su estabilidad química no participan en las modificaciones que sufre el pescado después de la muerte (oxidación).

1.8 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN:

La peroxidación que experimentan los pescados según su forma y tiempo de almacenamiento pueden conllevar a que pierdan sus propiedades nutricionales y que sus atributos sensoriales se tornen desagradables, los cuales se asocian a la rancidez. En el presente estudio intenta describir los niveles de peroxidación, proteína, grasas totales, cenizas y humedad cuando se almacena a -18 grados centígrados durante seis meses, por ser ésta la forma más frecuente de almacenaje de las empresas pesqueras.

Así mismo durante la realización del estudio, se evaluará al MDA, el cual es empleado como un indicador del estrés oxidativo para diversos productos cárnicos, utilizándolo en carnes que contienen alta concentraciones de PUFA como los pescados pero que sin embargo aún no hay trabajos de investigación en el cual se profundice la viabilidad de este método para medir la peroxidación lipídica en este tipo de carnes almacenadas por periodos prolongados de tiempo (6 meses).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, podrán utilizarse para futuras investigaciones que contengan como objetivo determinar el tipo de sistema y tiempo de almacenaje óptimo de pescados en la industria pesquera.

II. HIPÓTESIS

La peroxidación lipídica aumenta con el contenido de lípidos en el músculo del pescado durante la etapa de congelamiento disminuyendo su contenido proteico.

III. OBJETIVOS

Objetivo General:

- El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo general determinar los cambios oxidativos en el tiempo, en el músculo de 2 especies de pescados “Bonito” *Sarda chiliensis chiliensis* y “Caballa” *Scomber japonicus*, congeladas y almacenadas a -18 °C en una planta pesquera por un periodo de 6 meses

Objetivos específicos:

- Determinar los cambios del análisis químico proximal (Proteína, Grasas totales, Humedad, Cenizas) en el tiempo por efecto del almacenamiento en el músculo de las 2 especies de pescado congelado.
- Determinar los cambios oxidativos cada 2 meses en un periodo de 6 meses, empleando como indicador el MDA, en el músculo de 2 especies de pescado, Bonito y caballa, congeladas y almacenadas a -18°C.
- Evaluar la curva obtenida del MDA vs tiempo de almacenamiento, a fin de establecer si es un buen indicador de la peroxidación en las carnes de pescado evaluadas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales:

a. Material Biológico:

Se analizaron 8 ejemplares adultos de las especies *Scomber japonicus*, llamado comúnmente “caballa”, y 8 ejemplares adultos de *Sarda chiliensis chiliensis*, llamado comúnmente “bonito”, los pesos de ambas

fluctuaban entre 250 – 800 g de peso y medían entre 26 – 58 cm de longitud; los cuales fueron brindados por la Corporación Hayduk, en una de sus plantas pesqueras, la cual se encuentra en Coishco, provincia de Chimbote en el departamento de Ancash. La selección de los ejemplares fue por muestreo al azar de un total de aproximadamente 15 de cada especie.

1.2. Material de Laboratorio e insumos:

Los materiales de laboratorio que se utilizaron para la presente investigación se detallan a continuación:

- Estuche de disección
- Mascarilla
- Guantes
- Estándar stock de TBARS (1, 1, 3,3-Tetraethoxy-Propane) al 97%, el cual fue preparado según la metodología de Ric Evans (Ric Evans y col.,1996)
- 0.75% de HCL en 0.25N
- TBA (2 – Thiobarbituric acid) (Marca: Sigma – Aldrich)
- Butanol
- Agua MiliQ ultrapura
- Ácido Sulfúrico concentrado
- Hidróxido de Sodio al 40%
- Ácido Bórico al 4%
- Ácido Clorhídrico 0.2N
- Sulfato de potasio anhidro 3g.
- Sulfato de Cobre (II) penta hidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3.5gr
- Naranja de Metilo

- Tubos de ensayo
- Espátula
- Probeta de 100, 200 y 250 ml
- Erlenmeyer de 250 ml
- Vidrio de reloj

1.3. Equipos:

Los equipos específicos para la investigación con los que se dispuso en el Laboratorio fueron:

- Licuadora de mano (PHILIPS trx1900)
- Estufa T° max 250°C; precisión: +-0.5°C (Fisher scientific)
- Estufa T° max 400°C; precisión: +-1°C (marca Memmer)
- Mufla T° max 1100°C; precisión: +-2°C (marca Memmert)
- Espectrofotómetro de luz visible, rango operativo 325nm a 1100 nm (GENESYS 20 THERMO).
- Pipetas automáticas
- Balanza analítica
- Probeta 250ml
- Equipo de Kjeldahl de digestión y destilación
- Balón para Kjeldahl
- Balanza analítica

2. Metodología

Almacenaje y toma de Muestras

Almacenaje:

Las muestras fueron almacenadas hasta por un periodo de 6 meses a -18 grados centígrados en cámaras de congelación, las cuales estaban construidas con paneles isotérmicos.

De cada pescado se extrajo de la parte de lomo aproximadamente 32 g de muestra a los 15, 60, 120 y 180 días.

Las partes extraídas eran seccionadas con sierra de cintas para pescado y se guardaba en forma inmediata el resto del pescado seccionado.

Las muestras extraídas eran trasladadas y evaluadas a Lima en un periodo no mayor a 24 horas. Para su conservación se empleó un envase aislante y hielo con gel refrigerante. La temperatura era monitoreada al retirarla de la empresa pesquera y al momento de su llegada al laboratorio en Lima. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente en el Laboratorio de Micronutrientes en el LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

2.1 Análisis Proximal de las 2 especies de pescado

A cada una de las muestras se le realizó el análisis proximal según los métodos recomendados por la Sociedad Oficial de Química Analítica (AOAC):

- ✓ -Humedad por secado a 110°C durante 24 horas en una estufa marca Memmert,
- ✓ -Proteínas (N X 6.25) por el método de Kjeldahl,
- ✓ Cenizas por combustión a 450°C durante 12 horas en una mufla marca Memmert y
- ✓ Grasas totales por el método propuesto por Bligh y Dyer (Santana Brum, 2009).

El análisis proximal se llevó a cabo por triplicado en el Laboratorio de Calidad de Corporación Hayduk en Coishco, Chimbote, por el personal de la misma área.

2.1.1 Proteína (Metodo Kjeldahl)

El método Kjeldahl mide el contenido en nitrógeno de una muestra. Este método puede ser dividido, básicamente en 3 etapas: digestión o mineralización, destilación y valoración.

(a) Etapa de digestión: Se introdujo 5 g de muestra en un tubo de mineralización y se puso 3 g de catalizador que suele estar constituido por una mezcla de sales de cobre, óxido de titanio o/y óxido de selenio. De forma habitual se utiliza como catalizador una mezcla de K_2SO_4 : $CuSO_4$: Se (10:1:0,1 en peso). Después se adicionó 10 mL de H_2SO_4 concentrado y 5 mL de H_2O_2 . Posteriormente se colocó a $420\text{ }^\circ\text{C}$ durante un tiempo que dependió de la cantidad y tipo de muestra. Se supo que la digestión había terminado cuando la disolución adquirió un color verde esmeralda característico. En esta etapa, el nitrógeno proteico se transformó en sulfato de amonio por acción del ácido sulfúrico en caliente.

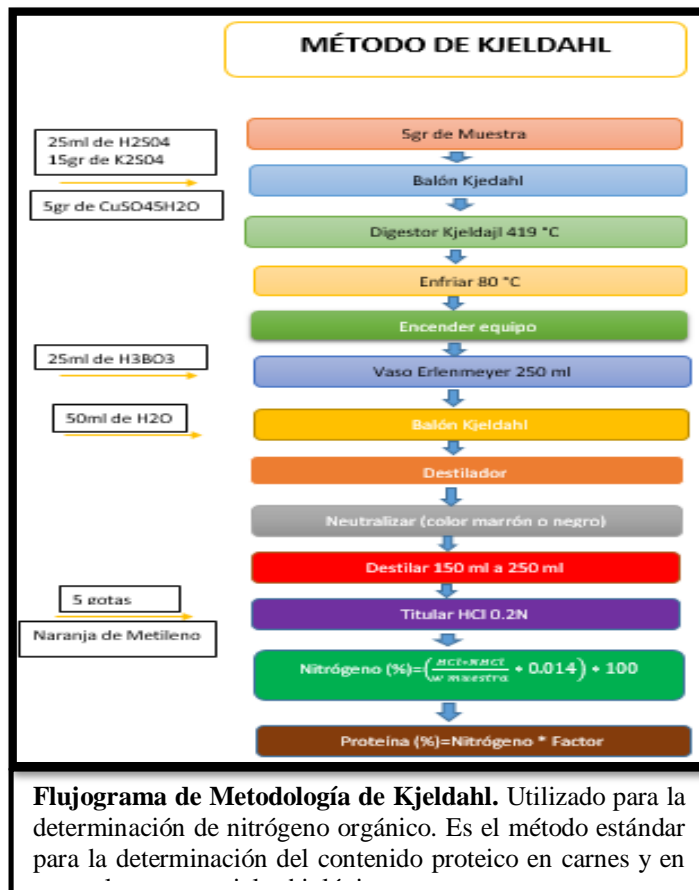
(b) Etapa de destilación: Después de haberse enfriado la muestra, se adicionó al tubo de digestión 50 mL de agua destilada, se puso en el soporte del destilador y se adicionó una cantidad suficiente de hidróxido sódico 10 N, en cantidad suficiente (50 mL aprox.) para alcalinizar fuertemente el medio y así desplazar el amoniaco de las sales amónicas. El amoniaco liberado fue arrastrado por el vapor de agua inyectado en el contenido del tubo durante la destilación, y se recogió sobre una disolución de ácido bórico (al 4 % p/v).

(c) Etapa de valoración: La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realizó por medio de una volumetría ácido-base del ion borato formato, empleando ácido clorhídrico o sulfúrico y como indicador una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno. Los

equivalentes de ácido consumidos correspondieron a los equivalentes de amoniaco destilados.

Luego se realizó los cálculos y factores de conversión respectivos.

Este procedimiento se repitió cada vez que se trajo nueva muestra al laboratorio para su análisis.



2.1.2 Grasa: Método de Bligh y Dyer

Este método emplea un sistema ternario de solventes: metanol, cloroformo y agua, los cuales están en la proporción 2:1:0.8 y forma una fase continua. Cuando la proporción se cambia a 2:2:1.8, se forman 2 fases; la superior que contiene metanol y agua y la inferior que contiene el cloroformo puro.

En el caso de nuestra muestra de pescado de 1g de músculo, previamente picado y homogenizado, se coloca en un tubo de vidrio, que al hacer contacto con la fase continua deshace los complejos lipoproteicos en que corrientemente se encuentran los lípidos en los tejidos.

Las propiedades extractoras de la mezcla ternaria 2:1:0.8 se deben a que por ser polar es capaz de penetrar las capas de proteínas e hidratos de carbono, alcanzando las estructuras lipídicas, disociándolas y liberando la grasa. Al adicionar más cloroformo y más agua, se pasa a la relación 2:2:1.8 en que la mezcla ternaria se divide en 2: el cloroformo con la grasa disuelta se va al fondo y el metanol – agua con los compuestos solubles no lipídicos queda en la superficie. Para realizar la cuantificación del contenido total de lípidos, se pesaron cápsulas de aluminio libres de humedad. Posteriormente, las cápsulas se colocaron en una placa calefactora y en cada cápsula se depositaron 0.5 ml del extracto lipídico. Después de la evaporación del cloroformo, la cápsula se metió en un desecador hasta su enfriamiento, y finalmente se pesó.

El contenido total de grasa del músculo del pescado, se calculó mediante la diferencia entre la cápsula con el residuo seco y la cápsula vacía, y se expresó como los gramos de grasa por cada 100g de musculo.

2.1.3 Humedad

El contenido de agua del músculo se estimó por diferencia de pesada entre el músculo intacto y el músculo deshidratado durante 24h, en una estufa a 110°C. Este procedimiento está basado en el método oficial de la AOAC (1985).

Procedimiento:

Se pesaron cápsulas de papel de aluminio libres de humedad, y en cada una de ellas se incorporaron 0.7 – 1.0g de músculo, anotando el

peso exacto. Las cápsulas se mantuvieron en una estufa a 110°C durante al menos 24h, periodo necesario para que las muestras alcancen peso constante. Las cápsulas se dejaron enfriar en un desecador y posteriormente se pesaron. La humedad, o contenido de agua, se calculó mediante la diferencia de peso del músculo antes y después de haber sido deshidratado.

El contenido de agua se expresó como los gramos de agua por cada 100g de músculo.

2.1.4 Ceniza

La cantidad de cenizas representa el contenido total de minerales en los alimentos y su determinación son parte del análisis próximo para la evaluación nutricional. Las cenizas contienen los elementos inorgánicos, mucho de los cuales son de interés nutricional como es el caso del calcio, fósforo, etc.

Procedimiento:

Primero, se utiliza los crisoles de porcelana, los cuales deben de estar limpios y secos. Luego se pesa en una balanza analítica y se anota el valor del peso. Acto seguido se pesa las muestras de los tejidos musculares de los pescados en un aproximado de 1.5 a 2.0 g de muestra, luego se coloca en un crisol de porcelana previamente tarado. Colocar en un horno incinerador y mantenerlo a temperatura de 450°C durante toda la noche (12 horas). En la mañana siguiente se traslada el crisol a un desecador y enfríelo a temperatura ambiente. Cuando está frío, se pesa el crisol tan pronto como sea posible para prevenir la absorción de humedad y registrar el peso. El porcentaje de ceniza se obtiene del peso de la ceniza en gramos entre el peso de la muestra en gramos, todo multiplicado por 100.

2.2 Evaluación de la Peroxidación de las muestras:

Las pruebas se llevaron a cabo en el Laboratorio de Micronutrientes, en los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

La peroxidación se evaluó empleando la Prueba de TBARS, este método se basa en la reacción del malondialdehído (MDA), producto formado durante la oxidación lipídica, con el ácido tiobarbitúrico (TBA), dando como resultado un compuesto coloreado el que es evaluado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 532nm. La metodología fue la descrita por Rice-Evans (Ric Evans y col., 1996).

Número de muestras y repeticiones:

Por cada periodo de tiempo (15 días, 2, 4 y 6 meses) se evaluaron 16 muestras (8 de bonito y 8 de caballa) por duplicado a fin de asegurar la calidad del resultado (**Ver Anexo 2**)

Pre-tratamiento de la muestra:

Para el ensayo de TBARS, las muestras se homogenizaron mediante la trituración del músculo de pescado con una licuadora de mano, en relación 1/10 P/V con agua MiliQ Tipo I, de la siguiente manera [(peso de la muestra *10) – peso de la muestra].

Preparación de la Solución estándar de TBARS:

Solución Estándar de TBARS:

Según metodología de Ric Evans (MDA 41.7 umoles /ml)

Solución de TBA al 0.75% en HCL en 0.25 N.

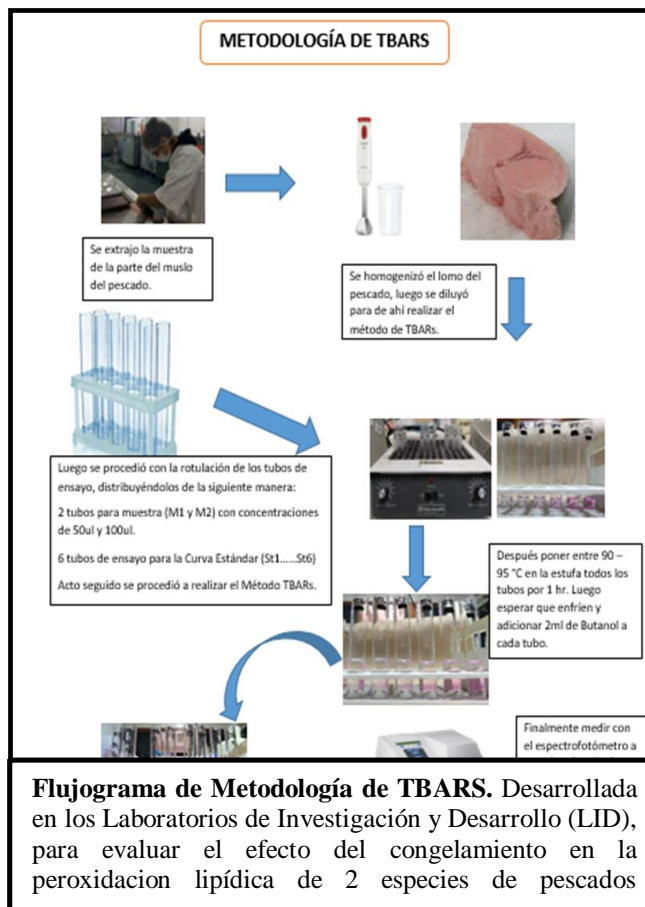
Procedimiento:

Las muestras del homogenizado de músculo para el ensayo de TBARs se diluyeron 1/10 con agua miliQ. (900ul de agua MiliQ Tipo I y 100 ul del homogenizado).

Se hizo una curva estándar utilizando la solución estándar de MDA en 6 tubos de ensayo enumerándolos (st1, st2, st3 etc...) agregándoles en orden y proporcionalmente las cantidades desde 0ul, 50ul, 100ul hasta 250ul, de ahí se completó con agua MiliQ Tipo I hasta 250ul.

Luego se realizó el método el cual consiste en echar 0.5ml TCA y 0.5ml de TBA tanto en las muestras como en todos los tubos de ensayo de la curva estándar, se colocó en el vortex unos breves segundos y posteriormente se incubaron en un baño seco a 90°C - 95°C durante 1 hora.

Al término del tiempo establecido se le adicionó 2ml de butanol, cuya función fue extraer los TBARs; se esperó 1 minuto para la separación de las fases acuosas y butanólica, se extrajo la fase de butanol que contiene los TBARs y se midió la absorbancia a 532nm, tal y como se establece en la metodología de Rice - Evans (1996); luego, se realizó los cálculos y factores de conversión respectivos (García M.E; Fernández S.I; 2012). Todas las muestras fueron procesadas por duplicado.



2.2 Análisis Estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico STATA. Se utilizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis para detectar si existen diferencias entre las medianas de los grupos en estudio con una significancia del 95% ($p < 0.05$), ya que previamente se determinó que la distribución de las muestras no seguía normalidad mediante el test de Shapiro- Wilk.

IV. RESULTADOS

1. Análisis Proximal

En la Tabla 1, 2 y 3 se presentan los datos referidos a la composición química del pescado Bonito y Caballa. Se observa un aumento del contenido de grasas con el tiempo de almacenamiento a -18°C tanto en el músculo de caballa de 12.3 a 18.4 como de bonito, de 1 a 5.6.

Tabla 1. Composición química de la materia prima obtenida a los 15 días de congelado

Especie	%Humedad	%Grasa	%Ceniza	%Proteína
Bonito	76.4	1	1.4	21.6
Caballa	72.1	12.3	1.3	21.5

Tabla 2. Composición química de la materia prima a los 3 meses congelado

Especie	%Humedad	%Grasa	%Ceniza	%Proteína
Bonito	75.3	1.5	1.5	21.7
Caballa	71.5	15.5	1.3	21.7

Tabla 3. Composición química de la materia prima a los 6 meses congelado

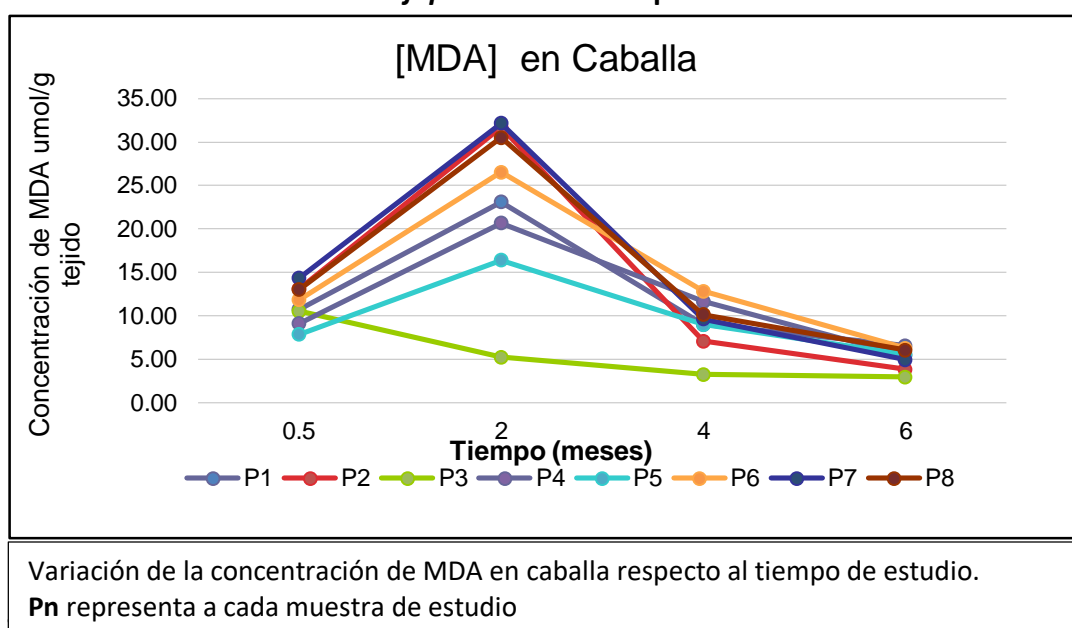
Especie	%Humedad	%Grasa	%Ceniza	%Proteína
Bonito	72.6	5.6	2.0	19.8
Caballa	63.5	18.4	1.5	16.6

Se puede apreciar que el pescado de la especie Caballa al 6to mes de estudio ha disminuido su porcentaje de proteína de 21.5 a 16.6 durante el congelamiento, lo cual al parecer está íntimamente relacionado con el porcentaje de concentración de grasa el cual aumenta de 12.3 a 18.4 en el último mes de estudio. En el caso de la especie de pescado Bonito, al 6to mes sufre una disminución de 21.6 a 19.8 referente a su contenido de proteínas.

2. Peroxidación Lipídica

Tanto en las tablas 4 y 5 como en las gráficas 1 y 2 muestran la peroxidación lipídica, medida como *umoles* de MDA producido por gramo de tejido, para cada muestra de las especies en estudio respectivamente durante el tiempo de congelamiento.

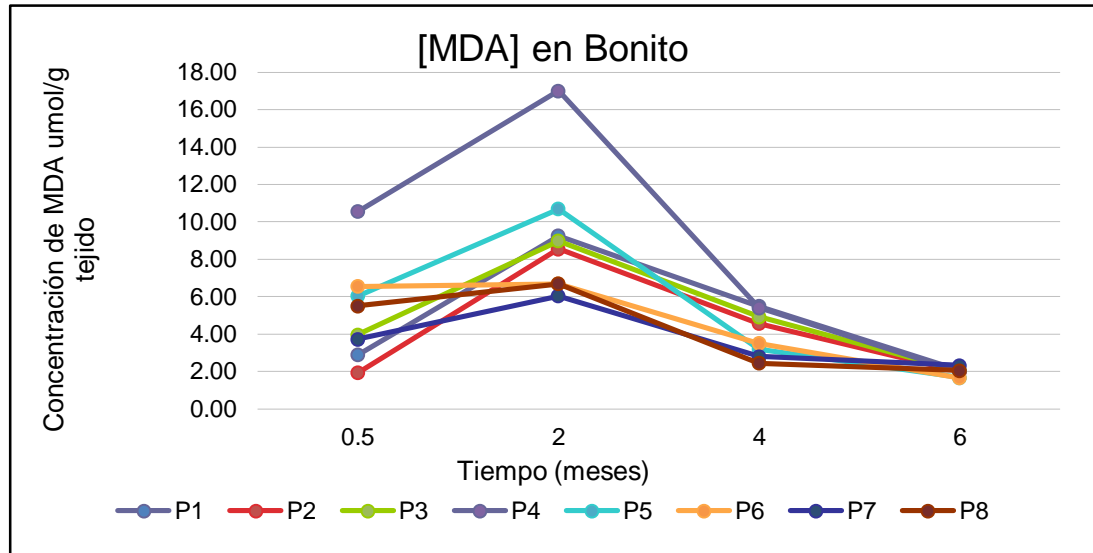
Graf 1: Concentración de MDA umol/g tejido en Caballa “*Scomber japonicus*” vs Tiempo



(*Scomber japonicus*) según el tiempo de almacenamiento

CABALLA				
Muestras	MDA umol/g			
	Tiempo en meses			
	0.5	2	4	6
P1	10.72	23.09	9.00	6.54
P2	13.07	31.68	7.08	3.82
P3	10.53	5.23	3.22	2.96
P4	9.09	20.67	11.64	5.41
P5	7.86	16.38	9.00	5.54
P6	11.83	26.52	12.81	6.26
P7	14.34	32.15	9.61	4.92
P8	13.00	30.50	10.12	6.03

Graf2. Concentración de MDA umol/g tejido en Bonito “*Sarda chiliensis chiliensis*” vs Tiempo



Variación de la concentración de MDA en bonito respecto al tiempo de estudio.
Pn representa a cada muestra de estudio

Tab5. Concentraciones de MDA umol/g de tejido de cada muestra de Bonito (*Sarda chiliensis chiliensis*) según el tiempo de almacenamiento

BONITO				
Muestras	MDA umol/g			
	Tiempo en meses			
	0.5	2	4	6
P1	2.89	9.26	5.49	2.05
P2	1.93	8.56	4.56	1.99
P3	3.98	8.98	4.93	2.03
P4	10.56	17.01	5.40	2.01
P5	6.05	10.69	3.20	1.67
P6	6.55	6.68	3.50	1.66
P7	3.72	6.05	2.81	2.33
P8	5.50	6.69	2.45	2.05

Tanto para el bonito como para la caballa se observa que la concentración de MDA varía con el tiempo, la mayor parte de las muestras de músculo de pescado presentan un incremento de la concentración de MDA al segundo mes de congelación, alcanzando el valor máximo, luego del cual disminuyen hacia el sexto mes de almacenadas a -18°C.

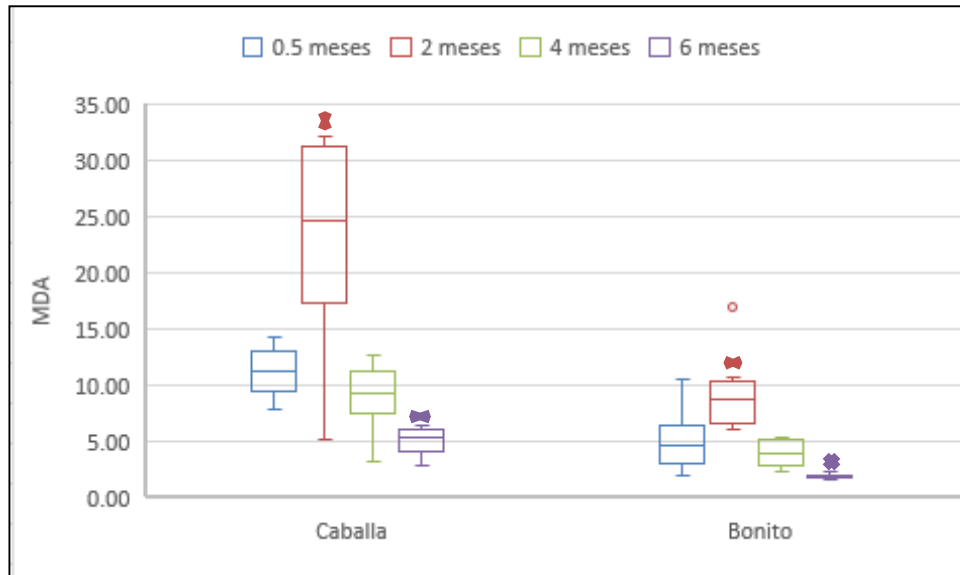
En la prueba de Shapiro Wilk se determinó que los datos no seguían un patrón de normalidad por lo que se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar si existe diferencias entre la peroxidación lipídica en el músculo del pescado de las dos especies en estudio, respecto al tiempo de congelamiento durante los 6 primeros meses de evaluación (**Anexo 3 y 4**). Los datos se muestran en la tabla 6 y gráfica 3:

Tabla 6. Variación de las concentraciones de MDA $\mu\text{mol/g}$ tejido en Caballa y Bonito durante el tiempo de almacenamiento

	0.5 meses	2 meses	4 meses	6 meses
CABALLA	10.72±1.99	23.09±7.65*	9.5±0.56	5.54±0.67*
BONITO	3.98±1.83	8.98±2.01*	4.03±1.08	2.02±0.11*

*Diferencias estadísticamente significativas al grupo control = 0.5 meses, $p <= 0.05$.

Graf3. Comparación de Medianas de la [MDA] entre Caballa y Bonito vs Tiempo de almacenamiento



**Diferencias estadísticamente significativas respecto a la comparación de las medianas de las especies en estudio respecto al tiempo. ($p < 0.05$)*

Se puede observar que las concentraciones de MDA son diferentes para cada especie estudiada, siendo mayores para caballa que para bonito.

También se observa que la concentración de MDA para ambas especies aumenta a los 2 meses de congelación, tiempo a partir del cual disminuye a valores menores que al inicio del estudio, siendo las diferencias estadísticamente significativas.

V. DISCUSIÓN

El presente estudio buscó evaluar el efecto del congelamiento sobre la peroxidación lipídica en el músculo de 2 especies de pescados almacenados en una planta pesquera y se enfatizó en 3 puntos, los cuales mencionaremos a continuación:

(1) Diferencia en el análisis proximal encontrado entre caballa y bonito

La composición química de los peces varió considerablemente entre las 2 especies evaluadas dependiendo de la edad, medio ambiente y estación del año. Las variaciones en la composición química del pez están estrechamente relacionadas con la alimentación, nado migratorio y cambios sexuales relacionados con el desove. El pez tiene períodos de inanición por razones naturales y fisiológicas (como desove o migración) o bien por factores externos como la escasez de alimento.

Proteína. El resultado guarda relación con la composición reportada por Stansby (Stansby, 1963) y Younger (Youngner & McKell, 1972). Según estos autores, los valores de proteína del músculo de pescado presentan un mínimo de 6% y un máximo de 28% variando normalmente entre el 16% y el 21%, mientras que para la carne de ganado vacuno el porcentaje es del 20%.

(Infante Gravier, Cotes, Betancourt, & Lacera, 1980) Infante y col, 1980, estudiaron la composición química y el contenido mineral del músculo de 7 especies de pescado, 5 de ellas netamente marinas como el Pargo (*Lutjanus synagris*), Carite (*Scomberomorus maculatus*), Mojarra (*Euguerres plumieri*), Jurel (*Caranx hipos*), Robalo (*centropomus undecimalis*), una estuarina, la Lisa (*Mugil incilis*), y una dulceacuícola, el Bocachico (*Prochilodus reticulatus magdalenae*). El valor medio de la proteína de las especies marinas fue 15.52%, mientras que para la estuarina y la dulceacuícola fue de 14.82% y 13.22% respectivamente, lo que revela que el valor medio del contenido de proteína tanto para el bonito (21%) y de la caballa (19.93%) durante los 6 meses de estudio, está por encima de las citadas especies. Sin embargo, investigadores de Instituto del Mar Peruano (IMARPE 1996), para la sardina (*Sardinops agax sagax*), la caballa (*Scomber japonicus*) y el atún (*Thunnus*

albacares), encontraron valores promedios de 20.20%, 19.50% y 23.30% de proteína respectivamente; con lo cual quedaría confirmado que las dos especies utilizadas para el presente estudio se encuentra dentro de los parámetros establecidos.

Humedad. El agua es el principal componente del pescado, llegando a formar hasta un 80% de la parte comestible. Por lo general existe una relación inversa entre la grasa y el contenido de agua del tejido muscular del pescado, siendo según Stansby (Stansby,1963), la suma de ambas cercanas al 80%,este valor se corresponde con los reportados por otras fuentes (Lowell, 1978), (Hearn, 1987) y se evidencia en los resultados de este trabajo, al encontrar que la muestra de bonito durante los 6 meses de evaluación tuvo como contenido final de humedad 72.6%, presentando un valor de grasa de 5.6% y para caballa presentó 63.5% de humedad y 16.5% de grasa. Este elevado contenido de humedad favorece el crecimiento microbiano y las reacciones enzimáticas que conllevan al rápido deterioro del alimento si no se almacena a condiciones adecuadas (Fennema, 1985).

Grasa. En el caso de los peces, la fracción lipídica es el componente que muestra la mayor variación. A menudo, dentro de ciertas especies la variación presenta una curva estacional característica con un mínimo cuando se acerca la época de desove. El bonito (*Sarda chiliensis chiliensis*) tuvo un valor inicial de 1% y un valor final de 5.6% de grasa a los 6 meses de congelación, considerándose un pescado de grasa media cuando el contenido de éstas se encuentran entre 5 – 15% y la caballa (*Scomber japonicus*), fue de 16.5% considerándose un pescado de grasa alta, cuando el valor supera el 15% los cuales están dentro del rango propuesto por Stansby (Stansby,1963). Es claro que esta clasificación varía según la proporción del pescado donde se tome la muestra, porque existe una tendencia a que en la región próxima a la cabeza la proporción de aceites es mayor que la encontrada en la cola o cerca de ella.

La variación en el contenido de grasa en el tiempo de conservación se debe a la hidrólisis enzimática de lípidos, con la consecuente liberación de ácidos grasos libres, lo cual conduce a la disminución de la capacidad de absorción de agua de las

proteínas miofibrilares y a la alteración de sus propiedades reológicas (dureza, elasticidad) durante el descongelamiento en el músculo del pescado. (Shenouda,1980). Esta pérdida de humedad durante el tiempo de almacenamiento, altera los porcentajes hallados inicialmente en el análisis proximal, observando así un aumento en el porcentaje de el contenido de grasa en el análisis efectuado a los 6 meses.

(2) Diferencia en la peroxidación entre caballa y bonito

Las especies grasas de pescado presentan un periodo de vida en estado congelado muy inferior a las especies magras, fundamentalmente debido al desarrollo de sabores y olores rancios (Pazos Palmeiro, 2005).

Tanto la caballa como el bonito son considerados pescados grasos, debido a que tienen un alto nivel de PUFAs, lo cual hace que los lípidos de origen marino, comparados con los lípidos de animales terrestres, presentan una elevada susceptibilidad a la oxidación (Kolakowska, Zienkowicz, & Bienkiewicz, 2006) .

Como se puede observar tanto en la **graf.1** y **graf.2** de la concentración de MDA $\mu\text{mol/g}$ tejido ambas especies presentan una variación a los 2 meses, siendo en la “caballa” (*Scomber japonicus*) más elevado dichas concentraciones, la más alta fluctuó entre los 31 – 33 $\mu\text{mol/g}$ tejido, a comparación del “bonito” (*Sarda chiliensis chiliensis*), que osciló la más alta entre los 16 – 18 $\mu\text{mol/g}$ tejido; esto se debe a que, si bien es cierto ambos son pescados grasos , la caballa es el más graso entre los dos, debido al alto contenido en ácidos grasos ω -3, el cual le confiere un elevado carácter funcional, por consiguiente perjudica dramáticamente su estabilidad durante su almacenamiento. Según la **Tabla 7**, se muestra los periodos de vida útil aproximados del pescado graso y pescado magro mantenido a -18 y -25°C , temperaturas de congelación normalmente empleadas para el almacenamiento industrial de los alimentos (Ackman & Gunnlaugsdottir, 1992), (Pazos Palmeiro, 2005).

Tabla 7. Meses de vida útil de las especies pesqueras grasas y magras durante el almacenamiento en congelado a -18 y -25 °C

Producto	-18°C	-25°C
Pescado graso (sardinas, caballa, jurel...)	4	8
Pescado magro (bacalao, merluza.....)	8	18

*Fuente: Tesis Doctoral de Manuel Pazos, 2005.

En el cual podemos observar que tanto para la caballa como el bonito almacenados en congelado a -18°C, su mes de vida útil es hasta el 4to mes y luego se inicia la peroxidación, siempre y cuando se tenga un correcto procedimiento de conservación.

En nuestro trabajo experimental resultó distinto, al segundo mes de evaluación se encontró un valor máximo de peroxidación en ambas especies, lo cual se contrapone a lo expuesto por *Ackman y Gunnlaugsdottir*, en 1992 y usado por el *Dr. Pazos* como referencia en su tesis doctoral en el 2005. Lo más probable es que este resultado se deba al mal funcionamiento de la cámara de congelación de la empresa, la cual estaba programada para que funcione a -18°C, pero su temperatura oscilaba entre -16°C y -14°C; adicionalmente, los especímenes se encontraban ubicados cerca a la entrada de la misma, y como es bien sabido las puertas de los almacenes de frigoríficos no son un buen referente para mantener las correctas temperaturas de congelación normalmente empleadas para el almacenamiento industrial del alimento y así poder asegurar no sólo la calidad sino también la inocuidad del mismo.

(3) Variación de MDA en el tiempo

Dado que la peroxidación aumenta con el tiempo de almacenamiento, se esperaba que el MDA se incremente durante los 6 meses de evaluación; sin embargo se observa que se incrementa a los 2 meses y luego cae. Este comportamiento se da para ambas especies estudiadas (ver las gráficas de Concentración de MDA $\mu\text{mol/g}$ tejido vs tiempo de almacenamiento tanto para Caballa como para Bonito, graf1 y graf2,) por lo que se presume que el MDA, producto de la peroxidación, comenzaría a reaccionar con azúcares, aminoácidos, glucosa y otros constituyentes del pescado durante el almacenamiento, transformándose en otro compuesto que el reactivo de TBARS no colorea y haciendo que disminuya su concentración progresivamente hasta el último mes de evaluación (6 meses). Los niveles de MDA encontrado al término del segundo mes de almacenamiento en la cámara de congelación indicaría que desde ese periodo empezaría la formación de olores desagradables y otros compuestos volátiles, presentando impacto negativo en la percepción sensorial, interfiriendo de esa manera en la cuantificación correcta de la concentración de TBARS. (Jouki, Yazdi, & Mortazavi, 2007).

El indicador de MDA - TBARS ha sido empleado por otros autores para la peroxidación lipídica en carne (Piedrahita M. & Suarez M., 2014); sin embargo, no se ha encontrado literatura que haya sido empleado para pescado en tiempos prolongados de conservación, dado los resultados encontrados, este indicador no nos ha sido útil para evaluar la peroxidación en la carne de pescado para tiempos mayores a 2 meses bajo las condiciones de este estudio. (Benavent M., 2016).

VI. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales trabajadas en el presente estudio se concluye:

- El contenido de porcentaje de grasas totales aumenta significativamente con el tiempo de almacenamiento a -18 grados centígrados a los 2, 4 y 6 meses, para la Caballa varia de 12.3 hasta 18.4%; y, el Bonito va variando de 1 hasta 5.6%,
- El contenido de porcentaje proteínas en el músculo de pescado disminuye a los 6 meses del tiempo de congelamiento
- La peroxidación lipídica medida por la concentración de MDA, es mayor en el músculo de caballa que del bonito, sin embargo, se muestra variaciones con el tiempo de almacenamiento alcanzando un valor máximo a los 2 meses, luego del cual desciende a un valor inferior a la inicial.
- La medición del nivel de peroxidación (MDA) con el reactivo de TBARS no sería un indicador confiable de la peroxidación para las muestras que han sido almacenadas por tiempos mayores a 2 meses

VII. RECOMENDACIONES

En base a los resultados encontrados en nuestro estudio, se presentan las siguientes recomendaciones para futuras investigaciones:

- Realizar una evaluación sensorial detallada a las muestras desde el tiempo $t=0.5$ al $t=6$ meses, para poder observar los cambios post mortem durante el tiempo de estudio que se mantuvo en la cámara de congelado.
- Realizar estudios del nivel de peroxidación incluyendo otros tipos de análisis como el Índice de peróxidos y el de hierro hemínico, con ello se podría dar resultados más precisos sobre como influiría el congelamiento en la peroxidación lipídica en los músculos de pescado en evaluación.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

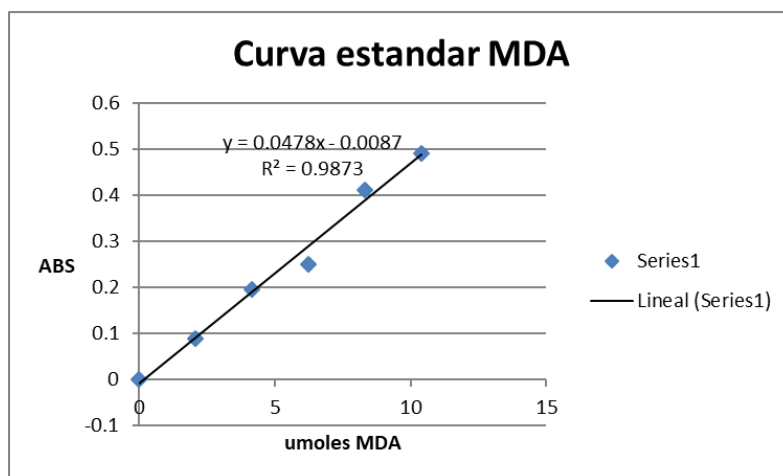
1. Ackman, R., & Gunnlaugsdottir, H. (1992). Lipid Oxidation in Food. En R. Ackman, & H. Gunnlaugsdottir, *Lipid Oxidation in Food* (págs. 208-230). Washington, D.C: ACS Symp.
2. Aquerreta, Y. (2003). *Alimentos. Composición y propiedades*. España: McGraw-Hill-Interamericana.
3. Belitz, H. (1997). *Química de los Alimentos*. España: Acirbia, S.A.
4. Benavent, M. (2016). *Efecto del tiempo de conservación y de la temperatura en los parámetros oxidativos de carne de potro*. Tesis. Tecnología de la Calidad e Industrias Agroalimentarias. Univ. Navarra, España.
5. Burt, J., & Hardy, R. (1992). Composition and deterioration of pelagic fish. *Cambridge: Blackwell Scientific Publications Inc.*, 115 - 141.
6. Castro Gonzalez, M. I. (2013). Perfil de ácidos grasos de diversas especies. *Nutrition Review*, 1981-1989.
7. Chirinos de Vildoso, A. (1960). *Estudios sobre la reproducción del bonito *Sarda chilensis* en aguas adyacentes a la costa peruana*. España: Ministerio de Agricultura, Dirección de Pesquería y Caza.
8. Collette y Chao. (1975). Systematics and morphology of the bonitos (*Sarda*) and their relatives. En *Systematics and morphology of the bonitos (*Sarda*) and their relatives* (págs. 516 - 625). U.S: Fish.Bull.
9. Collette y Nauen. (1983). Scombrids of the World: An Annotated and Illustrated Catalogue of Tunas, Mackerels, Bonitos and Related Species Known to Date. *FAO Species Catalogue, Vol. 2*.
10. Collette, B. (01 de marzo de 2011). *IUCNREDLIST*. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T170352A6763952.en>
11. Conn, M. (2008). *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. New Jersey: Humana Press.
12. FAO. (2016). Estado Mundial de la Pesca y Acuicultura. *Estado Mundial de la Pesca y Acuicultura*.
13. Fennema, O. (1985). *Food Chemistry. Part I*. New York: Inc.
14. Gil Hernandez, Á. (2010). *"Tratado de Nutrición"*. Rustica.
15. Haard. (1992). *Seafood Safety, Processing, and Biotechnology*. Vancouver, Canada: Technomic P.
16. Hearn, T. (1987). Stability of polyunsaturated fatty acids after microwave cooking of fish. *J Food Sci*.
17. Huss, H. H. (1998). *El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad*. Italia: ISBN.
18. Iglesias Neira, J. (10 de marzo de 2009). *Digital.CSIC*. Obtenido de DC: <http://hdl.handle.net/10261/100799>
19. Infante Gravier, J., Cotes, G., Betancourt, J., & Lacera, A. (1980). Análisis Bromatológico de siete especies de pescado (refrigerado y congelado) comerciales en el Caribe Colombiano. *Ingeniería Pesquera*, 28-50.
20. INFOPECA (Centro para los servicios de información y asesoramiento sobre la comercialización de los productos pesqueros de América Latina y el Caribe). (2010).
21. Jouki, M., Yazdi, F., & Mortazavi, S. (2007). Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 88-97.

22. Kolakowska, A., Zienkowicz, L., & Bienkiewicz, G. (2006). *Lipid changes and sensory quality of whole and gutted rainbow trout during storage in ice*. Acta Ichthyol.
23. Lowell, R. (1978). *Biochemical and Biophysical Perspectives in marine biology*. New York: Academic Press.
24. Lozano Rey, L. (1952). *Pesces fisoclistos*. Madrid, España: Memorias de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
25. Mendo Aguilar, J. (1984). Edad, crecimiento y algunos aspectos reproductivos y alimentarios de la caballa (*Scomber japonicus peruanus*). *Edad, crecimiento y algunos aspectos reproductivos y alimentarios de la caballa (Scomber japonicus peruanus)*. Lima, Callao, Peru: Bol Inst Mar Perú. 8(4) 1984: p. 105-156.
26. ML Fernandez, G. A.-F. (1993). Dietary fat saturation modifies the metabolism of LDL subfractions in guinea pigs. *arteriosclerosis*, 15-20.
27. Paz Quiroz, F. (15 de Julio de 2017). *Andina*. Obtenido de <https://andina.pe/agencia/noticia-exportaciones-pesqueras-sumaron-1563-millones-a-mayo-del-2019-758748.aspx>
28. Pazos Palmeiro, M. (25 de Febrero de 2005). *Digital Scic*. Obtenido de http://digital.csic.es/bitstream/10261/89551/1/Tesis_Pazos_Manuel.pdf
29. Piedrahita M., D., & Suarez M., H. (Octubre de 2014). Control de la oxidación lipídica en filetes de pescado. *Control de la oxidación lipídica en filetes de pescado*. Medellín, Colombia.
30. Piñeiro Corrales, G. (2013). Papel de los ácidos grasos omega-3 en la prevención de enfermedades cardiovasculares. *Nutricion Hospitalaria*.
31. PRODUCE (Ministerio de la Producción). 2011. Tallas mínimas de captura de los peces e invertebrados marinos y longitud mínima de malla para la extracción de recursos hidrobiológicos en el litoral (en línea). Consultado 01 Sept. 2017. Disponible <http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/-1/tallas-minimas-captura-depescado.pdf>
32. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids" *Free Radical of Biology and Medicine*, 20, 7 (1996) 933-56
33. Rodriguez Cruz, M. (2005). Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Revista de Investigacion Clinica* .
34. Ross, R. (2010). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty. *Nutrition Reviews*, 280-289.
35. Salas Maldonado, A. C. (2008). Uso de antioxidantes para la estabilidad oxidativa de la pulpa de anchoveta (*Engraulis ringens*) almacenada en congelación. Lima, Lima, Peru: Cybertesis.UNMSM.
36. Samamé, M. (17 de junio de 1997). Edad y crecimiento del Bonito Sarda Chiliensis Chiliensis (Cuvier). *Edad y crecimiento del Bonito Sarda Chiliensis Chiliensis (Cuvier)*. Lima, Callao, Peru: IMARPE.
37. Santana Brum, A. A. (2009). Metodos de extraccion y calidad de la fraccion lipidica de materias primas de origen vegetal y animal. *Quimica Nova*, 849-854.
38. Schaefer, K. (1980). Synopsis of biological data on the chub mackerel. En K. Schaefer, *Synopsis of biological data on the chub mackerel* (págs. 395 - 446). IATTC.

39. Stansby, M. (1963). *Industrial Fishery Technology*. New York: Reinold Publishing Corporation.
40. Valls Puig, J. (2007). Metodos Fisicos y Quimicos para la Evaluacion de la Calidad y Frescura de los Recursos y Productos Marinos. *Researchgate*, 2-56.
41. Villanueva Escobedo, J. C. (Diciembre de 2015). *UNSA Investiga*. Obtenido de UNSA Investiga: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/337>
42. Watanabe, T. (1970). *Morphology and ecology of early stages of life in japanese common mackerel Scomber japonicus*. Japon: Bull. Tokai Reg. Fish.Res. Lab. 62, 1-283.
43. Youngner, V., & McKell, C. (1972). *The Biology and Utilization of Grasses*. California: ACADEMIC PRESS.

IX. ANEXOS

Anexo1: Curva de Calibración de MDA por el Método de TBARS



Anexo 2: Lectura de Absorbancia a 532nm para la determinación de MDA por el Método de TBARS

Primera toma: Lectura de la absorbancia de la Caballa y del Bonito a los 0.5 meses de almacenamiento a -18°C

CABALLA			
Tiempo: 0.5 meses	Muestras	Volumen de muestra	Absorbancia (nm)
P1	M1	50 uL	0.250
	M2	100 uL	0.459
P2	M1	50 uL	0.350
	M2	100 uL	0.523
P3	M1	50 uL	0.280
	M2	100 uL	0.481
P4	M1	50 uL	0.250
	M2	100 uL	0.480
P5	M1	50 uL	0.212
	M2	100 uL	0.419
P6	M1	50 uL	0.210
	M2	100 uL	0.405
P7	M1	50 uL	0.340
	M2	100 uL	0.500
P8	M1	50 uL	0.250
	M2	100 uL	0.500

BONITO			
Tiempo: 0.5 meses	Muestras	Volumen de muestra	Absorbancia (nm)
P1	M1	50 uL	0.065
	M2	100 uL	0.130
P2	M1	50 uL	0.071
	M2	100 uL	0.140
P3	M1	50 uL	0.075
	M2	100 uL	0.130
P4	M1	50 uL	0.224
	M2	100 uL	0.450
P5	M1	50 uL	0.225
	M2	100 uL	0.450
P6	M1	50 uL	0.160
	M2	100 uL	0.232
P7	M1	50 uL	0.140
	M2	100 uL	0.275
P8	M1	50 uL	0.110
	M2	100 uL	0.220

Segunda toma: Lectura de la absorbancia de la Caballa y del Bonito a los 2 meses de almacenamiento a -18°C

CABALLA			
Tiempo: 2 meses	Muestras	Volumen de muestra	Absorbancia (nm)
P1	M1	50 uL	0.310
	M2	100 uL	0.500
P2	M1	50 uL	0.301
	M2	100 uL	0.523
P3	M1	50 uL	0.041
	M2	100 uL	0.116
P4	M1	50 uL	0.134
	M2	100 uL	0.270
P5	M1	50 uL	0.193
	M2	100 uL	0.386
P6	M1	50 uL	0.120
	M2	100 uL	0.241
P7	M1	50 uL	0.251
	M2	100 uL	0.525
P8	M1	50 uL	0.248
	M2	100 uL	0.499

BONITO			
Tiempo: 2 meses	Muestras	Volumen de muestra	Absorbancia (nm)
P1	M1	50 uL	0.100
	M2	100 uL	0.201
P2	M1	50 uL	0.105
	M2	100 uL	0.210
P3	M1	50 uL	0.114
	M2	100 uL	0.228
P4	M1	50 uL	0.174
	M2	100 uL	0.350
P5	M1	50 uL	0.200
	M2	100 uL	0.400
P6	M1	50 uL	0.100
	M2	100 uL	0.211
P7	M1	50 uL	0.063
	M2	100 uL	0.126
P8	M1	50 uL	0.070
	M2	100 uL	0.135

Tercera toma: Lectura de la absorbancia de la Caballa y el Bonito a los 4 meses de almacenamiento a -18°C

CABALLA			
Tiempo: 4 meses	Muestras	Volumen de muestra	Absorbancia (nm)
P1	M1	50 uL	0.240
	M2	100 uL	0.480
P2	M1	50 uL	0.149
	M2	100 uL	0.290
P3	M1	50 uL	0.051
	M2	100 uL	0.100
P4	M1	50 uL	0.241
	M2	100 uL	0.483
P5	M1	50 uL	0.182
	M2	100 uL	0.360
P6	M1	50 uL	0.260
	M2	100 uL	0.520
P7	M1	50 uL	0.200
	M2	100 uL	0.395
P8	M1	50 uL	0.165
	M2	100 uL	0.350

BONITO			
Tiempo: 4 meses	Muestras	Volumen de muestra	Absorbancia (nm)
P1	M1	50 uL	0.130
	M2	100 uL	0.260
P2	M1	50 uL	0.072
	M2	100 uL	0.140
P3	M1	50 uL	0.086
	M2	100 uL	0.170
P4	M1	50 uL	0.123
	M2	100 uL	0.245
P5	M1	50 uL	0.062
	M2	100 uL	0.100
P6	M1	50 uL	0.073
	M2	100 uL	0.142
P7	M1	50 uL	0.046
	M2	100 uL	0.111
P8	M1	50 uL	0.044
	M2	100 uL	0.089

Cuarta toma: Lectura de la absorbancia de la Caballa y el Bonito a los 6 meses de almacenamiento a -18°C

CABALLA			
Tiempo: 6 meses	Muestras	Volumen de muestra	Absorbancia (nm)
P1	M1	50 uL	0.137
	M2	100 uL	0.280
P2	M1	50 uL	0.053
	M2	100 uL	0.160
P3	M1	50 uL	0.063
	M2	100 uL	0.129
P4	M1	50 uL	0.137
	M2	100 uL	0.272
P5	M1	50 uL	0.124
	M2	100 uL	0.243
P6	M1	50 uL	0.122
	M2	100 uL	0.240
P7	M1	50 uL	0.116
	M2	100 uL	0.230
P8	M1	50 uL	0.150
	M2	100 uL	0.298

BONITO			
Tiempo: 6 meses	Muestras	Volumen de muestra	Absorbancia (nm)
P1	M1	50 uL	0.020
	M2	100 uL	0.040
P2	M1	50 uL	0.022
	M2	100 uL	0.030
P3	M1	50 uL	0.019
	M2	100 uL	0.040
P4	M1	50 uL	0.018
	M2	100 uL	0.040
P5	M1	50 uL	0.010
	M2	100 uL	0.020
P6	M1	50 uL	0.009
	M2	100 uL	0.021
P7	M1	50 uL	0.025
	M2	100 uL	0.050
P8	M1	50 uL	0.020
	M2	100 uL	0.040

ANEXO 3: Análisis Estadístico de Test Shapiro - Wilk para determinar si tiene distribución normal

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
mda1	7	0.98499	0.197	-2.057	0.98014
mda2	7	0.92849	0.939	-0.096	0.53813
mda3	9	0.91450	1.256	0.389	0.34863
mda4	9	0.88900	1.631	0.860	0.19488
mda4	9	0.88900	1.631	0.860	0.19488

-> grupo = 2

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
mda1	7	0.91261	1.148	0.217	0.41424
mda2	7	0.84194	2.076	1.261	0.10357
mda3	8	0.90852	1.274	0.402	0.34375
mda4	8	0.83096	2.355	1.548	0.06075
mda4	8	0.83096	2.355	1.548	0.06075

ANEXO 4: Análisis Estadístico de Test Kruskal – Wallis para determinar la diferencia entre las medianas de los grupos en estudio

```
. kwallis caballa if grupos==1|grupos==4,by(grupos)
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
```

grupos	Obs	Rank Sum
1	7	91.00
4	9	45.00

```

chi-squared = 11.118 with 1 d.f.
probability = 0.0009

chi-squared with ties = 11.118 with 1 d.f.
probability = 0.0009

. kwallis caballa if grupos==2|grupos==3,by(grupos)
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
```

grupos	Obs	Rank Sum
2	7	83.00
3	9	53.00

```

chi-squared = 6.188 with 1 d.f.
probability = 0.0129

chi-squared with ties = 6.197 with 1 d.f.
probability = 0.0128
```

```
. kwallis caballa if grupos==1|grupos==2,by(grupos)
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
```

grupos	Obs	Rank Sum
1	7	35.00
2	7	70.00

```

chi-squared = 5.000 with 1 d.f.
probability = 0.0253

chi-squared with ties = 5.000 with 1 d.f.
probability = 0.0253

. kwallis caballa if grupos==1|grupos==3,by(grupos)
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
```

grupos	Obs	Rank Sum
1	7	74.00
3	9	62.00

```

chi-squared = 2.356 with 1 d.f.
probability = 0.1248

chi-squared with ties = 2.359 with 1 d.f.
probability = 0.1245
```

```
. kwallis caballa if grupos==2|grupos==4,by(grupos)
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
```

grupos	Obs	Rank Sum
2	7	85.00
4	9	51.00

```

chi-squared = 7.286 with 1 d.f.
probability = 0.0070

chi-squared with ties = 7.286 with 1 d.f.
probability = 0.0070

. kwallis caballa if grupos==3|grupos==4,by(grupos)
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
```

grupos	Obs	Rank Sum
3	9	118.00
4	9	53.00

```

chi-squared = 8.236 with 1 d.f.
probability = 0.0041

chi-squared with ties = 8.244 with 1 d.f.
probability = 0.0041
```

Anexo 5: Características del producto: 2 – Thiobarbituric acid (Sigma – Aldrich).

T5500 **Sigma-Aldrich**

2-Thiobarbituric acid

≥98%

Synonym: 4,6-Dihydroxy-2-mercaptopyrimidine, 4,6-Dihydroxypyrimidine-2-thiol, TBA

CAS Number 504-17-6 | Empirical Formula (Hill Notation) C₄H₄N₂O₂S | Molecular Weight 144.15 | Beilstein/REAXYS Number 120663 | EC Number 207-985-8 |
MDL number MFCD00006674 | PubChem Substance ID 249002856 | NACRES NA.25

Oc1nc(S)nc(O)c1

◆ SDS Certificate of Analysis (COA)

SKU-Pack Size	Availability	Pack Size
T5500-25G	✓ Available to ship on 05.06.20 - FROM	25 g
T5500-100G	✓ Available to ship on 05.06.20 - FROM	100 g
T5500-250G	✓ Only 5 left in stock (more on the way) - FROM	250 g
T5500-500G	✓ Available to ship on 05.06.20 - FROM	500 g

To order products, please contact your local dealer. [Click here](#)

Anexo 6: Características del producto: Espectrofotómetro Visible GENESYS 20, THERMO

ESPECTROFOTÓMETRO VISIBLE GENESYS™ 20, THERMO



CARACTERÍSTICAS

Espectrofotómetro visible GENESYS™ 20, Thermo Scientific
GENESYS™ 20 es un espectrofotómetro adecuado para análisis de rutina en laboratorios de formación, de control de calidad y de producción. Es fiable, robusto y preciso, con impresora integrada (opcional). Hay disponibles una gran variedad de soportes para cubetas estándar, como viales DQO, cubetas de 50 mm, filtros y tubos de ensayo.

- Teclado de membrana con protección contra salpicaduras, de fácil limpieza
- Pantalla LCD multilingüe
- Visualización clara y directa
- Teclado de 10 teclas fácil de usar

GENESYS™ 20
Fuente de luz: Lámpara de wolframio
Sistema óptico: Haz simple
Rango de medición: 325–1100 nm
Ancho de banda: 8 nm
Exactitud: +/-2,0 nm
Rango fotométrico: -0, 1–2, 5A, 0–125% T, 0–1999C, absorción, transmisión, concentración, factores
Pantalla: LCD con 2 líneas y 20 caracteres
Soporte de cubetas estándar: Soporte para cubetas de 10 mm y tubos
Memoria de métodos: Parámetros en memoria fija
Memoria de datos: No
Impresora, interna (opcional): 20 columnas
Dimensiones: 300x330x190 mm
Peso: 4,5 Kg
Garantía: 3 años
Accesorios incluidos: Funda, manual de instrucciones, 5 cubetas un solo uso