

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**“INFLUENCIA DE LA COMBINACIÓN DE TRATAMIENTOS CON
ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA, RECUBRIMIENTO DE
QUITOSANO Y ENVASADO A VACÍO EN LA CALIDAD
MICROBIOLÓGICA, pH, COLOR Y TEXTURA DE LANGOSTINOS
REFRIGERADOS”**

TRABAJO FIN DE GRADO

Septiembre-2016

Autor: Cristina Pardo García

Tutor/es: Casilda Navarro Rodríguez de Vera

Clemencia Chaves López



“Influencia de la combinación de tratamientos con alta presión hidrostática, recubrimiento de quitosano y envasado a vacío en la calidad microbiológica, pH, color y textura de langostinos refrigerados”

RESUMEN

Debido al aumento de consumo de crustáceos, a la importación de los mismos de zonas lejanas, a la necesidad de más tiempo para que lleguen hasta su destino final y a la demanda de los consumidores de técnicas de conservación alternativas a las térmicas, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto singular y combinado de la alta presión hidrostática, el recubrimiento de quitosano y el envasado a vacío sobre la vida útil de los langostinos conservados a 8°C; además de determinar la influencia de dicho tratamiento en el color, textura y pH de las muestras. La vida útil de los langostinos se vio aumentada tras la aplicación de algunos de los tratamientos aplicados. Los tratamientos produjeron un mantenimiento del color y una mejora de la textura de los langostinos.

PALABRAS CLAVE: Alta presión hidrostática, quitosano, envasado a vacío, calidad microbiológica y langostinos.

“ Influence of combination treatments with high hydrostatic pressure, chitosan coating and vacuum packaging in microbiological quality, pH, color and texture of shrimp ”

ABSTRACT

Due to increased consumption of shellfish, distant capture areas, the longer transportation time to reach their final destination and the consumers demand for new alternative techniques to thermal conservation, the aim of this study was to determine the singular and combined effect of high hydrostatic pressure, chitosan coating and vacuum packaging on the shelf life of the preserved shrimp to 8 °C, in addition, to determinate the influence of such treatments on color, texture and pH of shrimps. The shelf life of shrimps was increased due to some of the applied

treatment. The results showed significant differences for pH, color and texture in shrimps, .preserving color and improving texture.

KEYWORDS: high-hydrostatic pressure, chitosan, vacuum packed, microbiological quality and shrimp.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis dos tutoras Clemencia Chaves López y Casilda Navarro Rodríguez de Vera por toda la ayuda, apoyo y consejos prestados durante la realización de este trabajo, gracias por enseñarme tanto.

Agradecer a todo el departamento de microbiología y a los compañeros de la Universidad de Teramo por compartir estos meses geniales, me sentí muy bien desde el primer día. Agradecer especialmente a Chiara toda la ayuda prestada, sin ti no hubiera podido, "quanto sei brava". Sin olvidar a todos con los que he vivido la experiencia italiana (compañeros de piso, de fiestas, de clases, descansos...), "grazie mille a tutti".

A mis compañeros de grado y profesores de la EPSO, he aprendido mucho durante estos cuatro años con vosotros y especialmente a los amigos de la noche maestra.

A mi familia y amigos, por estar siempre ahí, pero sobre todo a mi hermana y mi madre gracias por vuestro apoyo y cariño incondicional, sois las mejores.

Y por último, muchas gracias Antonio por acompañarme, aconsejarme y quererme siempre.

ÍNDICE

I.	ÍNDICE DE TABLAS.....	10
II.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
1.	INTRODUCCIÓN	15
1.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.....	15
1.1.1.	DESCRIPCIÓN BIOLÓGICA DEL LANGOSTINO.....	15
1.1.2.	DESCRIPCIÓN MICROBIOLOGÍA DEL LANGOSTINO	16
1.1.3.	DESCRIPCIÓN NUTRICIONAL	16
1.2.	LÍMITES DE REFERENCIA APLICABLES.....	17
1.2.1.	LÍMITES MICROBIOLÓGICOS EN CRUSTÁCEOS.....	17
1.2.2.	LÍMITES DE CONTAMINANTES EN CRUSTÁCEOS.....	18
1.3.	PRODUCCIÓN PESQUERA.....	18
1.3.1.	CONSUMO DE CRUSTÁCEOS.....	20
1.3.2.	FORMAS DE PRESENTACIÓN DE LOS LANGOSTINOS EN EL MERCADO.....	20
1.4.	ENVASADO A VACÍO DE ALIMENTOS.....	21
1.5.	QUITOSANO.....	21
1.5.1.	ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	21
1.5.2.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL QUITOSANO	22
1.5.3.	APLICACIONES DEL QUITOSANO EN ALIMENTOS	24

1.6. ALTAS PRESIONES.....	27
1.6.1. EFECTOS DE LAS ALTAS PRESIONES EN LOS MICROORGANISMOS..	28
1.6.2. EFECTOS DE LAS ALTAS PRESIONES EN LOS ALIMENTOS.....	29
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LANGOSTINOS.....	34
3.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LANGOSTINOS PARA EL ESTUDIO ..	34
3.3. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE QUITOSANO	35
3.3.1. PROCESO DE RECUBRIMIENTO CON QUITOSANO	35
3.4. PREPARACIÓN DEL AGUA E INMERSIÓN.....	35
3.5. TRATAMIENTO DE ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA.....	36
3.5.1. TRATAMIENTOS APLICADOS EN LAS MUESTRAS DE LANGOSTINOS	36
3.6. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS REALIZADOS EN LANGOSTINOS.....	37
3.6.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS E INCUBACIÓN DE PLACAS.....	37
3.7. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS	39
3.7.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLORE EN LANGOSTINOS	39
3.7.2. DETERMINACIÓN DE LA TEXTURA DE LANGOSTINOS.....	40
3.7.3. DETERMINACIÓN DE pH EN LANGOSTINOS	41

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS.....	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1. RESULTADOS PARA LANGOSTINOSA LO LARGO DEL TIEMPO DE ESTUDIO: DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS	44
4.1.1. RESULTADOS PARA MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS	45
4.1.2. RESULTADOS PARA MICROORGANISMOS AEROBIOS PSICRÓTROFOS DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS	48
4.1.3. RESULTADOS PARA <i>PSEUDOMONAS SPP.</i> DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS	52
4.1.4. RESULTADOS PARA <i>VIBRIO SPP.</i> DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS	54
4.1.5. RESULTADOS PARA ESPORAS DE <i>CLOSTRIDIUM</i> SULFITO REDUCTORES DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS	57
4.1.6. RESULTADOS DE ENTEROBACTERIAS DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS	58
4.2. RESULTADOS PARA LANGOSTINOS A LO LARGO DEL TIEMPO DE ESTUDIO: DETERMINACIONES FÍSICO-QUÍMICAS.....	58
4.2.1. RESULTADOS PARA LOS PARÁMETROS DE COLOR DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS.....	58
4.1.3. RESULTADOS PARA LA TEXTURA DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENADO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS.....	70

4.1.4. RESULTADOS PARA EL pH DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENADO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS.....	73
5. CONCLUSIONES.....	77
6. BIBLIOGRAFÍA.....	80



I. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valor nutricional langostinos	17
Tabla 2. Límites microbiológicos de referencia.....	17
Tabla 3. Límites de contaminantes en crustáceos	18
Tabla 4. Estudios sobre la actividad antimicrobiana del quitosano	26
Tabla 5. Clasificación de microorganismos en función de la presión a la que sobreviven o crecen	29
Tabla 6. Pérdida de viabilidad de los patógenos vegetativos y virus transmitidos por los alimentos por APH con diferentes combinaciones de tiempo, temperatura y presión.....	30
Tabla 7. Características microbiológicas langostinos	34
Tabla 8. Características químicas langostinos.....	34
Tabla 9. Tratamientos aplicados en los langostinos.....	36
Tabla 10. Parámetros microbiológicos y físico-químicos analizados	37
Tabla 11. Resultados para el ANOVA realizado en los parámetros microbiológicos	45
Tabla 12. Resultados del test de Tukey para los microorganismos aerobios mesófilos.....	45
Tabla 13. Resultados del test de Tukey para microorganismos psicrótrofos en PCA.	49
Tabla 14. Resultados para el test de Tukey para los microorganismos psicrótrofos en MB.....	51

Tabla 15. Resultados del test de Tukey para <i>Pseudomonas spp</i>	53
Tabla 16. Resultados del test de Tukey para <i>Vibrio spp</i>	55
Tabla 17. Resultados para el ANOVA realizado en los parámetros de color.	59
Tabla 18. Resultados del test de Tukey para la luminosidad (L*)	60
Tabla 19. Resultados del test de Tukey para la coordenada a*	62
Tabla 20. Resultados del test de Tukey para la coordenada b*	64
Tabla 21. Resultados del test de Tukey para la magnitud croma.....	65
Tabla 22. Resultados del test de Tukey para la magnitud tono	67
Tabla 23. Resultados del test de Tukey para la variación de color	69
Tabla 24. Valores de la variación de color de los tratamientos respecto al control durante el tiempo de almacenamiento	70
Tabla 25. Resultados del ANOVA para el test de corte.....	71
Tabla 26. Resultados test de Tukey para el test de corte.....	71
Tabla 27. Resultados ANOVA para el pH.....	73
Tabla 28. Resultados test de Tukey para el pH	74

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología externa. del langostino.....	16
Figura 2. Principales países productores de la acuicultura, peces, crustáceos, moluscos del año 2014.....	19
Figura 3. Cantidad y valor de la producción de langostinos, gambas y camarones a nivel mundial.....	19
Figura 4. Estructura química quitina y quitosano.	22
Figura 5. Aplicación del tratamiento con quitosano.....	35
Figura 6. Aplicación del tratamiento con agua destilada	36
Figura 7. Escenario para la determinación del color.....	40
Figura 8. Test de corte en langostino.....	41
Figura 9. Evolución de los microorganismos aerobios mesófilos durante el tiempo de almacenamiento	48
Figura 10. Evolución de los microorganismos psicrótrofos crecidos en PCA durante el tiempo de almacenamiento.	50
Figura 11. Evolución de los microorganismos psicrótrofos crecidos en MB durante el tiempo de almacenamiento.	52
Figura 12. Evolución de <i>Pseudomonas spp.</i> durante el tiempo de almacenado.....	54
Figura 13. Evolución de <i>Vibrio spp.</i> durante el tiempo de almacenamiento.....	57
Figura 14. Evolución del parámetro L* durante el tiempo de almacenado.....	61
Figura 15. Evolución del parámetro a* durante el tiempo de almacenamiento	63

Figura 16. Evolución del parámetro b^* durante el tiempo de almacenado.....	64
Figura 17. Valores de croma durante el tiempo de almacenamiento.....	66
Figura 18. Valores para el tono durante el tiempo de almacenamiento.....	68
Figura 19. Evolución de la fuerza de corte durante el almacenamiento.....	72
Figura 20. Variación de pH durante el tiempo de almacenado	75



1-INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos de la industria alimentaria es prolongar el tiempo de vida útil de los productos mediante tratamientos de conservación adecuados. Bajo esta premisa, se han desarrollado diversas técnicas, las cuales se pueden clasificar en térmicas y no térmicas. Los tratamientos térmicos son los más utilizados en la estabilización de alimentos, aunque afectan a algunas propiedades organolépticas y nutricionales de los productos. En cuanto a los tratamientos no térmicos, durante los últimos años, se han logrado importantes avances en este campo, motivado a una mayor preocupación de los consumidores por la alimentación, salud derivada de esta y ritmo de vida actual.

Actualmente los consumidores están cada vez más preocupados por qué contienen los productos alimenticios que consumen. Estos prefieren alimentos que no contengan conservantes artificiales pero que al mismo tiempo mantengan las mejores características durante un mayor periodo de almacenado. Por lo que es necesario la aplicación de tratamientos alternativos para poder responder así a la demanda actual.

1.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

1.1.1. DESCRIPCIÓN BIOLÓGICA DEL LANGOSTINO

El langostino es una especie de crustáceo decápodo acuático del suborde *Dentrobranchiata*, de color rosado con vetas amaromadas y caparazón semiduro, marino o de agua dulce. En cuanto a su morfología externa, tiene el cuerpo alargado y comprimido lateralmente, el cual se divide en cefalotórax, pleon (abdomen) y telson (figura 1).

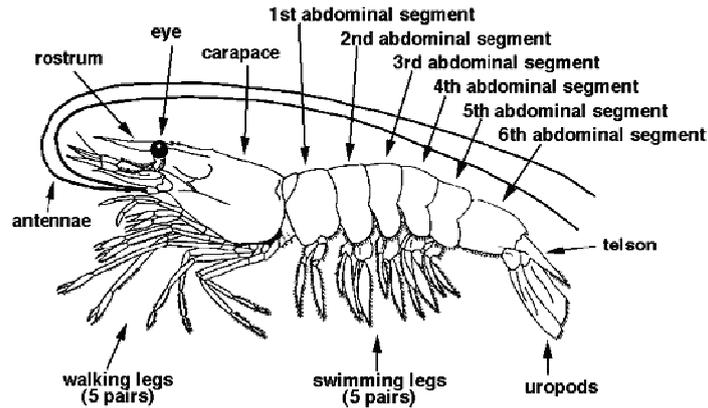


Figura 1. Morfología externa. del langostino

Fuente: Diario Oficial de la Federación.

1.1.2. DESCRIPCIÓN MICROBIOLOGÍA DEL LANGOSTINO

Cabe esperar que los microorganismos presentes en los langostinos recién capturados reflejen la flora bacteriana de las aguas donde han sido capturados y los contaminantes resultantes de la manipulación tras la captura. Los crustáceos tienen aproximadamente 1,5% de carbohidratos además los langostinos presentan cantidades mayores de aminoácidos que el pescado y están provistos de enzimas que desdoblan las proteínas rápidamente por lo que los hacen más susceptibles al ataque microbiano. Parece ser que la alteración de la carne de crustáceos es muy parecida a la del tejido muscular del pescado aunque la carne de crustáceos presenta un contenido mayor de nitrógeno siendo este más de 300 mg por cada 100 gramos de carne. En consecuencia este mayor contenido les hace más sensibles a la alteración por parte de la flora microbiana. Además esta alteración va acompañada de una producción de nitrógeno de las bases volátiles, parte de este nitrógeno proviene del óxido de trimetilamina presente en el músculo de crustáceos (Jay *et al.*, 2009)

1.1.3. DESCRIPCIÓN NUTRICIONAL

En cuanto a su valor nutricional como se muestra en la tabla 1, el langostino es una fuente de proteínas de alto valor biológico, tiene bajo contenido en grasas además contiene vitaminas y minerales. Por lo que es un producto muy apreciado por su valor nutricional.

Tabla 1. Valor nutricional langostinos

Parámetro	Valor
Energía	112 kcal
Grasas	0,8 g
Proteínas	24,3 g
Hidratos de carbono	1,5 g
Colesterol	185 mg
Vitamina A	18 µg
Vitamina D	18 µg
Vitamina E	1,5 mg
Vitamina B12	1,9 µg
Hierro	3,3 mg
Potasio	221 mg
Calcio	115 mg
Fósforo	215 mg

Fuente: BEDCA 2016

1.2. LÍMITES DE REFERENCIA APLICABLES

En cuanto a los límites marcados por la legislación en las siguientes tablas se presentan los límites microbiológicos (tabla 2) y los límites de contaminantes (tabla 3).

1.2.1. LÍMITES MICROBIOLÓGICOS EN CRUSTÁCEOS

Tabla 2. Límites microbiológicos de referencia

Microorganismo	Límite
<i>E. coli</i>	10 UFC/g
<i>S. aureus</i> coagulasa positiva	1000 UFC/g
<i>Salmonella</i>	Ausencia en 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	100 UFC/g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100 UFC/g
<i>Vibrio cholerae</i>	Ausencia en 25 g

Fuente: Reglamento CE 2073/2005 y Reglamento CE 1441/2007

1.2.2. LÍMITES DE CONTAMINANTES EN CRUSTÁCEOS

Tabla 3. Límites de contaminantes en crustáceos

Contaminante	Contenidos máximos
Plomo	0,5 (mg/kg peso fresco)
Cadmio	0,5 (mg/kg peso fresco)
Mercurio	0,5 (mg/kg peso fresco)
Suma de dioxinas(EQT PCDD/F-OMS)	3,5 pg/ g peso fresco
Suma de dioxinas y PCBs similares a las dioxinas(EQT PCDD/F-PCB OMS)	6,5 pg/g peso fresco
Suma de PCB28, PCB52, PCB101, PCB138, PCB153 y PCB180(CIEM - 6)	75 ng/g peso fresco

Fuente: Reglamento CE 1881/2006

1.3. PRODUCCIÓN PESQUERA

La producción pesquera mundial ha aumentado de forma constante en las últimas cinco décadas y el suministro de peces comestibles se ha incrementado a una tasa media anual de 3,2 %. El consumo de pescado ha aumentado en los últimos años debido al crecimiento demográfico, aumento de los ingresos y urbanización, y por la fuerte expansión de la producción pesquera y la mayor eficiencia de los canales de distribución. Una parte considerable y cada vez mayor del pescado que se consume en los países desarrollados se abastece de las importaciones, debido a la firme demanda y a la disminución de la producción pesquera nacional. La producción pesquera mundial en aguas marinas fue de 79,7 millones de toneladas en 2012, de los cuales el 76% de las capturas mundiales se realizaron en 18 países, encontrándose 11 de ellos en Asia. El Pacífico noroccidental y el centro-occidental constituyen las zonas en las que se registran las mayores capturas (FAO, 2014). Los principales países productores de la acuicultura de peces, crustáceos, moluscos en el año 2014 fueron los que se muestra en la figura 2, en ella se puede observar que entre los cinco primeros países productores se encuentran China, India, Indonesia, Vietnam y Bangladesh. España se encuentra en el puesto número 20 e Italia en el 26 (FAOSTAT 2016).

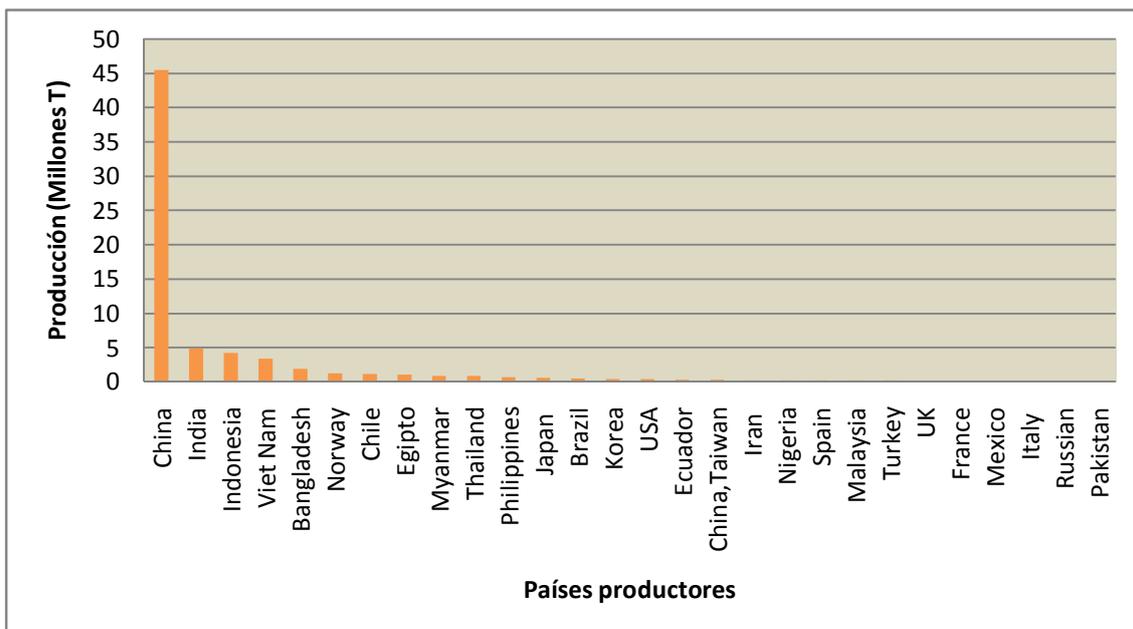


Figura 2. Principales países productores de la acuicultura, peces, crustáceos, moluscos del año 2014.

Fuente: Elaboración propia a partir de datos FAOSTAT 2016.

En cuanto a la producción de langostinos, gambas y camarones como se muestra en la figura 3, la producción y el valor de la misma ha experimentado un aumento en los últimos años mostrando así un sector en crecimiento.

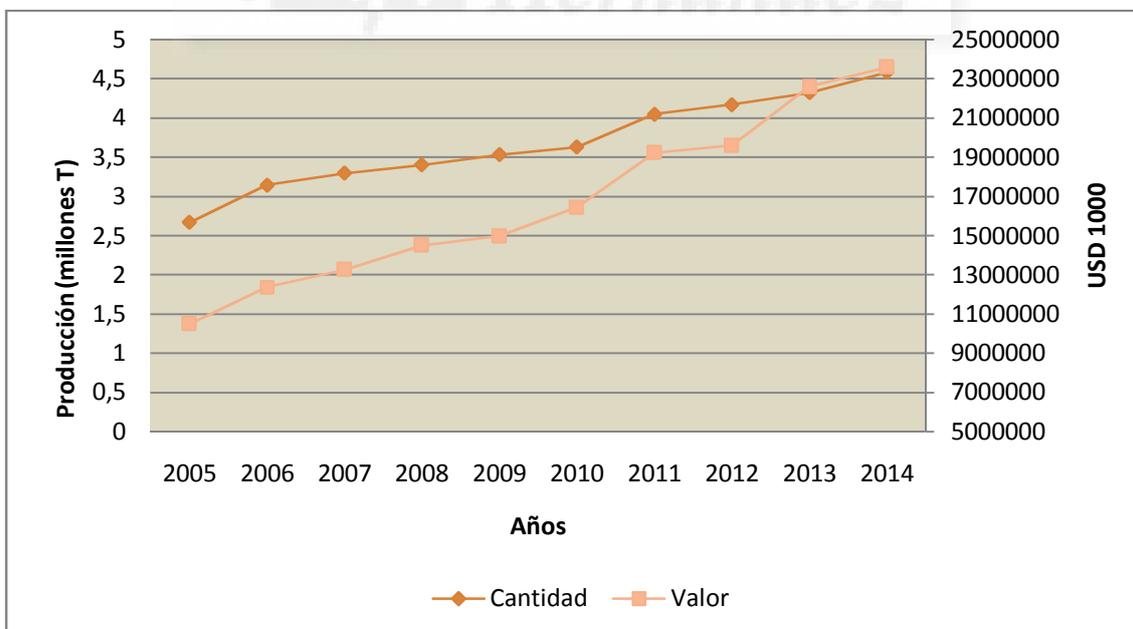


Figura 3. Cantidad y valor de la producción de langostinos, gambas y camarones a nivel mundial.

Fuente: elaboración propia a partir de datos FAOSTAT 2016.

1.3.1. CONSUMO DE CRUSTÁCEOS

Los últimos datos sobre el consumo mundial de crustáceos para el año 2011, es de 1,7 kg/cápita/año, a nivel europeo de 2,4 kg/cápita/año, para Italia el consumo de estos productos es de 2,4 kg/cápita/año y España presenta el valor más alto de consumo con 4,2 kg/cápita/año (FAOSTAT, 2016).

Debido al alto consumo, Europa importó en el 2013 653.202 toneladas de langostinos, camarones y gambas congelados con un valor de 4,925.031 USD 1000, la importación en España para estos productos fue de 146.865 toneladas con un valor de 1,060.202 USD 1000, en cuanto a Italia la cantidad en toneladas de estos productos fueron de 57.291 con un valor de 456.304 USD 1000 (FAOSTAT, 2016).

1.3.2. FORMAS DE PRESENTACIÓN DE LOS LANGOSTINOS EN EL MERCADO.

Los langostinos se pueden encontrar en el mercado de diversas formas; frescos, en refrigeración con una vida útil de 1 a 2 días, envasados a vacío y tratados térmicamente con una durabilidad de 1 mes, cocidos y congelados con una fecha de caducidad de un año, cocidos y encurtidos en salmuera con una vida útil de 3 a 4 años.

Debido a que el consumo de este producto ha aumentado en los últimos años y la captura se realiza en lugares lejanos a las zonas de mayor consumo es necesario desarrollar nuevas formas de conservación para poder ofrecer a los consumidores un producto con una buena calidad microbiológica y la mejor calidad organoléptica. Por ello es importante encontrar técnicas de conservación no térmicas, ya que estas afectan a las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos, que permitan aumentar la vida útil de los mismos. Entre las técnicas no térmicas que se pueden utilizar destacan, la aplicación de alta presión hidrostática, el recubrimiento comestible con quitosano y envasado a vacío.

1.4. ENVASADO A VACÍO DE ALIMENTOS

Las estrategias recientes de los investigadores y de la industria alimentaria se dirigen hacia el envasado sin el uso aditivos sintéticos. Por ello el envasado a vacío podría ser un coadyuvante a la conservación de los alimentos. Este consiste en la introducción del producto a conservar en una bolsa plástica de baja permeabilidad al oxígeno y aplicar vacío antes de sellarla.

En atmósferas pobres en oxígeno, se evita el crecimiento de bacterias aerobias y los cambios en la microflora están caracterizados por un crecimiento lento de los microorganismos tolerantes al CO₂ (Borch *et al*, 1996).

El uso de este envasado está muy extendido en la industria alimentaria y se utiliza para diversos productos; como carnes, embutidos, vegetales, pescados y mariscos.

1.5. QUITOSANO

1.5.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

El quitosano se considera un policatiónico, no tóxico, biocompatible y biodegradable (Kangdeet *et al.*, 2011)(Zhang *et al.*, 2010)(Zhang *et al.*, 2010)(Anaya *et al.*, 2013). Es una molécula lineal que contiene copolímeros de D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidades acetiladas) unidos por enlaces glucosídicos β (1,4). Este biopolímero se obtiene mediante la desacetilación parcial de la quitina (figura 4). El grado de desacetilación se define generalmente como la relación entre glucosamina/N-acetil glucosamina, que aumenta a medida que la quitina es convertida en quitosano. Por lo tanto, cuando el porcentaje de N-acetil glucosamina es más alto que el de la glucosamina, el biopolímero se llama quitosano (Viarsagh *et al*, 2010)(Ramírez *et al*, 2010)(Khor y Lim, 2003).

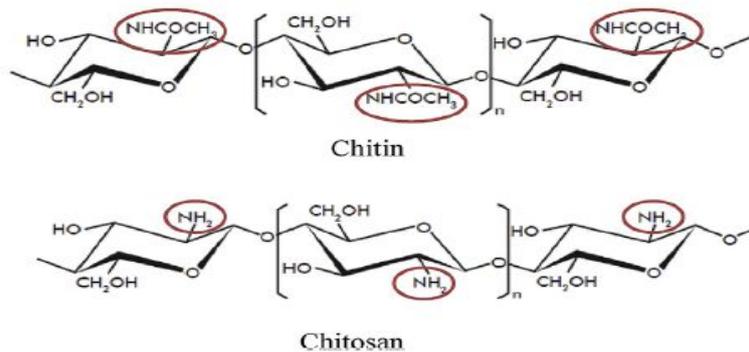


Figura 4. Estructura química quitina y quitosano.

Fuente: Ramírez *et al.*, (2010)

El quitosano es el único polímero soluble en agua disponible en el mercado, debido a sus cargas positivas en sus grupos amino. Esta propiedad única hace que sea adecuado para una amplia gama de aplicaciones en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos. El quitosano debido a la D-glucosamina, es insoluble a pH neutro y alcalino en solución acuosa, pero es soluble en ácidos diluidos (pH < 6,5) tales como el ácido acético, ácido fórmico, ácido succínico, ácido málico y ácido láctico junto con ácido clorhídrico diluido (No *et al.*, 2007) (Sogias *et al.*, 2010) (Tungtong *et al.*, 2012).

1.5.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL QUITOSANO

1.5.2.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL QUITOSANO

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) como H₂O₂, radicales hidroxilo y superóxidos conducen a estrés oxidativo que está correlacionado con diversas patologías como cáncer (Manda *et al.*, 2009) enfermedades cardiovasculares (Zhang *et al.*, 2010), el envejecimiento prematuro (Cui *et al.*, 2012), la artritis reumatoide y la inflamación (Filippin *et al.*, 2008). La quitina se encuentra entre los compuestos que han demostrado efectos antioxidantes (Park y Kim, 2010). Por lo tanto, podría añadirse como ingrediente para la producción de alimentos funcionales que podrían prevenir enfermedades relacionadas con la edad y la dieta (Kerch, 2015).

La oxidación de los alimentos que contienen un alto contenido en grasas insaturadas causa enranciamiento y con ellos aromas extraños en los alimentos. Por lo general, se utilizan antioxidantes sintéticos tales como butiladohidroxitolueno (BHT) e hidroxianisolbutilado (BHA) para evitar la oxidación de los lípidos, pero debido a los riesgos potenciales para la salud asociados a estos compuestos (Younes y Rinaudo 2015) cada vez más se buscan compuestos que sean naturales y más seguros, especialmente si se puede demostrar la falta de toxicidad de los mismos (Prashanth y Tharanathan, 2007). La adición de quitosano al 1% produjo una reducción del 70% de las sustancias que reaccionan con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) en carne tras 3 días de almacenamiento a 4°C, esta inhibición parece estar relacionada con la quelación del hierro libre que es liberado de las hemoproteínas de la carne durante el tratamiento térmico (Tharanathan y Kittur, 2003). Como en las carnes, la oxidación de los ácidos grasos insaturados también se produce en mariscos. Además, esta oxidación está catalizada por las altas concentraciones de pro-oxidantes tales como hemoglobina e iones metálicos presentes en el músculo de pescado (No, 2007). El efecto antioxidante del quitosano varía dependiendo de su peso molecular, la concentración y la viscosidad como muestra (Kamil *et al.*, 2002).

1.5.2.2. QUITOSANO COMO CONSERVANTE DE ALIMENTOS

La quitina y sus derivados puede utilizarse en la industria alimentaria como conservantes de alimentos (Sethulekshmi, 2014). Tienen actividad microbiana que permite proteger los productos alimenticios del deterioro microbiano. Este potencial antimicrobiano se ha relacionado a sus cargas positivas que interaccionan con las cargas negativas de las paredes celulares de las bacterias que conducen a la fuga de las moléculas intracelulares de los microorganismos (Khoushab, y Yamabhai, 2010). La adición de quitosano a los alimentos inhibe el crecimiento microbiano, la aparición de sabores extraños y evita pérdidas económicas.

1.5.2.3. QUITOSANO COMO ENVASE ANTIMICROBIANO

Las propiedades antibacterianas del quitosano también se han utilizado como un embalaje comestible activo (Muzzarelli, y Muzzarelli, 2005). Las biopelículas formadas a partir de quitosano permiten el almacenamiento a largo plazo de productos alimenticios. Este recubrimiento se ha utilizado en verduras, frutas, granos y pescados debido a que retardan la invasión microbiana, ya que el quitosano actúa como una barrera protectora, además mejora la calidad sensorial y nutricional de los alimentos (Sinha *et al.*, 2014). También se puede utilizar como portador de compuestos bioactivos para mejorar la calidad de los alimentos, el quitosano se puede combinar con diferentes agentes antimicrobianos tales como ácidos orgánicos, bacteriocinas (nisina y lacticina), extractos de plantas (Timol, p-cimeno, y cinamaldehído), proteínas (conalbúmina), antibióticos, fungicidas y agentes quelantes (EDTA) para reducir el deterioro de los alimentos por los microorganismos patógenos y mejorar el tiempo de conservación (Dutta *et al.*, 2012) estas películas son biodegradables y pueden ser consumidas con el producto. (Bourbon *et al.*, 2011)

1.5.2.4. QUITOSANO COMO FUENTE DE FIBRA DIETÉTICA

El quitosano se ha utilizado como una fuente de fibra dietética (Xia *et al.*, 2010). Es considerado funcional, prebiótico, debido a su no digestibilidad por las enzimas intestinales por lo que estimula las bacterias beneficiosas (Bifidobacterias y *Lactobacillus ssp.*) en el tracto gastrointestinal (Morganti *et al.*, 2011)(Prashanth y Tharanathan, 2007).

1.5.3. APLICACIONES DEL QUITOSANO EN ALIMENTOS

La quitina y sus derivados son conocidos por tener una amplia gama de actividades biológicas que incluyen efectos antioxidantes, efectos antimicrobianos, y muchas otras propiedades que podrían ser utilizadas en la industria alimentaria para mejorar la inocuidad, calidad y tiempo de conservación de los alimentos. Actualmente más de 80.000 toneladas de quitina son producidos a partir de residuos industriales (Kim *et al.*, 2007), sobre todo de la industria del marisco.

Se ha realizado muchas investigaciones sobre los efectos positivos en la conservación de alimentos mediante la aplicación de recubrimientos comestibles realizados a partir de quitosano, en la tabla 4 se muestran algunos ejemplos de tratamientos con recubrimientos de quitosano en diversos productos alimenticios.



Tabla 4. Estudios sobre la actividad antimicrobiana del quitosano

Aplicación y métodos de preparación	Productos	Microorganismos objetivos	Referencia
Recubrimiento con quitosano al 2% y recubrimiento con quitosano 2% enriquecido con aceite de clavo 1,5%	Salchichas cocidas de cerdo	Bacterias totales y Psicótrofos	(Lekjing, 2016)
Recubrimiento con quitosano al 1% y recubrimiento con quitosano enriquecido con aceite esencial de orégano (1% + 300 µL/g orégano)	Carne de pollo curada	Bacterias ácido lácticas, Enterobacteriaceae, <i>E. coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , Psicótrofos y aerobias totales.	(Shekarforoush et al., 2015)
Recubrimiento con quitosano de alto y bajo peso molecular al 0,25, 0,5 y 1%.	Hamburguesas	Bacterias totales	(Sayas-Barberá et al., 2011)
Recubrimiento con quitosano enriquecido con aceite esencial de tomillo al 2%.	Jamón cocido	Bacterias mesófilas y lácticas	(Ruíz-Navajas et al., 2015)
Recubrimiento con quitosano enriquecido con aceite esencial de tomillo al 0,5, 1 y 2%.	Carne	Levaduras	(Quesada et al., 2016)
Efecto del recubrimiento con quitosano 1% y gelatina 3%	Langostinos refrigerados	Bacterias totales y Psicótrofos	(Fatemeh et al., 2016)
Recubrimiento con quitosano enriquecido con concentrado de lípidos-proteínas de desechos de camarón	Langostinos	Bacterias aerobias totales, organismos sulfito reductores, mesófilos, <i>Pseudomonas</i> , Enterobacteriaceae y bacterias ácido lácticas.	(Arancibia et al., 2015)
Efecto del recubrimiento con quitosano 1% enriquecido con extracto de piel de granada 1,5%	Camarones blancos	Bacterias aerobias totales	(Gaofeng et al., 2016)
Efecto del recubrimiento con quitosano 1% enriquecido con extracto de té verde 1%	Camarones blancos	Bacterias aerobias totales	(Gaofeng et al., 2015)
Film de quitosano al 1, 3 y 5%	Filetes de pescado	<i>Escherichiacoli</i>	(Reesha et al., 2015)

1.6. ALTAS PRESIONES

La aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH) en la conservación de alimentos requiere particular atención ya que es una alternativa viable económicamente y tecnológicamente al tratamiento térmico (Patterson, 2005). La primera investigación del efecto de las altas presiones en alimentos fue en el siglo XIX (Hite, 1899) en la cual se describía un aumento de la vida útil de productos como leche, frutas y otros. Pero la aplicación en la industria alimentaria y la comercialización de productos tratados con altas presiones es más reciente, ha tenido lugar en las dos últimas décadas (Considine *et al.*, 2008) (Devlieghere *et al.*, 2014) (Farr, 1990). En la actualidad, gracias a las mejoras tecnológicas de los equipos, la aplicación industrial es generalizada para una gama de presiones comprendidas entre 100 y 800 MPa, dependiendo del objetivo deseado.

El proceso es isostático, es decir, la presión es transmitida uniformemente y al instante, y adiabática, lo que quiere decir que no importa la forma o el tamaño del alimento, hay poca variación en la temperatura con el aumento de presión (por cada 100 MPa la temperatura aumenta aproximadamente 3°C, dependiendo de la composición del alimento) (Smelt, 1998) (Wilson *et al.*, 2008). Esto evita que el alimento se deforme o se caliente, lo que podría modificar sus propiedades organolépticas.

Una de las principales ventajas del tratamiento con altas presiones es que aumenta la vida útil y mejora la inocuidad de los productos alimentarios debido a que afecta a la población microbiana al producir una pérdida de viabilidad de los microorganismos.

En comparación con las técnicas tradicionales de pasteurización térmica, el tratamiento con altas presiones conserva el color, sabor, calidad y contenido nutricional original del alimento. Mientras que las estructuras de moléculas con alto peso molecular como los hidratos de carbono y las proteínas pueden ser alteradas por el tratamiento con altas presiones, las moléculas más pequeñas tales

como los compuestos volátiles, pigmentos, vitaminas y otros compuestos relacionados con la calidad sensorial, nutricional y organoléptica de los alimentos son menos afectados. Los cambios químicos en los alimentos procesados por la alta presión son mínimos, debido a que no se produce la ruptura de los enlaces covalentes. Además, el tratamiento con altas presiones puede proporcionar a los productos una calidad extra sobre aquellos tratados con tecnologías convencionales, es decir, el tratamiento con altas presiones reduce la necesidad de adicionar aditivos en los alimentos y aun así aumenta su vida útil (Mújica-Paz *et al.*, 2011). El U.S. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods ha llamado al tratamiento con altas presiones hidrostáticas como la pasteurización que no calienta, ya que esta técnica podría sustituir a la pasteurización. (Barbosa y Juliano, 2008).

Los equipos de APH son ampliamente utilizados para la producción de carne, productos lácteos, pescados y mariscos, frutas y verduras y diversas bebidas. El valor de la producción de los productos alimenticios tratados con altas presiones hidrostáticas supera los 10 mil millones de \$, esta producción presenta una tendencia creciente año a año. Sin embargo, las regulaciones de alimentos están empezando a realizar estudios para determinar el nivel de confianza por el cual el riesgo de patógenos sea reducido a un nivel de probabilidad aceptable (Hsiao-Wen *et al.*, 2014).

1.6.1. EFECTOS DE LAS ALTAS PRESIONES EN LOS MICROORGANISMOS

Las altas presiones se pueden aplicar para la inactivación de microorganismos en alimentos, pero existen muchas variedades de microorganismos con diferentes características fisiológicas y por ello presentan diferentes resistencias al tratamiento con altas presiones hidrostáticas. Se han realizado muchas investigaciones para comprobar los efectos que altas presiones provocan en los microorganismos y gracias a estas se puede decir que 50 MPa pueden inhibir la síntesis de proteínas en microorganismos y reducir el número de ribosomas. A una presión de 100 MPa se puede inducir parcialmente la desnaturalización proteica y a 200 MPa causa daños en la membrana celular y en la estructura interna de la célula. El aumento de la presión a 300 MPa provoca la

desnaturalización irreversible de las enzimas y proteínas, lo que supone la ruptura de la membrana celular y la extracción de las sustancias internas de la célula, lo que conlleva a la muerte bacteriana (Abe, 2007). Los efectos que tiene el tratamiento con altas presiones sobre los microorganismos se pueden clasificar como; cambio en la morfología celular, inhibición de las reacciones metabólicas esenciales para el mantenimiento de las células y mecanismos genéticos.

En la tabla 5 se presenta la clasificación de los microorganismos en función de su capacidad de crecer o sobrevivir a distintas presiones.

Tabla 5. Clasificación de microorganismos en función de la presión a la que sobreviven o crecen

Clasificación	Características
Barófilos	Pueden crecer a presiones comprendidas entre 40-50 MPa
Barófobos	No crecen a presiones superiores a 30-40 MPa
Eurobáricos	Pueden crecer a presiones comprendidas entre 0,1-50 MPa
Barbodúricos	Sobreviven a presiones entre 50-200 MPa

Fuente: (Reventos, 2005)

La respuesta de los microorganismos mesófilos y barófilos muestra un comportamiento diferente al tratamiento con altas presiones. Los microorganismos barófilos de aguas profundas están adaptados a altas presiones mientras que los mesófilos no están normalmente expuestos a estas presiones y su crecimiento es sensible a estas condiciones (Bidle y Bartlett, 2001).

1.6.2. EFECTOS DE LAS ALTAS PRESIONES EN LOS ALIMENTOS

El tratamiento con altas presiones hidrostáticas puede afectar a algunas propiedades de los alimentos como al rendimiento, cualidades sensoriales como color y textura, aunque estos efectos son menos graves que los causados por el tratamiento térmico (Buckow y Heinz, 2008) (Hogan *et al.*, 2005). Estos cambios negativos se pueden atenuar si se eligen convenientemente los parámetros del procesado como tiempo, temperatura y presión. En la tabla 6 se muestran algunos ejemplos de aplicación de altas presiones a diferentes temperaturas, intensidades y tiempo.

Tabla 6. Pérdida de viabilidad de los patógenos vegetativos y virus transmitidos por los alimentos por APH con diferentes combinaciones de tiempo, temperatura y presión

Sustrato	P (MPa)	t (min)	T ^a (°C)	Microorganismo	Inactivación	Referencia
Alimentos para bebés	340	10	23	<i>Salmonella</i> 775W	>2 log UFC	(Metrick <i>et al.</i> , 1989)
Caldo	345	10	35	<i>Salmonella enteritidis</i>	8,2 log UFC	(Alpas <i>et al.</i> , 2000)
Caldo	345	10	35	<i>E. coli</i> O157:H7	8,14 log UFC	(Alpas <i>et al.</i> , 2000)
Caldo	345	10	35	<i>S. aureus</i> 765	4 log UFC	(Alpas <i>et al.</i> , 2000)
Caldo	345	10	35	<i>L. monocytogenes</i>	5 log UFC	(Alpas <i>et al.</i> , 2000)
Carne de ave de corral	600	15	20	<i>E. coli</i> O157:H7	3 log UFC	(Patterson <i>et al.</i> , 1995)
Carne de ave de corral	600	15	20	<i>S. aureus</i>	3 log UFC	(Patterson <i>et al.</i> , 1995)
Carne de ave de corral	375	15	20	<i>L. monocytogenes</i> CA	2 log UFC	(Patterson <i>et al.</i> , 1995)
Ostras	300	3	10	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> O3:K6	5 log UFC	(Cook, 2003)
Ostras	400	1	10	Hepatitis A virus	>3 log UFC	(Calci <i>et al.</i> , 2005)
Ostras	400	5	5	Norovirus	4 log UFC	(Kingsley <i>et al.</i> , 2007)



2- JUSTIFICACI3N Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Por todo lo anteriormente expuesto, se requieren nuevas técnicas de conservación capaces de dar respuesta a una sociedad cada vez más exigente con la industria agroalimentaria que demanda alimentos con mayor vida útil, mejor calidad organoléptica y nutricional, microbiológicamente estables y con menor contenido en conservantes o aditivos sintéticos.

Bajo este contexto, en este trabajo se pretende estudiar el efecto que pueden causar diversos tratamientos de conservación en la vida útil de los langostinos y algunas de sus propiedades físico-químicas.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto singular y combinado de la alta presión hidrostática, recubrimiento de quitosano y envase a vacío sobre la vida útil de los langostinos conservados a 8°C.

Los objetivos específicos planteados fueron:

- Estudiar la evolución de los más importantes grupos bacterianos responsables de la degradación del langostino antes y después de los tratamientos tecnológicos efectuados.
- Determinar las variaciones de pH, color y textura producidas en los langostinos, por los tratamientos tecnológicos empleados.
- Determinar, a partir de los parámetros analizados, la vida útil de los langostinos sometidos a los tratamientos arriba mencionados.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LANGOSTINOS

Las muestras fueron suministradas por la empresa la SEA FISH SPA (Milán), la cual declara que los langostinos arcoíris Indo-Pacífico (*Parapenaeo psisculptilis*), conocidos comercialmente como langostino tigre o langostino de Malasia, fueron capturados con redes de arrastre en el Océano Índico oriental (Indonesia), en la zona FAO 57 y con las características microbiológicas y químicas presentadas en las tablas 7 y 8 respectivamente. Tras la captura fueron pelados, descabezados, escaldados, congelados en bloque y mantenidos a una temperatura de -18°C.

Tabla 7. Características microbiológicas langostinos

Bacterias mesófilas aerobias	<50.000 UFC/g
Enterobacterias	<1000 UFC/g
Coliformes totales	<100 UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	<100 UFC/g
<i>Salmonella spp.</i>	Ausencia en 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia en 25 g

Fuente: SEA FISH SPA, 2016

Tabla 8. Características químicas langostinos

Suma de dioxinas y compuestos similares	<8 pg/g
Mercurio	<0,5 mg/kg
Cadmio	<0,5 mg/kg
Plomo	<0,5 mg/kg

Fuente: SEA FISH SPA, 2016

3.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LANGOSTINOS PARA EL ESTUDIO

Los langostinos fueron descongelados en el frigorífico a una temperatura de 2°C durante 48 horas y sucesivamente escurridos de manera aséptica. Se pesaron alícuotas de langostinos y fueron introducidas en bolsas de plástico (Polietileno), previamente esterilizadas bajo UV durante 40 minutos, para la

realización de los diversos tratamientos cada bolsa estaba compuesta por 40 gramos de langostinos.

3.3. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE QUITOSANO

El quitosano con un grado de desacetilación del 75-85% y con peso molecular medio, fue suministrado por de la casa comercial SIGMA – ALDRICH. Se preparó una solución de quitosano al 1,5% m/v con ácido acético glacial al 1%, sucesivamente se le corrigió el pH hasta 4,1 con hidróxido sódico y se esterilizó en la autoclave (durante 15 minutos a 121°C). Una vez esterilizada la solución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche hasta la realización de los tratamientos la mañana siguiente.

3.3.1. PROCESO DE RECUBRIMIENTO CON QUITOSANO

El recubrimiento con quitosano de los langostinos se realizó mediante dos inmersiones de 30 segundos cada una dejando escurrir el exceso durante 2 y 5 minutos respectivamente. Todo el proceso se llevó a cabo en la campana de flujo laminar Bluebeam4' en condiciones de asepsia. (Figura 5)



Figura 5. Aplicación del tratamiento con quitosano

3.4. PREPARACIÓN DEL AGUA E INMERSIÓN.

Con el fin de eliminar el factor del pH en la inhibición microbiana, una muestra adicional fue tratada con agua acidificada (usando ácido acético glacial) al mismo pH (4.10) que presentaba la solución del quitosano. Una vez esterilizada

(15 min a 121°C) y enfriada la solución, se realizó el tratamiento siguiendo el mismo procedimiento de inmersión que con la solución de quitosano. (Figura 6)



Figura 6. Aplicación del tratamiento con agua destilada

3.5. TRATAMIENTO DE ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA

Para la aplicación de la alta presión se introdujeron en la cámara de la máquina las muestras de langostinos embolsados, sometiendo a las muestras a una presión de 400 MPa durante 180 segundos.

3.5.1. TRATAMIENTOS APLICADOS EN LAS MUESTRAS DE LANGOSTINOS

En la tabla 9, se pueden observar las combinaciones de tratamientos a las que fueron sometidas las muestras.

Tabla 9. Tratamientos aplicados en los langostinos

PCV	Presiones	Quitosano	Vacio
PCnV	Presiones	Quitosano	No vacio
PAV	Presiones	Agua	Vacio
PAnV	Presiones	Agua	No vacio
nPCV	No presiones	Quitosano	Vacio
nPCnV	No presiones	Quitosano	No vacio
nPAV	No presiones	Agua	Vacio
nPAnV	No presiones	Agua	No vacio
Control	No presiones	No agua	No vacio

Las muestras fueron mantenidas en condiciones de refrigeración (8°C) durante 18 días y periódicamente (0, 1, 3, 6, 12, 15 y 18), se realizaron muestreos para los análisis microbiológicos y físico-químicos (tabla 10). En cada muestreo se usaron dos replicas por tratamiento.

Tabla 10. Parámetros microbiológicos y físico-químicos analizados

Microbiológicos	Físico-químicos
Bacterias aerobias mesófilas	Color
Bacterias aerobias psicrotófas	Textura (Test del corte)
<i>Pseudomonas spp.</i>	pH
<i>Vibrio spp.</i>	
<i>Esporas de Clostridium</i> sulfito reductores	
Enterobacterias	

3.6. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS REALIZADOS EN LANGOSTINOS

Para la realización de los análisis microbiológicos se tomaron 10 gramos de langostinos de cada uno de los tratamientos, introduciéndolos en una bolsa stomacher estéril y añadiendo 90 mL de solución salina estéril al 0,9%. Cada una de estas muestras se trituró durante 5 minutos a 260 rpm con el Stomacher 400 circulator. De la muestra triturada se realizaron diluciones seriadas con solución salina al 0,9% para la determinación de la carga microbiológica.

3.6.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS E INCUBACIÓN DE PLACAS

3.6.1.1. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS EN LANGOSTINOS

Para la determinación de los microorganismos mesófilos se pesaron 23,5 g/L de medio PCA (Plate Count Agar) disolviéndose en agua destilada, posteriormente se esterilizó en la autoclave (121°C durante 15 minutos) y se vertió en placas Petri. Tras la siembra, las placas se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 30°C y los resultados fueron expresados como UFC/g de langostino.

3.6.1.2. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS PSICRÓTROFOS EN LANGOSTINOS

Para la determinación de los microorganismos psicrótrofos la siembra se realizó en los medios de cultivo PCA y Marine Broth. Para ello se pesaron 23,5 g/L de medio PCA (Plate Count Agar) y 37,4 g/L de Marine Broth, se disolvieron en agua destilada y en el caso de Marine Broth se le añadieron 15g/L de Agar, se esterilizó mediante autoclave (121°C durante 15 minutos) y se vertió en placas Petri. Tras la siembra, las placas se incubaron durante 10 días a una temperatura de 8°C y los resultados fueron expresados como UFC/g de langostino.

3.6.1.3. DETERMINACIÓN DE *PSEUDOMONAS SPP.* EN LANGOSTINOS

Para la determinación de *Pseudomonas spp.* se pesaron 52,4 g/L de medio PSA (*Pseudomonas Agar Base*) que se disolvieron en agua destilada, al que se le añadió 10 mL de glicerol/L y se esterilizó mediante la autoclave (121°C durante 15 minutos), tras la esterilización se dejó enfriar hasta que la temperatura fuese menor de 50°C y se le añadió el suplemento (80021), finalmente se vertió en placas Petri. Tras la siembra, las placas se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 30°C y los resultados fueron expresados como UFC/g de langostino.

3.6.1.4. DETERMINACIÓN DE *VIBRIO SPP.* EN LANGOSTINOS

Para la determinación de *Vibrio spp.* se pesaron 89,1 g/L de medio TCBS Agar (agar tiosulfato citrato bilis sacarosa), se disolvieron en agua destilada, se esterilizó mediante la aplicación de calor hasta llegar a ebullición y se vertió en placas Petri. Tras la siembra las placas se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 37°C y los resultados fueron expresados como UFC/g de langostino.

3.6.1.5. DETERMINACIÓN DE ESPORAS DE *CLOSTRIDIUM* SULFITO REDUCTORES EN LANGOSTINOS

Para la determinación de las esporas de los microorganismos *Clostridium sulfito reductores* se realizó la técnica del MPN (Most probable number) descrita

por Gesche *et al.*, (2003), con las menores variaciones, para ello se realizaron tres diluciones y de ellas tres repeticiones. Se introdujo en cada tubo 10 mL de medio RCM (Reforced *Clostridium* medium) con unas soluciones de sulfito sódico y citrato de hierro al 4 y 7% respectivamente, esterilizadas previamente mediante filtración con un tamaño de poro de 0,22 μm , en cada tubo se añadió 1mL de la dilución de las sales, 2 mL de parafina y 1mL de agar al 10%. Se destruyeron las formas vegetativas sometiendo a los tubos a una temperatura de 80°C durante 10 minutos en un baño termostático. Tras el tratamiento térmico, se bajó la temperatura de los tubos mediante hielo para que el agar solidificase y formase así el tapón que dio lugar al ambiente anaerobio. Los tubos se encubaron a 37°C durante 48 horas. Tras la incubación se observaron los tubos para determinar la presencia de esporas de *Clostridium* sulfito reductores que es positiva si se producía un viraje de color del medio de cultivo a negro, debido a la reducción del hierro por parte de las bacterias.

3.6.1.6. DETERMINACIÓN DE ENTEROBACTERIAS EN LANGOSTINOS

Para la determinación de Enterobacterias se pesaron 38,5 g/L de medio VRBGA (Violet Red BileGlucose Agar) que fueron diluidos con adición de agua destilada, la solución fue esterilizada mediante la aplicación de calor hasta llegar a ebullición y se vertió en placas Petri. Tras la siembra las placas se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 37°C y los resultados fueron expresados como UFC/g de langostino.

3.7. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

3.7.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE COLOREN LANGOSTINOS

El color se determinó mediante un colorímetro (KONICA MINOLTA CR-10, KONICA MINOLTA HOLDINGS, INC.) en la modalidad SCE (exclusión de la componente especular). Los langostinos se dispusieron sobre una placa Petri bajo un fondo blanco opaco como se muestra en la figura 7, se realizaron tres disparos por cada langostino en distintas zonas y por cada tratamiento se cogieron tres

langostinos. Los resultados fueron expresados utilizando el espacio de colores CEILab* que identifica tres coordenadas: L* (luminosidad), a* (de verde (-) a rojo (+)) y b* (de azul (-) a amarillo (+)). Además, se determinaron las magnitudes psicofísicas Tono y Cromo, mediante las siguientes fórmulas, $C^*=(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$ y $h^{\circ}=(b^*/a^*)$ así como la variación de color durante el tiempo de almacenamiento respecto al color del control presentado el día 0 mediante la siguiente expresión $\Delta E=((\Delta L^*)^2+(\Delta a^*)^2+(\Delta b^*)^2)^{1/2}$.



Figura 7. Escenario para la determinación del color

3.7.2. DETERMINACIÓN DE LA TEXTURA DE LANGOSTINOS

La determinación de la textura se realizó mediante el test de resistencia al corte de las muestras, fue determinada mediante el texturómetro INSTRON modelo 5542 controlado por el software MERLIN. El equipo estaba provisto con una hoja de cuchillo de 3 mm de grosor, 140 mm de largo y 75 mm de ancho, las muestras se analizaron con una velocidad de tracción de 2 mm/s y con una distancia de 15 mm. Se determinó la fuerza (N) necesaria para cortar perpendicularmente al eje de la fibra muscular en el segundo segmento abdominal de los langostinos tratados. Para ello se utilizaron 6 muestras por tratamiento y se promediaron los resultados. En la figura 8 se puede observar cómo se realizó dicho test a las muestras.



Figura 8. Test de corte en langostino

3.7.3. DETERMINACIÓN DE pH EN LANGOSTINOS

La determinación del pH se realizó a una temperatura de 20°C mediante un pH-metro JENWAY modelo 3510, se tomaron 5 gramos de langostinos que fueron homogeneizados con agua destilada (1:2, m/v), según la técnica descrita por López-Caballero *et al.*, (2007), la determinación se realizó por triplicado por cada tratamiento.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software SPSS 23.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

Los diseños estadísticos aplicados fueron los siguientes:

Se determinaron las medias y las desviaciones estándar de las propiedades físico-químicas y microbiológicas de los langostinos (pH, color, textura, microorganismos aerobios mesófilos, aerobios psicrótrofos, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, esporas de *Clostridium* sulfito reductores y enterobacterias) consideradas a lo largo de todo el tiempo de estudio.

Para el estudio del efecto de la combinación de tratamientos (alta presión hidrostática, recubrimiento con quitosano, almacenamiento a vacío) y del tiempo de conservación, sobre los parámetros físico-químicos y microbiológicos

considerados, así como de la interacción de ambos factores (tratamiento y tiempo) se utilizó el análisis de la varianza multifactorial (ANOVA). El factor tratamiento presentó nueve niveles (PCV, PCnV, PAV, PAnV, nPCV, nPCnV, nPAV, nPAnV y control) (tabla 9) y el factor tiempo presentó 7 niveles (0, 1, 3, 6, 12, 15 y 18 días). Se realizaron contrastes ortogonales aplicando el test de Tukey, con un intervalo de confianza del 95% ($P < 0,05$), para aquellos factores que mostraban diferencias significativas entre las medias.



4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se muestran los resultados para los parámetros microbiológicos y físico-químicos, obtenidos durante el periodo del estudio aplicado en langostinos refrigerados.

4.1. RESULTADOS PARA LANGOSTINOSA LO LARGO DEL TIEMPO DE ESTUDIO: DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

La vida útil de los langostinos se ha establecido a partir de parámetros microbiológicos, como límite crítico se estableció 6 Log UFC/g de microorganismos aerobios mesófilos y 7 Log UFC/g para los microorganismos aerobios psicrótrofos (Erkan, 2007) (Sallam, 2007), a partir de esta carga microbiana el producto no es adecuado para el consumo, por ello cuando las muestras alcanzaron dicha cantidad se dio por concluida su vida útil.

Como se puede observar en la tabla 11, los resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para los factores tratamiento, tiempo y la interacción de tiempo por tratamiento para todos los parámetros microbiológicos analizados.

Tabla 11. Resultados para el ANOVA realizado en los parámetros microbiológicos

Factor	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrático promedio	F	Sig.
Tratamiento	MESÓFILOS	66,707	8	8,338	38,15	,000
	PSICRÓTROFOS PCA	138,409	8	17,301	36,97	,000
	PSICRÓTROFOS MB	155,516	8	19,440	122,72	,000
	<i>PSEUDOMONAS spp.</i>	144,015	8	18,002	60,65	,000
	<i>VIBRIO spp.</i>	32,072	8	4,009	9,25	,000
Tiempo	MESÓFILOS	49,727	3	16,576	75,84	,000
	PSICRÓTROFOS PCA	204,774	3	68,258	145,85	,000
	PSICRÓTROFOS MB	197,256	3	65,752	415,10	,000
	<i>PSEUDOMONAS spp.</i>	159,117	3	53,039	178,70	,000
	<i>VIBRIO spp.</i>	21,210	3	7,070	16,31	,000
Tratamiento * Tiempo	MESÓFILOS	40,289	24	1,679	7,68	,000
	PSICRÓTROFOS PCA	67,215	24	2,801	5,98	,000
	PSICRÓTROFOS MB	66,980	24	2,791	17,62	,000
	<i>PSEUDOMONAS spp.</i>	118,242	24	4,927	16,60	,000
	<i>VIBRIO spp.</i>	27,876	24	1,161	2,68	,004

4.1.1. RESULTADOS PARA MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

A continuación, en la tabla 12, se muestran los resultados del test de Tukey para los microorganismos aerobios mesófilos. En ella se pueden observar los grupos homogéneos según el tratamiento aplicado y el tiempo de almacenamiento.

Tabla 12. Resultados del test de Tukey para los microorganismos aerobios mesófilos

Tiempo / Tratamiento	0	1	3	6
PCnV	a/B	a/A	a/B	a/C
PCV	a/B	a/A	a/B	a/C
PAnV	a/B	a/A	a/B	a/C
PAV	a/B	a/A	a/B	a/C
nPAV	b/B	b/A	b/B	b/C
nPCV	bc/B	bc/A	bc/B	bc/C
nPCnV	bc/B	bc/A	bc/B	bc/C
nPAnV	bc/B	bc/A	bc/B	bc/C
Control	c/B	c/A	c/B	c/C

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.
PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.
nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.
nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.
nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.
nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.
Control: langostinos no tratados
a-c: letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tipo de tratamiento aplicado en ellas.
A-C: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

Los microorganismos aerobios mesófilos se desarrollan a temperaturas comprendidas entre 15 y 45°C, siendo la temperatura óptima de crecimiento y proliferación 37°C. Mediante este recuento se estima la flora total, pero sin especificar. Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, altos recuentos suelen ser signo de inmediata alteración del producto, tasas superiores de entre 6 y 7 Log UFC/g suelen ser ya inicio de descomposición (Pascual y Calderón, 1999).

Como se observa en la figura 9, antes de los tratamientos las muestras de langostinos presentaban una carga aerobia mesófila de 3,88 Log UFC/g, lo cual indica una buena calidad sanitaria. Tras la realización de los tratamientos (marcados en la con una línea discontinua en la figura) se observó una disminución de la carga microbiana en todas las muestras tratadas con excepción de las muestras control.

Por lo que respecta a las muestras tratadas solo con quitosano fue posible observar una ligera reducción de 0,5 Log UFC/g, mientras que para las muestras tratadas con alta presión se presenta una reducción microbiana de entre 1,4 a 1,59 Log UFC/g, Junjie *et al.*, (2013) reportaron una reducción de la carga aerobia mesófila de 3,29 Log UFC/g en langostinos marinados tras el tratamiento con alta presión hidrostática (550 MPa durante 5 minutos).

Durante el almacenamiento en refrigeración, las muestras no tratadas con APH, recubiertas con quitosano y no recubiertas con quitosano sobrepasaron el límite crítico de vida útil establecido (6 Log UFC/g) el día 6 por lo tanto no se siguieron analizando. Similarmente a lo reportado en el estudio presentado por Arancibia *et al.*, (2015) en el cual langostinos refrigerados y tratados con

recubrimientos de quitosano al 2% alcanzaron los 6 Log UFC/g el día 6 de almacenamiento, mientras que otros autores como Fatemeh *et al.*, (2016) han mostrado una vida útil de más de 14 días en langostinos tratados con recubrimientos de quitosano al 1% y gelatina al 3%. O Gaofeng *et al.*, (2015) que mostraron una la vida útil en langostinos de más de 9 días en refrigeración tras la aplicación de recubrimientos de quitosano al 1% solo o en combinación con extracto de té verde al 1%. Las diferencias encontradas en la literatura sobre el efecto del quitosano en la reducción de la carga microbiana en langostinos puede deberse; a las diferentes concentraciones de quitosano utilizado, al grado de desacetilación, al tipo de cepas bacterianas y a los diferentes estados fisiológicos en los que se encuentran las células (Li *et al.*, 2011).

En cuanto a las muestras tratadas con APH, se ha observado una extensión de la fase de latencia, en particular en las muestras tratadas con quitosano y en atmósfera ordinaria, en las cuales la fase de latencia se extendió hasta el día 6, sugiriendo una acción aditiva del quitosano. Las muestras tratadas con altas presiones, almacenadas en atmósfera normal y no recubiertas con quitosano no sobrepasaron el límite crítico propuesto hasta el día 13, las muestras tratadas con quitosano con independencia de la atmósfera de almacenamiento no lo superaron hasta el día 14 y para las muestras no recubiertas y almacenadas a vacío el límite se alcanzó el día 15. Sin embargo, Ali *et al.*, (2014) muestran en su estudio realizado en filetes de trucha una disminución bacteriana debida al efecto de la combinación de quitosano al 1,5% y APH (220 MPa durante 5 minutos), en el cual se presenta una extensión de la vida útil de 16 días con APH y almacenado a vacío, 24 días como resultado de la aplicación de quitosano y almacenado a vacío y 36 días para la combinación de quitosano, alta presión y almacenado a vacío 36 días. Albertos *et al.*,(2015) han reportado un aumento de la vida útil en filetes trucha con la aplicación de la combinación de recubrimientos con quitosano a 1,5% y alta presión hidrostática (300 MPa durante 10 minutos) de más de 21 días.

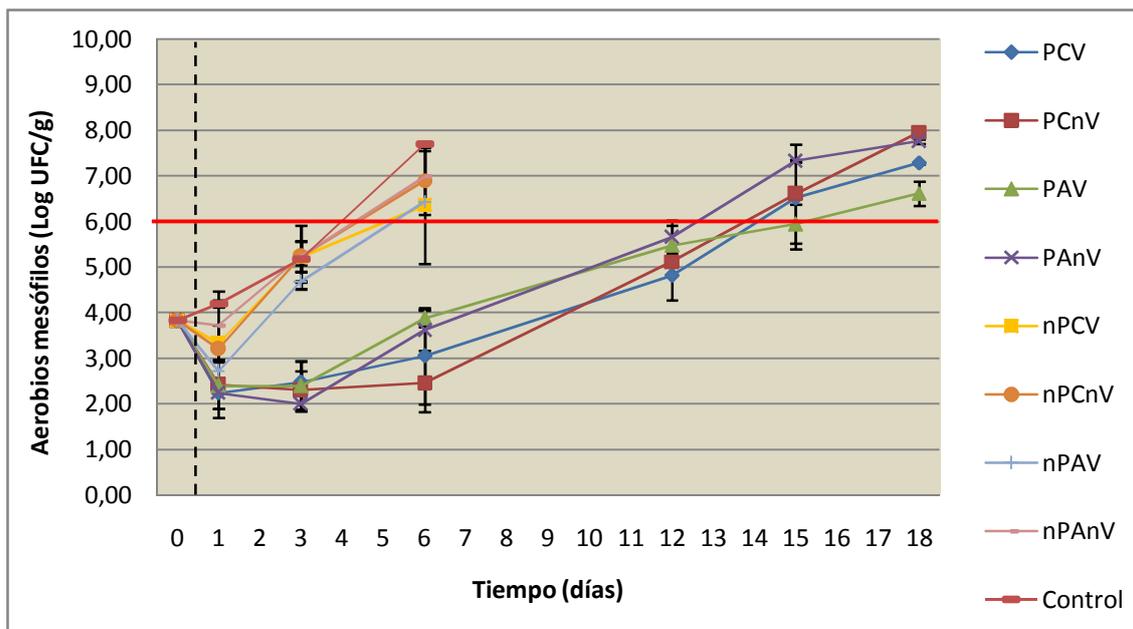


Figura 9. Evolución de los microorganismos aerobios mesófilos durante el tiempo de almacenamiento

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

4.1.2. RESULTADOS PARA MICROORGANISMOS AEROBIOS PSICRÓTROFOS DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

En la tabla 13, se muestran los resultados para los microorganismos aerobios psicrótofos crecidos en PCA. En esta tabla se presentan las agrupaciones homogéneas según el tratamiento y el tiempo de almacenamiento de las distintas muestras.

Tabla 13. Resultados del test de Tukey para microorganismos psicrótrofos en PCA.

Tiempo / Tratamiento	0	1	3	6
PCnV	a/A	a/A	a/B	a/C
PCV	a/A	a/A	a/B	a/C
PAnV	a/A	a/A	a/B	a/C
PAV	a/A	a/A	a/B	a/C
nPAV	b/A	b/A	b/B	b/C
nPCV	b/A	b/A	b/B	b/C
nPCnV	b/A	b/A	b/B	b/C
nPAnV	b/A	b/A	b/B	b/C
Control	b/A	b/A	b/B	b/C

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

a-b: letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tipo de tratamiento aplicado en ellas.

A-C: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

Los microorganismos aerobios psicrótrofos son capaces de crecer a temperaturas 0 - 7°C y producir colonias visibles o turbidez en un tiempo de 7 a 10 días. Son el grupo de microorganismos responsable del deterioro de los productos del mar almacenados a bajas temperaturas (Reesha *et al.*, 2015). Estos microorganismos están distribuidos con bastante amplitud en los géneros Gram negativos y no lo están tanto en los Gram positivos (Gram, 1996). La posible población psicrótrofa alterante que predomina en los crustáceos son las bacterias Gram negativas, entre ellas las predominantes son; *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeroomonadaceae* y las pertenecientes al género gram positivo como *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Bacillus* y *Micrococcus* (Jay *et al.*, 2009).

En cuanto a los resultados obtenidos para estos microorganismos, se utilizaron dos medios diversos para esta determinación PCA y MB, sin embargo, el recuento de las colonias fue muy similar.

Similarmente a lo observado para el grupo de los mesófilos, las muestras no tratadas con APH, presentaron un aumento de la carga microbiana aerobia

psicrótrofa mayor que las muestras tratadas con APH, mostrando ya en el día 6 valores de entre 6 y 7 Log UFC/g mientras que para las muestras tratadas con APH los valores eran menores de 4 Log UFC/g (figura 10). También en este caso se pudo evidenciar el efecto del quitosano en el retardo del crecimiento bacteriano. Por otro lado, las muestras tratadas con altas presiones alcanzaron el valor de 7 Log UFC/g el día 15 para las muestras almacenadas en atmósfera normal y día 17 para las almacenadas a vacío.

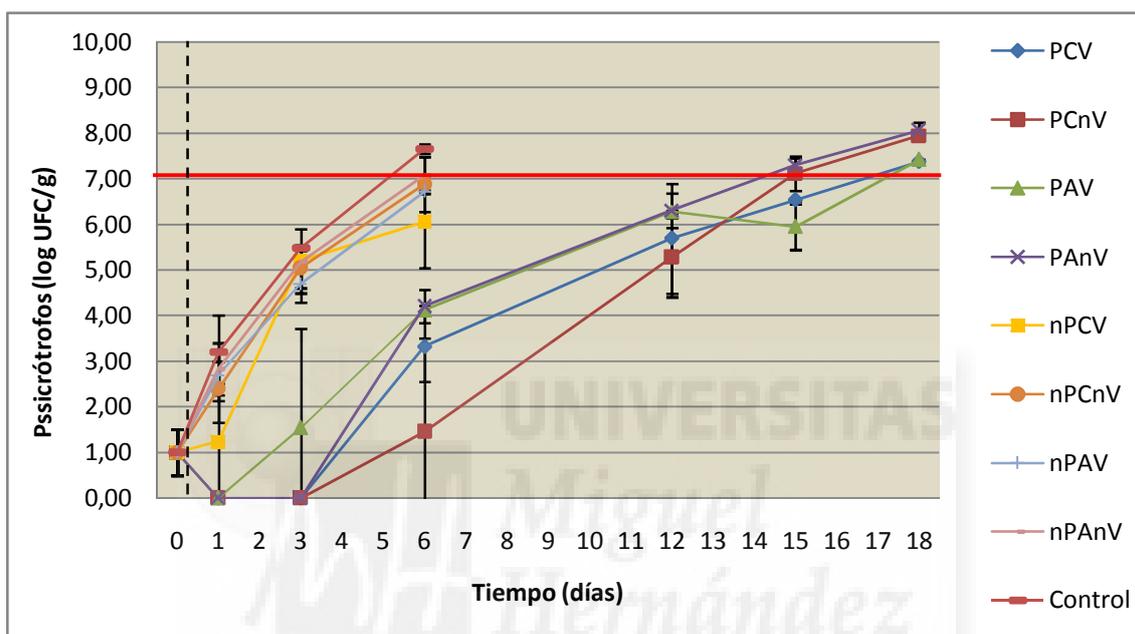


Figura 10. Evolución de los microorganismos psicrótrofos crecidos en PCA durante el tiempo de almacenamiento.

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.
 nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.
 nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.
 nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.
 Control: langostinos no tratados

En la tabla 14, se muestran los resultados del test de Tukey para los microorganismos psicrótrofos crecidos en las placas de MB. Muestra la agrupación debida a la homogeneidad dependiendo del tratamiento y del tiempo de almacenado.

Tabla 14. Resultados para el test de Tukey para los microorganismos psicrótrofos en MB.

Tiempo / Tratamiento	0	1	3	6
PCnV	a/A	a/B	a/C	a/C
PCV	a/A	a/B	a/C	a/C
PAnV	a/A	a/B	a/C	a/C
PAV	a/A	a/B	a/C	a/C
nPCV	b/A	b/B	b/C	b/C
nPAV	b/A	b/B	b/C	b/C
nPCnV	bc/A	bc/B	bc/C	bc/C
nPAnV	bc/A	bc/B	bc/C	bc/C
Control	c/A	c/B	c/C	c/C

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

a-c: letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tipo de tratamiento aplicado en ellas.

A-C: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

Para los recuentos realizados en las placas de MB, se muestra la misma evolución que para las placas de PCA (figura 11), el día 6 las muestras no tratadas con APH presentaron una población elevada, de entre 6 y 7 Log UFC/g mientras que para las muestras tratadas con APH los valores más altos eran de 4 Log UFC/g para las muestras no recubiertas con quitosano y de entre 2,5 y 3 para las recubiertas con quitosano, las muestras tratadas con quitosano presentan unos valores menores que las inmersas en agua hasta el día 12, después se igualaban a los demás, esta tendencia también se puede observar en las muestras no tratadas APH. La muestra PAnV no llegó a 7 Log UFC/g hasta el día 13, mientras que la PCnV llegó al límite el día 15, por último las muestras almacenadas a vacío independientemente de recubiertas o no recubiertas con quitosano, no alcanzaron el límite crítico propuesto (7 Log UFC/g) hasta el día 17 de almacenamiento.

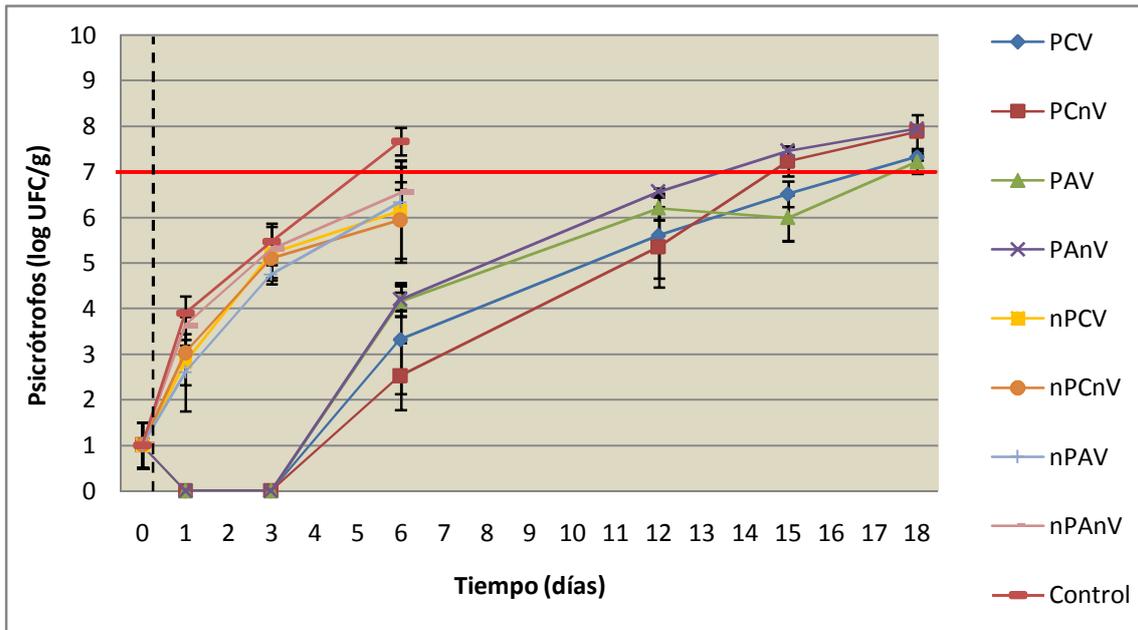


Figura 11. Evolución de los microorganismos psicrótrofos crecidos en MB durante el tiempo de almacenamiento.

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.
 nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.
 nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.
 nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.
 Control: langostinos no tratados

4.1.3. RESULTADOS PARA *PSEUDOMONAS SPP.* DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

En la tabla 15, se muestran los resultados del test de Tukey para *Pseudomonas spp.* En esta tabla se observan los diferentes grupos homogéneos según el tratamiento y el tiempo de almacenamiento.

Tabla 15. Resultados del test de Tukey para *Pseudomonas spp.*

Tiempo / Tratamiento	0	1	3	6
PQnV	a/A	a/A	a/B	a/C
PQV	a/A	a/A	a/B	a/C
PAnV	a/A	a/A	a/B	a/C
PAV	a/A	a/A	a/B	a/C
nPQV	b/A	b/A	b/B	b/C
nPAV	b/A	b/A	b/B	b/C
Control	b/A	b/A	b/B	b/C
nPAnV	b/A	b/A	b/B	b/C
nPQnV	b/A	b/A	b/B	b/C

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

a-b: letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tipo de tratamiento aplicado en ellas.

A-C: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

Las *Pseudomonas spp.* son bacilos, gram negativos, aerobios estrictos, oxidasa positivos, no forman esporas y presentan la capacidad de formar biopelículas para adherirse a las células. Estos microorganismos son unos de los responsables del deterioro de los langostinos.

En cuanto a la progresión de este microorganismo durante el tiempo de almacenado, como se puede observar en la figura 12 antes de los tratamientos (marcados en la figura mediante una línea discontinua) la población microbiana estaba por debajo del límite de detección, tras los tratamientos, el día 1 el control y las muestras no tratadas con APH, recubiertas con quitosano y almacenados en atmósfera normal presentan 1 Log UFC/g, mientras que para las muestras tratadas con a APH y almacenadas a vacío la población microbiana continuaba por debajo del límite de detección, debido a posibles daños subletales producidos por el tratamiento de APH y al ambiente anaerobio producido por el envasado a vacío, ya que en las muestras almacenadas en atmósfera normal el día 3 se produjo una posterior recuperación celular, sin embargo esta recuperación no se mostró en la población microbiana de las muestras tratadas con quitosano o almacenadas a vacío hasta el día 6 de almacenamiento. Las muestras no tratadas con APH, el día 6

presentaban valores de entre 5 y 7 Log UFC/g, mientras que las muestras tratadas con APH no alcanzaron esos valores hasta el día 15 de tratamiento.

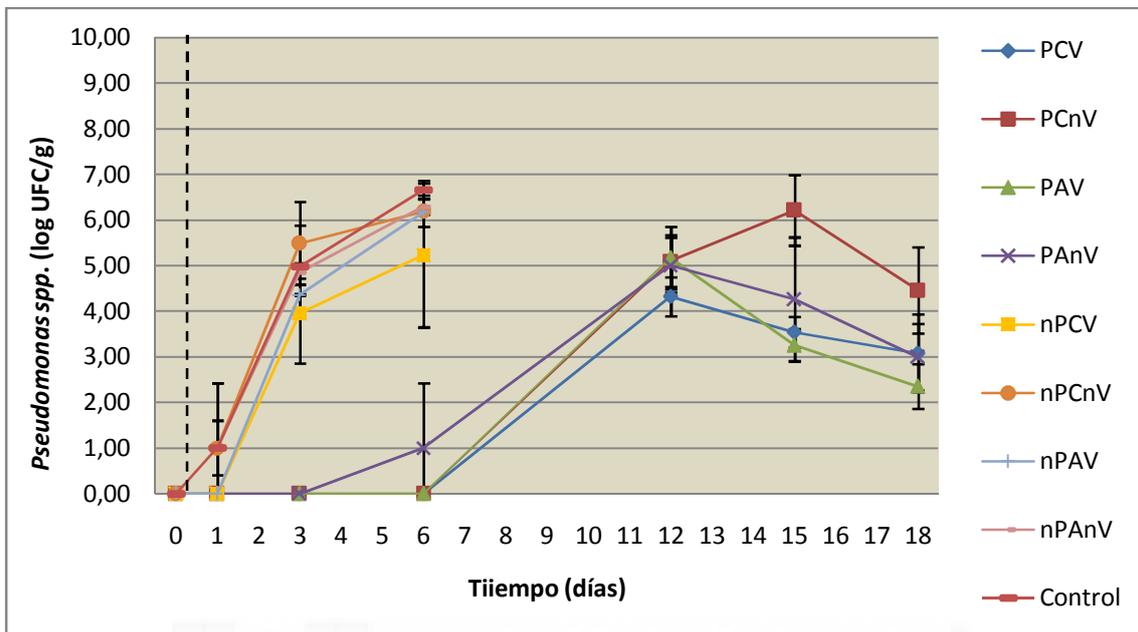


Figura 12. Evolución de *Pseudomonas spp.* durante el tiempo de almacenado.

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.
 nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.
 nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.
 nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.
 Control: langostinos no tratados

4.1.4. RESULTADOS PARA *VIBRIO SPP.* DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

A continuación, en la tabla 16 se pueden observar los resultados del test de Tukey para *Vibrio spp.* Se presentan los diferentes grupos de homogeneidad dependiendo del tipo de tratamiento y tiempo de almacenamiento.

Tabla 16. Resultados del test de Tukey para *Vibrio spp.*

Tiempo / Tratamiento	0	1	3	6
PCnV	a/A	a/A	a/B	a/B
PCV	a/A	a/A	a/B	a/B
PAV	a/A	a/A	a/B	a/B
PAnV	a/A	a/A	a/B	a/B
nPCnV	ab/A	ab/A	ab/B	ab/B
nPCV	c/A	c/A	c/B	c/B
nPAV	c/A	c/A	c/B	c/B
nPAnV	c/A	c/A	c/B	c/B
Control	c/A	c/A	c/B	c/B

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

a-c: letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tipo de tratamiento aplicado en ellas.

A-B: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

Vibrio spp. son bacterias halofílicas, marinas ampliamente distribuidas en el agua de las costas, sedimentos y plancton, produce gastroenteritis aguda al ingerir pescados o mariscos crudos, insuficientemente cocidos o contaminados después del cocinado. Están reconocidas como una de las principales causas de brotes alimentarios transmitidos por el consumo de pescados y mariscos del mundo (Iwahori y Yamamoto, 2010). Se encuentra en las aguas costeras y estuarios cuando su temperatura es superior a 15°C. Como consecuencia de su presencia en el agua, esta especie bacteriana se encuentra en peces, crustáceos y moluscos. Se han reportado una alta incidencia de *Vibrio parahaemolyticus* en langostinos en muchos países, especialmente en Tailandia, Iran y China (Minami *et al.*, 2010)(Zarei *et al.*, 2012) (Zhang *et al.*, 2007).

La familia *Vibrionaceae* está integrada por formas bacilares con tendencia al pleomorfismos, sin esporas ni cápsulas. Son formas móviles, por un flagelo polar único. Gram-negativas y anaerobias facultativas, para su desarrollo necesitan tasas de sal del 3%. Su crecimiento es más activo con valores de pH entre 7,5 y 8,5, crecen en temperaturas entre 15-43°C con una temperatura óptima de 37°C. En

cuanto a su desarrollo esta bacteria es muy rápida, tiene un tiempo generacional de 10 - 15 minutos, lo que hace que la presencia de un pequeño número, en pescado recién capturado, se transforme en una cifra elevada al cabo de algunas horas, si la temperatura es favorable. Pero su desarrollo es lento a temperaturas de refrigeración (Pascual y Calderón, 1999).

Inicialmente estos microorganismos se encontraban por debajo del límite de detección en todas las muestras, el día 1, tras los tratamientos como se muestra en la figura 13, la población microbiana en el control y para las muestras no tratadas con APH y almacenadas a vacío eran de 1,7 y 1,3 Log UFC respectivamente, mientras que para el resto de tratamientos continuaba bajo el límite de detección, en las muestras almacenadas en atmósfera normal y recubiertas con quitosano hasta el día 3 no se detectaron estos microorganismos. En cuanto a las muestras tratadas con APH, inicialmente se mostró una inactivación microbiana no completa, ya que el día 12 se pudieron detectar estos microorganismos para todas las muestras tratadas con APH.

Para las muestras recubiertas con quitosano no se muestra un mayor efecto inhibitorio, la eficacia del tratamiento con quitosano sobre la inactivación de algunos grupos microbianos y en particular de *Vibrio spp.* ha sido reportada como baja por otros autores como Chaiyakosa *et al.*, (2007) donde tratamientos con 1000 ppm de quitosano produjeron reducciones menores de 0,5 Log UFC/g en langostinos naturalmente contaminados o Wen *et al* (2013) que muestra una reducción de 0,6 a 0,8 Log UFC/g en camarones tratados con quitosano al 1%.

En cuanto a la progresión de este microorganismo a lo largo del tiempo de almacenamiento, para las muestras no tratadas con APH el día 6 los valores máximos fueron registrados para el control, los cuales fueron inferiores a 3 Log UFC/g mientras que para las muestras tratadas con APH, los valores no sobrepasaron los 2 Log UFC/g durante todo el periodo de almacenamiento con excepción de la muestra PCnV la cual alcanzó los 4 Log UFC/g el día 18.

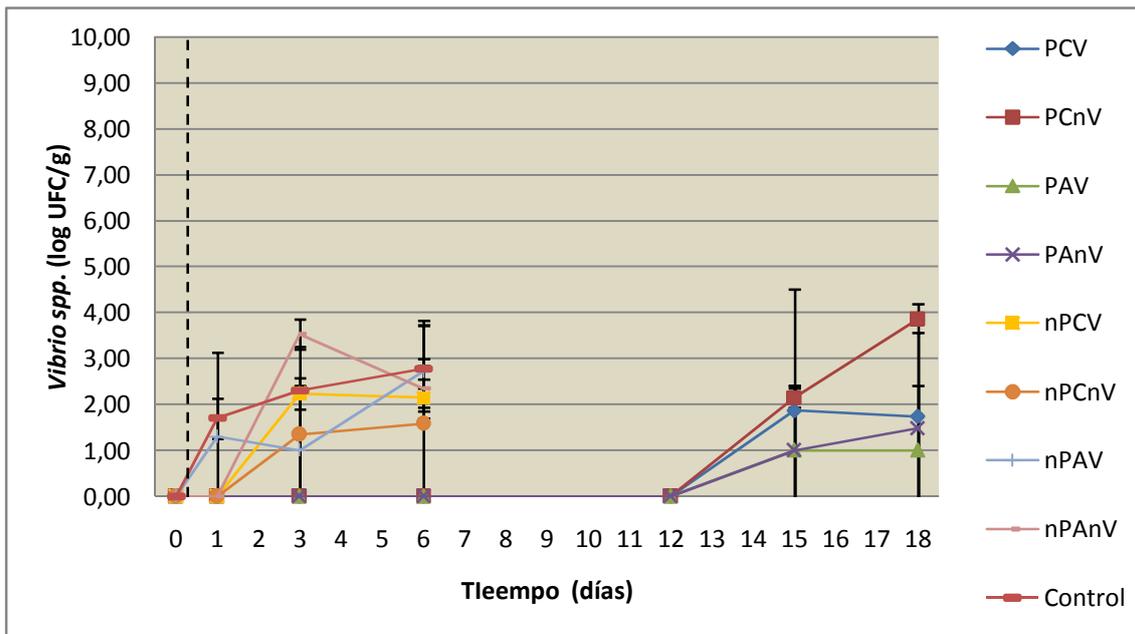


Figura 13. Evolución de *Vibrio* spp. durante el tiempo de almacenamiento.

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

4.1.5. RESULTADOS PARA ESPORAS DE *CLOSTRIDIUM* SULFITO REDUCTORES DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

Este grupo bacteriano está integrado por microorganismos pertenecientes al género *Clostridium*, que se caracterizan por ser organismos Gram positivos, anaerobios, formadores de esporas, que se encuentran normalmente en las heces, además se pueden encontrar en suelos, sedimentos marinos, vegetación en descomposición, así como también en los alimentos, especialmente cuando las condiciones de higiene en la elaboración son deficientes. Estos microorganismos producen malos olores y con mucha frecuencia ennegrecimiento del producto debido a la capacidad de reducir el sulfito de hierro a sulfuro de hierro (Gesche *et al.*, 2003). Gracias a que son capaces de esporular, presentan una gran resistencia. Esta determinación se suele usar para apreciar la calidad higiénica del agua y productos animales o de origen animal. Su número es escaso en productos frescos.

En cuanto a los resultados obtenidos para estos microorganismos en todos los tratamientos y en todos los tiempos de análisis fueron negativos.

4.1.6. RESULTADOS DE ENTEROBACTERIAS DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

Las *Enterobacteriaceae* son bacilos gran negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Se encuentran en el intestino del hombre y de animales, pero también en otros ambientes como suelo, plantas, cáscara de huevos, etc. Se suelen usar como índice de contaminación fecal debido a su frecuencia en heces, su fácil detección en el laboratorio y sus características semejantes, en algún aspecto, a las de algunos miembros patógenos de la familia *Enterobacteriaceae*.

Los recuentos realizados para estos microorganismos en todas las muestras y tiempos de análisis presentaron resultados por debajo del límite de detección.

4.2. RESULTADOS PARA LANGOSTINOS A LO LARGO DEL TIEMPO DE ESTUDIO: DETERMINACIONES FÍSICO-QUÍMICAS

4.2.1. RESULTADOS PARA LOS PARÁMETROS DE COLOR DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

El color del marisco es un parámetro importante en términos de consumo, ya que se relaciona con la calidad y frescura del mismo, este factor es determinante en la decisión de compra de los consumidores (Yağiz *et al.*, 2009). Por ello se evaluó como afectaba a este parámetro la combinación de los tratamientos considerados en este estudio: la aplicación de un recubrimiento de quitosano, el uso de alta presión hidrostática y el envasado a vacío a lo largo del tiempo de almacenado en refrigeración.

Los resultados se expresaron con las coordenadas CEILab*, donde el parámetro L* representa la luminosidad con unos valores comprendidos entre 0 y 100, siendo 0 negro y 100 blanco, el parámetro a* con valores positivos para rojo y valores negativos para verde y el parámetro b* con valores positivos para amarillo

y valores negativos para azul. Además, se calcularon las magnitudes psicofísicas; Cromo (C^*) que indica el grado de separación entre un tono determinado y un gris de la misma claridad, este valor es 0 para estímulos acromáticos y normalmente no pasa de 150 y Tono (h°) o ángulo métrico de tonalidad varía entre 0 y 360° (Mathias-Rettig y Ah-Hen, 2014). Así como la variación de color (ΔE) respecto al control durante el tiempo de almacenado.

Como se puede observar en la tabla 17, los resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para el factor tratamiento en las coordenadas de color L^* , b^* y ΔE , no mostrando diferencias estadísticamente significativas para la coordenada a^* , Cromo y Tono. Sin embargo, para el factor tiempo sí que se mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en todos los parámetros de color. En cuanto a la interacción de tiempo por tratamiento los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros L^* , b^* y ΔE .

Tabla 17. Resultados para el ANOVA realizado en los parámetros de color.

Factor	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrático promedio	F	Sig.
Tratamiento	L^*	786,157	8	98,270	4,243	,000
	a^*	84,150	8	10,519	1,218	,285
	b^*	189,661	8	23,708	4,513	,000
	Tono	,109	8	,014	,651	,735
	Cromo	256,338	8	32,042	2,678	,007
	ΔE	127,957	8	15,995	9,76E+31	,000
Tiempo	L^*	964,311	6	160,718	6,939	,000
	a^*	643,684	6	107,281	12,418	,000
	b^*	594,285	6	99,047	18,856	,000
	Tono	,827	6	,138	6,590	,000
	Cromo	1133,665	6	188,944	15,792	,000
	ΔE	1700,562	6	283,427	1,73E+33	,000
Tratamiento * Tiempo	L^*	3771,912	45	83,820	3,619	,000
	a^*	444,227	45	9,872	1,143	,245
	b^*	464,258	45	10,317	1,964	,000
	Tono	1,261	45	,028	1,340	,071
	Cromo	754,652	45	16,770	1,402	,045

	ΔE	888,897	45	19,753	1,20E+32	,000
--	------------	---------	----	--------	----------	------

4.2.1.1. RESULTADOS PARA LA COORDENADA L* DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENADO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

A continuación, en la tabla 18, se muestran los resultados del test de Tukey para la luminosidad. Donde se agrupan homogéneamente según el tratamiento y el tiempo de almacenado.

Tabla 18. Resultados del test de Tukey para la luminosidad (L*)

Tiempo / Tratamiento	0	1	3	6	12	15	18
Control	a/AB	a/AB	a/A	a/AB	a/C	a/BC	a/AB
nPAnV	b/AB	b/AB	b/A	b/AB	b/C	b/BC	b/AB
nPAV	bc/AB	bc/AB	bc/A	bc/AB	b/C	bc/BC	bc/AB
nPCV	bcd/AB	bcd/AB	bcd/A	bcd/AB	bcd/C	bcd/BC	bcd/AB
PAnV	bcde/AB	bcde/AB	bcde/A	bcde/AB	bcde/C	bcde/BC	bcde/AB
nPCnV	cde/AB	cde/AB	cde/A	cde/AB	cde/C	cde/BC	cde/AB
PCV	de/AB	de/AB	de/A	de/AB	de/C	de/BC	de/AB
PAV	de/AB	de/AB	de/A	de/AB	de/C	de/BC	de/AB
PCnV	e/AB	e/AB	e/A	e/AB	e/C	e/BC	e/AB

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

a-e: letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tipo de tratamiento aplicado en ellas.

A-C: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

En cuanto a la progresión de la luminosidad (L*) durante el tiempo de almacenado, como se muestra en la figura 14, tras el tratamiento APH la coordenada L* aumenta para todas las muestras, esto puede ser debido a la coagulación de las proteínas debido a la alta presión hidrostática, ya que la coagulación de las proteínas aumenta la reflexión de la luz y con ello el blanco además de la posible pérdida de pigmentos activos debido al tratamiento (Barjinder *et al.*, 2015). Este fenómeno ha sido reportado por otros autores como

Junjie *et al* (2013), donde tras el tratamiento con alta presión hidrostática (550 MPa durante 5 minutos) la luminosidad experimentó un aumento en langostinos marinados.

En cuanto a las muestras recubiertas con quitosano, estas presentaban un mantenimiento de la luminosidad durante el tiempo de almacenado, este comportamiento ha sido reportado por otros autores como; Fatemehet *al.*, (2016) el cual mostró unos valores de luminosidad estables durante el tiempo de almacenamiento tras recubrir los langostinos con quitosano al 1% combinado con gelatina al 3%, mientras que los valores para control decrecieron progresivamente durante el tiempo de almacenado. Arancibia *et al.*, (2016) presentaron una disminución progresiva de la coordenada L* durante el tiempo de almacenamiento en langostinos siendo esta menor para los recubiertos con quitosano al 2%.

Los valores de L* para el control y muestras inmersas en agua disminuyeron durante el tiempo de almacenamiento en mayor medida que para el resto de tratamientos, siendo el control el que presentaba valores más bajos en todos los tiempos analizados (figura 14).

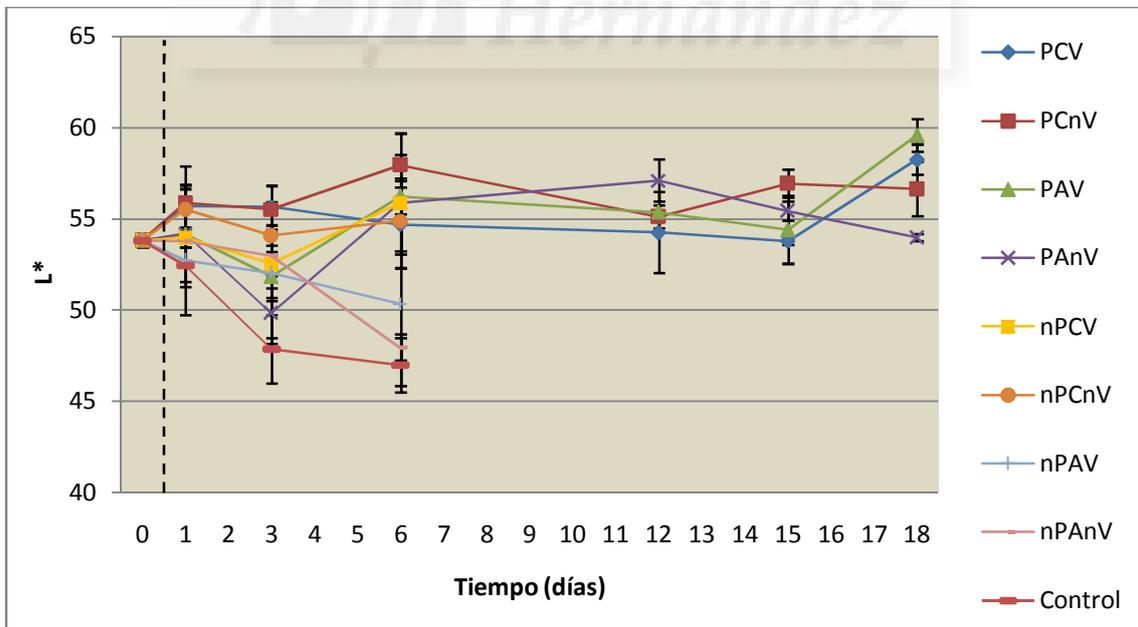


Figura 14. Evolución del parámetro L* durante el tiempo de almacenado

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.
 nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.
 nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.
 nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.
 Control: langostinos no tratados

4.2.1.2. RESULTADOS PARA LA COORDENADA a* DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENADO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

En la tabla 19, se muestran los resultados del test de Tukey para la coordenada a*. Donde se muestran los grupos homogéneos por tiempo de almacenado.

Tabla 19. Resultados del test de Tukey para la coordenada a*

Tiempo / Tratamiento	0	1	3	6	12	15	18
Control	A	A	AB	B	BC	B	C
nPAnV	A	A	AB	B	BC	B	C
nPAV	A	A	AB	B	BC	B	C
nPCV	A	A	AB	B	BC	B	C
PAnV	A	A	AB	B	BC	B	C
nPCnV	A	A	AB	B	BC	B	C
PCV	A	A	AB	B	BC	B	C
PAV	A	A	AB	B	BC	B	C
PCnV	A	A	AB	B	BC	B	C

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.
 nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.
 nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.
 nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.
 Control: langostinos no tratados
 A-C: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

En cuanto a la evolución de la coordenada a* durante el tiempo de almacenado como se puede observar en la figura 15, en todas las muestras se presentó un aumento de la rojez durante el periodo de almacenamiento.

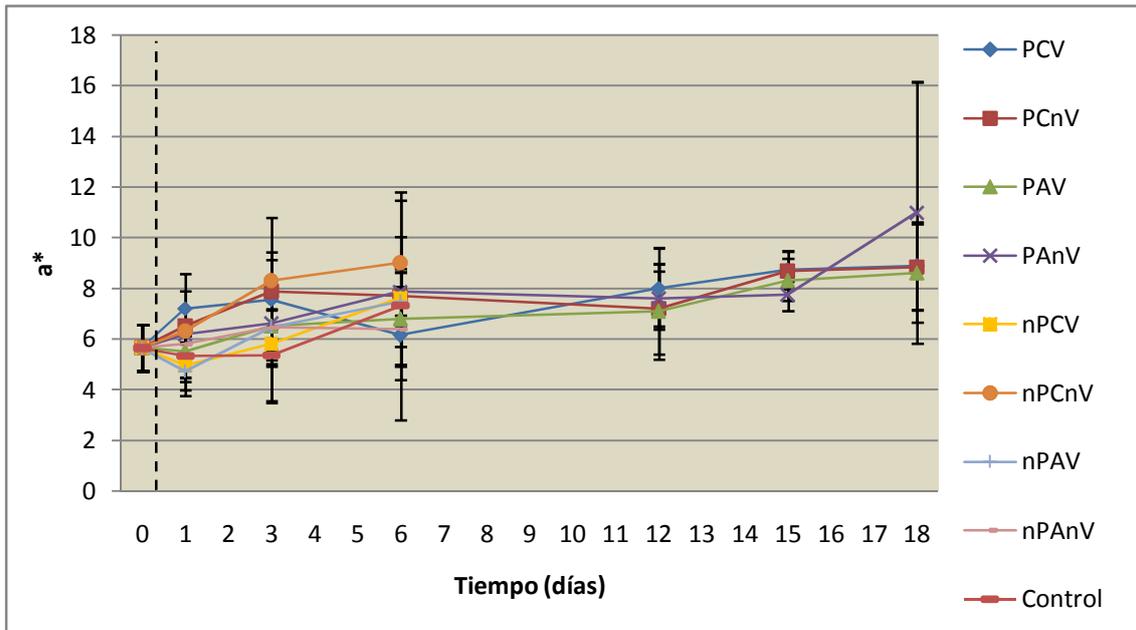


Figura 15. Evolución del parámetro a* durante el tiempo de almacenamiento

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

4.2.1.3. RESULTADOS PARA LA COORDENADA b* DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENADO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

En la tabla 20, se pueden observar los resultados del test de Tukey para la coordenada b*. Donde se agrupan las muestras homogéneas por tratamiento y tiempo de almacenamiento.

Tabla 20. Resultados del test de Tukey para la coordenada b*

Tiempo / Tratamientos	0	1	3	6	12	15	18
Control	a/A	a/B	a/C	a/CD	a/D	a/CD	a/D
nPAV	b/A	b/B	b/C	b/CD	b/D	b/CD	b/D
nPAnV	b/A	b/B	b/C	b/CD	b/D	b/CD	b/D
nPCV	bc/A	bc/B	bc/C	bc/CD	bc/D	bc/CD	bc/D
PAV	bc/A	bc/B	bc/C	bc/CD	bc/D	bc/CD	bc/D
PAnV	c/A	c/B	c/C	c/CD	c/D	c/CD	c/D
nPCnV	c/A	c/B	c/C	c/CD	c/D	c/CD	c/D
PCnV	c/A	c/B	c/C	c/CD	c/D	c/CD	c/D
PCV	c/A	c/B	c/C	c/CD	c/D	c/CD	c/D

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

a-c: letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tipo de tratamiento aplicado en ellas.

A-D: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

En cuanto a la evolución de la coordenada b^* durante el tiempo de almacenado (figura 16), todas las muestras mostraron un aumento de la b^* durante el periodo de almacenamiento.

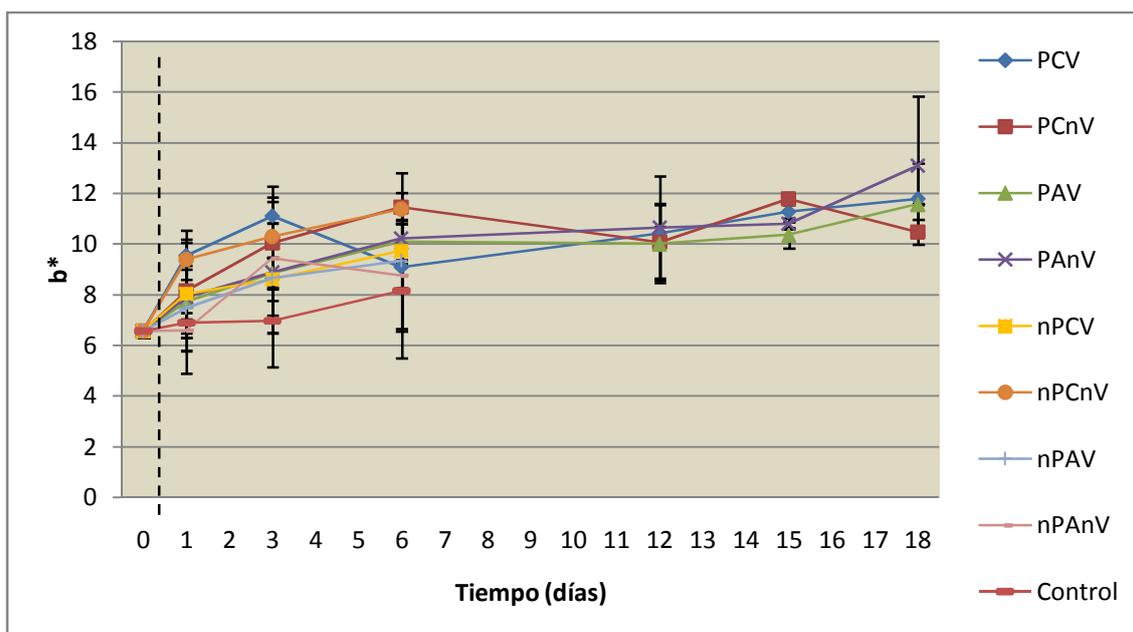


Figura 16. Evolución del parámetro b^* durante el tiempo de almacenado

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.
 nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.
 nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.
 nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.
 Control: langostinos no tratados

4.1.2.3. RESULTADOS PARA LA MAGNITUD CROMA C* DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENADO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

A continuación, en la tabla 21 se muestran los resultados del test de Tukey para la magnitud psicofísica Croma (C*), en ella se presentan las diferentes agrupaciones homogéneas según el tiempo de almacenado.

Tabla 21. Resultados del test de Tukey para la magnitud cromas

Tiempo / Tratamiento	0	1	3	6	12	15	18
Control	A	A	B	BC	BC	BC	C
nPAnV	A	A	B	BC	BC	BC	C
nPAV	A	A	B	BC	BC	BC	C
nPCV	A	A	B	BC	BC	BC	C
PAnV	A	A	B	BC	BC	BC	C
nPCnV	A	A	B	BC	BC	BC	C
PCV	A	A	B	BC	BC	BC	C
PAV	A	A	B	BC	BC	BC	C
PCnV	A	A	B	BC	BC	BC	C

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.
 nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.
 nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.
 nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.
 Control: langostinos no tratados
 A-C: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

Como se puede observar en la figura 17, los valores para la magnitud Cromas en general fueron aumentando con el tiempo de almacenado, mostrando para el último día de almacenamiento los valores más elevados.

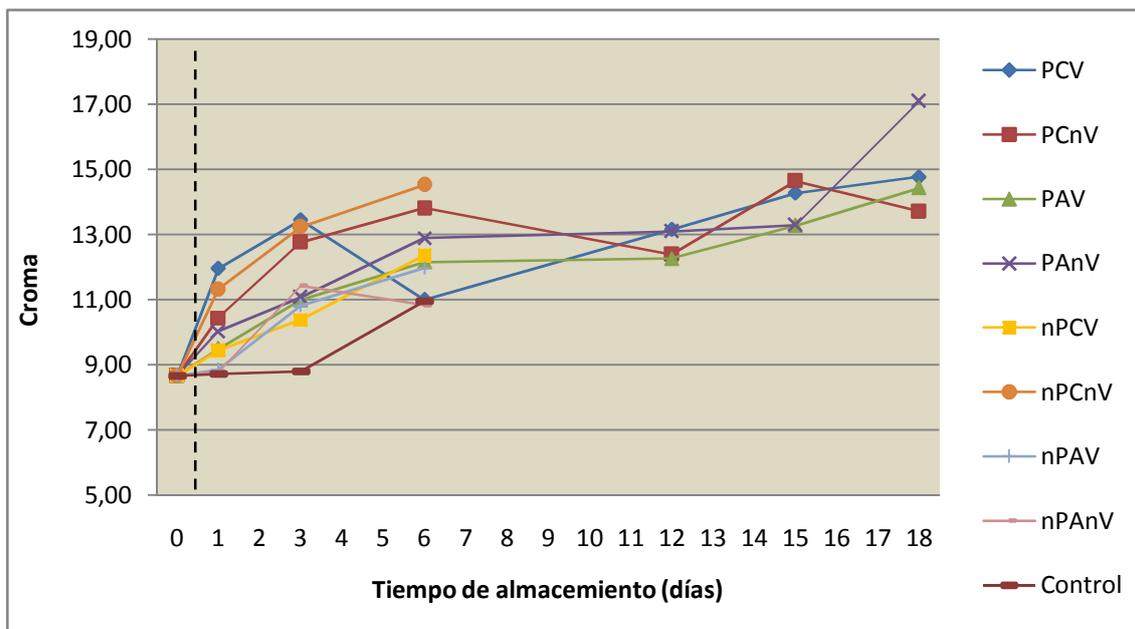


Figura 17. Valores de croma durante el tiempo de almacenamiento

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

4.1.2.4. RESULTADOS PARA LA MAGNITUD TONO DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENADO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

A continuación, en la tabla 22 se muestran los resultados del test de Tukey para la magnitud Tono (h°) en la cual se presentan los diferentes grupos homogéneos según el tiempo de almacenamiento.

Tabla 22. Resultados del test de Tukey para la magnitud tono

Tiempo / Tratamiento	0	1	3	6	12	15	18
Control	A	BC	C	BC	C	BC	AB
nPAnV	A	BC	C	BC	C	BC	AB
nPAV	A	BC	C	BC	C	BC	AB
nPCV	A	BC	C	BC	C	BC	AB
PAnV	A	BC	C	BC	C	BC	AB
nPCnV	A	BC	C	BC	C	BC	AB
PCV	A	BC	C	BC	C	BC	AB
PAV	A	BC	C	BC	C	BC	AB
PCnV	A	BC	C	BC	C	BC	AB

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

A-C: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

En cuanto a la evolución de la magnitud Tono durante el tiempo de almacenamiento (figura 18), en general produce un aumento de este valor con el tiempo de almacenamiento y con una ligera tendencia en las muestras tratadas con APH al final del mismo a disminuir, esta tendencia la presenta además el control el día 6 (último día de análisis para las muestras no tratadas con alta presión), presentando los valores más bajos.

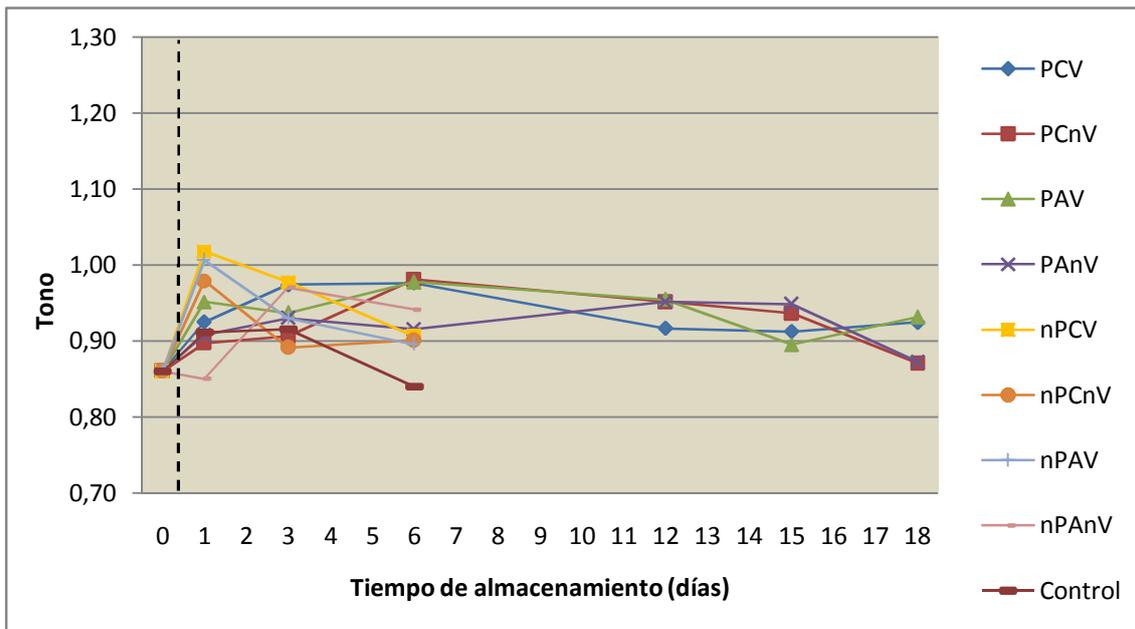


Figura 18. Valores para el tono durante el tiempo de almacenamiento

- PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
- PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.
- PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
- PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.
- nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.
- nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.
- nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.
- nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.
- Control: langostinos no tratados

4.1.2.5. RESULTADOS PARA LA VARIACIÓN DEL COLOR DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENADO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

En la tabla 23, se expresan los resultados del test de Tukey para la variación de color respecto al control, en ella se muestran los diferentes grupos homogéneos según el tipo de tratamiento y el tiempo de almacenado.

Tabla 23. Resultados del test de Tukey para la variación de color

Tiempo / Tratamiento	0	1	3	6	12	15	18
nPAV	a/A	a/B	a/C	a/D	a/E	a/F	a/G
nPAnV	b/A	b/B	b/C	b/D	b/E	b/F	b/G
PAV	c/A	c/B	c/C	c/D	c/E	c/F	c/G
nPCV	d/A	d/B	d/C	d/D	d/E	d/F	d/G
PCV	e/A	e/B	e/C	e/D	e/E	e/F	e/G
Control	f/A	f/B	f/C	f/D	f/E	f/F	f/G
PCnV	g/A	g/B	g/C	g/D	g/E	g/F	g/G
nPCnV	h/A	h/B	h/C	h/D	h/E	h/F	h/G
PAnV	i/A	i/B	i/C	i/D	i/E	i/F	/G

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

a-i: letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tipo de tratamiento aplicado en ellas.

A-G: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

En la tabla 24, se presentan los resultados para la variación de color respecto al control durante el tiempo de almacenado y en general aumenta con el tiempo para todos los tratamientos, mostrando el control los valores más altos. Gaofeng *et al.*, (2015), ha reportado la misma tendencia de aumento para la variación de color con el tiempo de almacenamiento en langostinos tratados con quitosano al 1,5% enriquecido con extracto de piel de granada además de una variación de color menor para las muestras tratadas que para el control.

Tabla 24. Valores de la variación de color de los tratamientos respecto al control durante el tiempo de almacenamiento

Tiempo Tratamiento	1	3	6	12	15	18
PCV	3,84	5,26	2,73	4,55	5,63	7,58
PCnV	2,73	4,46	6,72	4,05	6,79	5,77
PAV	1,21	3,14	4,41	4,03	4,66	8,17
PAnV	1,48	4,72	4,73	5,59	4,99	8,43
nPCV	1,62	2,41	4,25	-	-	-
nPCnV	3,35	4,58	5,97	-	-	-
nPAV	1,68	2,87	4,81	-	-	-
nPAnV	0,15	3,09	6,31	-	-	-
Control	1,44	5,98	7,22	-	-	-

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

4.1.3. RESULTADOS PARA LA TEXTURA DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENADO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

La textura es un parámetro estudiado en los langostinos ya que estos son conocidos por su sabor y textura únicos. Los principales componentes musculares responsables del cambio en la textura de los langostinos son las proteínas del tejido conectivo y las proteínas miofibrilares (Gaofeng *et al.*, 2015). Para estudiar este parámetro se realizó el test de corte o de cizalla ya que las muestras presentaban una alta heterogeneidad entre ellas y además no presentaban la misma altura en todas las partes de su cuerpo, por ello que se creyó más oportuno determinar la fuerza (N) necesaria para cortar perpendicularmente al eje de la fibra muscular.

Como se puede observar en la tabla 25, los resultados ANOVA para el test de corte presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en los factores tratamiento, tiempo y la interacción de tiempo por almacenamiento.

Tabla 25. Resultados del ANOVA para el test de corte

Factor	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Tratamiento	960,156	8	120,020	21,669	,000
Tiempo	312,110	6	52,018	9,392	,000
Tratamiento * Tiempo	682,360	45	15,164	2,738	,000

En la tabla 26, se muestran los resultados del test de Tukey para los factores tiempo de almacenado y tratamiento. En ella se presentan los grupos homogéneos según los factores estudiados.

Tabla 26. Resultados test de Tukey para el test de corte

Tiempo / Tratamiento	0	1	3	6	12	15	18
nPanV	a/ABC	a/D	a/BCD	a/CD	a/ABC	a/AB	a/A
Control	a/ABC	a/D	a/BCD	a/CD	a/ABC	a/AB	a/A
nPAV	b/ABC	b/D	b/BCD	b/CD	b/ABC	b/AB	b/A
nPCV	bc/ABC	bc/D	bc/BCD	bc/CD	bc/ABC	bc/AB	bc/A
PCnV	bcd/ABC	bcd/D	bcd/BCD	bcd/CD	bcd/ABC	bcd/AB	bcd/A
nPCnV	bcd/ABC	bcd/D	bcd/BCD	bcd/CD	bcd/ABC	bcd/AB	bcd/A
PCV	bcd/ABC	bcd/D	bcd/BCD	bcd/CD	bcd/ABC	bcd/AB	bcd/A
PAnV	cd/ABC	cd/D	cd/BCD	cd/CD	cd/ABC	cd/AB	cd/A
PAV	d/ABC	d/D	d/BCD	d/CD	d/ABC	d/AB	d/A

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPanV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

a-d: letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tipo de tratamiento aplicado en ellas.

A-D: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

En cuanto a la evolución de este parámetro durante el almacenado, presentado en la figura 19, tras la aplicación de los tratamientos, representada en la figura mediante una línea discontinua, la resistencia al corte aumentó para las muestras tratadas con APH y/o quitosano mientras que para el resto de muestras y el control se mantuvo o disminuyó. Este aumento de la resistencia al corte podría deberse a la coagulación y pérdida de agua producida por la desnaturalización de

las proteínas miofibrilares (Fatemeh *et al.*, 2016). Barjinder *et al.*, (2015) reportó un aumento de la dureza tras el tratamiento con APH además de una relación directa con la intensidad y tiempo del tratamiento en camarones, además Truong *et al.*, (2015) informaron que el tratamiento con altas presiones hidrostáticas mejora las interacciones proteína-proteína, mediante la formación de enlaces disulfuro y de hidrógeno, produciendo una mejora en la dureza del tejido, cohesividad y elasticidad. Tras el aumento inicial de la resistencia al corte, el día 3 se produjo una disminución de la misma en todas las muestras, posiblemente debida a la degradación microbiana de las proteínas miofibrilares, provocando un reblandecimiento del musculo (Gaofeng *et al.*, 2015), tras esta caída, la resistencia al corte fue disminuyendo durante todo el tiempo de almacenamiento, presentando los valores más bajos para el control y las muestras no tratadas con APH y/o quitosano. Otros autores han reportado un mantenimiento de los parámetros de textura tras el tratamiento con quitosano como Gaofeng *et al.*, (2015) donde los langostinos mostraron valores de textura más altos que el control durante el almacenamiento tras el recubrimiento con quitosano enriquecido con extracto de piel de granada y Fatemeh *et al.*, (2016) que presentó la misma tendencia en langostinos refrigerados recubiertos con quitosano al 1% y gelatina al 3%.

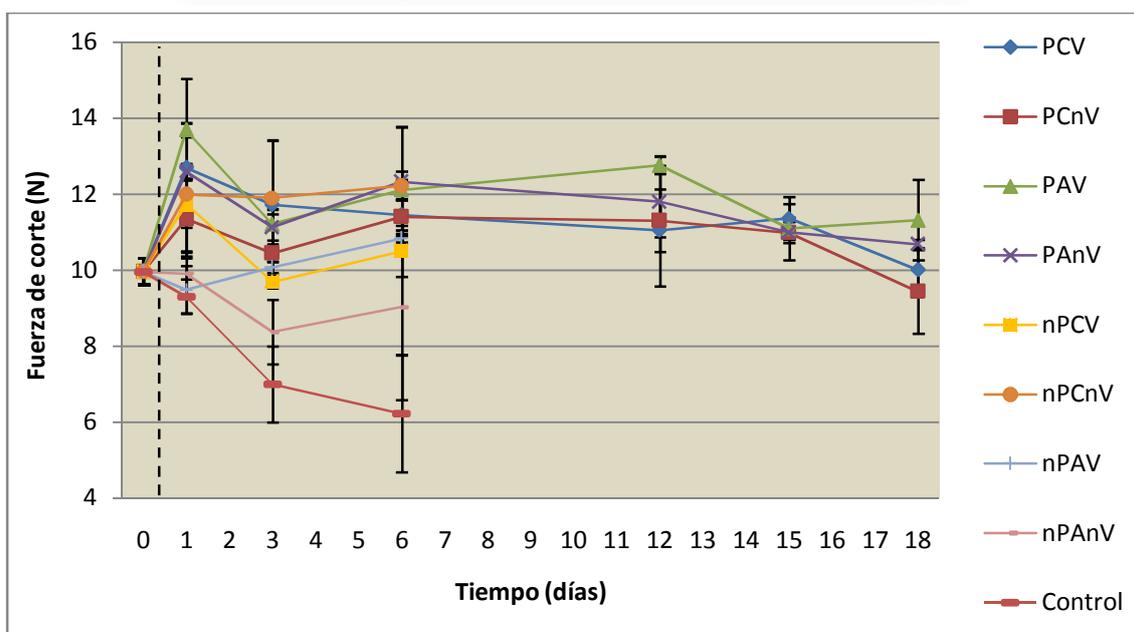


Figura 19. Evolución de la fuerza de corte durante el almacenamiento

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
 PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.
 nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.
 nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.
 nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.
 nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.
 Control: langostinos no tratados

4.1.4. RESULTADOS PARA EL pH DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENADO EN REFRIGERACIÓN DE LANGOSTINOS

El valor del pH es uno de los parámetros de calidad más utilizado para los productos del mar (Kaur *et al.*, 2013). Un pH alto es indicador del deterioro del producto y puede atribuirse esencialmente al amoníaco producido por el catabolismo bacteriano de compuestos que contienen nitrógeno (LeBlanc y Gill, 1984), Nirmal y Benjakul, (2009) expresaron que valores de pH superiores a 7,6 no eran aceptables para camarones.

Como se muestra en la tabla 27, los resultados ANOVA para el pH presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para los factores tiempo, tratamiento e interacción de tiempo por tratamiento.

Tabla 27. Resultados ANOVA para el pH

Factor	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Tratamiento	9,585	8	1,198	106,118	,000
Tiempo	17,876	6	2,979	263,876	,000
Tratamiento * Tiempo	5,838	45	,130	11,490	,000

A continuación, en la tabla 28 se presentan los resultados del test de Tukey para el pH. Mostrando los grupos homogéneos para los factores estudiados, tiempo y tratamiento.

Tabla 28. Resultados test de Tukey para el pH

Tiempo / Tratamiento	0	1	3	6	12	15	18
PAV	a/C	a/D	a/E	a/A	a/D	a/A	a/B
nPCnV	b/C	b/D	b/E	b/A	b/D	b/A	b/B
PCnV	bc/C	bc/D	bc/E	bc/A	bc/D	bc/A	bc/B
PAnV	bc/C	bc/D	bc/E	bc/A	bc/D	bc/A	bc/B
PCV	c/C	c/D	c/E	c/A	c/D	c/A	c/B
nPCV	d/C	d/D	d/E	d/A	d/D	d/A	d/B
nPAnV	de/C	de/D	de/E	de/A	de/D	de/A	de/B
nPAV	e/C	e/D	e/E	e/A	e/D	e/A	e/B
Control	f/C	f/D	f/E	f/A	f/D	f/A	f/B

PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.

PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.

PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.

nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.

nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.

nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.

nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.

Control: langostinos no tratados

a-f: letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tipo de tratamiento aplicado en ellas.

A-E: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre valores medios de las muestras debido al tiempo de almacenamiento.

Los valores de pH inicialmente eran de 7,25, similarmente a lo reportado por Gaofeng *et al.*, (2016), Arancibia *et al.*, (2015) y Gaofeng *et al.*, (2015) en langostinos (7,24, 7,25 y 7,28 respectivamente). En cuanto a la variación del pH durante el tiempo de almacenado mostrada en la figura 20, todas las muestras tratadas con APH presentaron un pH comprendido entre 6,48 y 7,44, para las muestras recubiertas con quitosano, el pH se mantuvo en unos valores entre 6,64 y 7,59 mientras que para las muestras inmersas en agua, los valores de pH sobrepasaron el valor propuesto como crítico (7,6) el día 3 de almacenamiento sin embargo, el control sobrepasó este valor el día 1 con un pH de 7,8y el día 3 presentó el valor más elevado(8,84). En general, todas las muestras presentaron un pH más elevado el día 3 de almacenamiento debido posiblemente a la acumulación de compuestos básicos causada por la actividad de bacterias o de acciones enzimáticas (López-Caballero *et al.*, 2007) además de la acumulación de compuestos alcalinos, tales como trimetilamina (TMA) que derivan directamente de la acción microbiana (Erkan *et al.*, 2011).

Gaofeng *et al.*, (2016) reportaron un aumento de pH menor para las muestras recubiertas (con quitosano enriquecido con extracto de té verde) respecto al control, por lo que propusieron que el tratamiento con quitosano podría contribuir a retardar la pérdida de calidad del camarón.

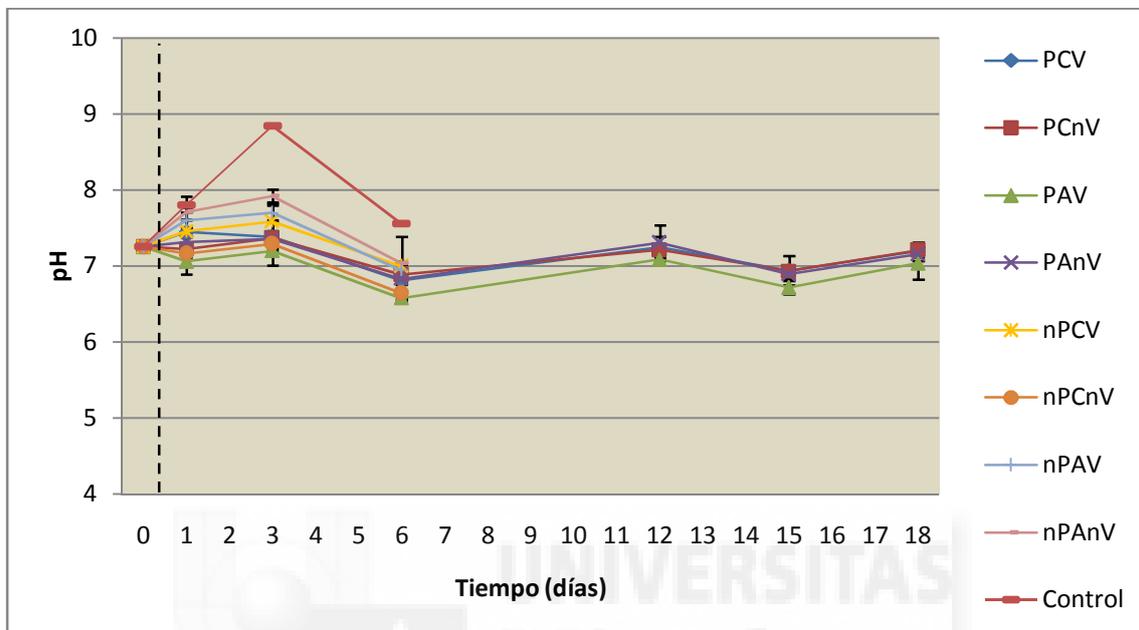


Figura 20. Variación de pH durante el tiempo de almacenado

- PCV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
- PCnV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados en atmósfera normal.
- PAV: langostinos tratados con alta presión, quitosano y almacenados a vacío.
- PAnV: langostinos tratados con alta presión, agua y almacenados en atmósfera normal.
- nPCV: langostinos tratados con quitosano y conservados a vacío.
- nPCnV: langostinos tratados con quitosano y almacenados en atmósfera normal.
- nPAV: langostinos tratados con agua y conservados a vacío.
- nPAnV: langostinos tratados con agua y conservados en atmósfera normal.
- Control: langostinos no tratados

5- CONCLUSIONES

Mt Miguel Hernández

5. CONCLUSIONES

Tras la realización del trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones:

- ✓ Los langostinos tratados con alta presión hidrostática mostraron una reducción de la carga microbiana mayor respecto al resto de tratamientos, siendo esta más acentuada para los que además estaban almacenados a vacío. Además, se ha podido observar que dichos tratamientos ejercen daños en las células de *Pseudomonas spp.* y *Vibrio spp.* ya que estos microorganismos estuvieron bajo el límite de detección tras la realización de los tratamientos.
- ✓ Los tratamientos con alta presión hidrostática y/o quitosano mantuvieron más estables los parámetros de color de las muestras a lo largo del tiempo de almacenamiento, aumentando con las altas presiones la luminosidad de los langostinos.
- ✓ En cuanto a la textura, tras los tratamientos con alta presión hidrostática y recubrimiento con quitosano los langostinos presentaron valores de resistencia al corte mayores que los valores obtenidos para los tratamientos control. Sin embargo, los tratamientos de alta presión hidrostática y quitosano mantuvieron más estable este parámetro durante el tiempo de almacenamiento, el cual disminuyó para todas las muestras.
- ✓ El tratamiento con alta presión hidrostática y el tratamiento con recubrimientos de quitosano mantuvieron más estables los valores de pH durante el tiempo de almacenado siendo menores las variaciones en dichos valores en las muestras tratadas con alta presión hidrostática.

Para concluir, decir que todos los tratamientos que contenían alta presión hidrostática y/o quitosano aumentaron la vida útil de los langostinos, siendo el tratamiento con alta presión hidrostática en combinación con el envasado a vacío el más efectivo, presentando el tiempo de almacenamiento más largo.

Además sería conveniente realizar más estudios eligiendo la combinación de tratamientos más adecuada a partir de los resultados de este estudio, e incluir en ellos pruebas de análisis sensorial para evaluar los efectos de los tratamientos sobre las características organolépticas de los langostinos y la aceptación del consumidor.



6- BIBLIOGRAFÍA

*Miguel
Hernández*

6. BIBLIOGRAFÍA

Abe, F. (2007). Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology, and survival: perspectives from piezophysiology. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71: 2347-2357.

Albertos I., Rico D., Diez A. M., González-Arnáiz L., García-Casas M. J., Jaime I. (2015). Effect of edible chitosan/clove oil films and high pressure processing on the microbiological shelf life of trout fillets. *Journal of the science of food and agriculture*, 95 (14): 2858-2865.

Ali Günlüa, Sinem Sipahioğlub y Hami Alpas (2014). The effect of chitosan-based edible film and high hydrostatic pressure process on the microbiological and chemical quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykissWalbaum*) fillets during cold storage ($4 \pm 1^\circ\text{C}$). *High Pressure Research*, 34: 110–121.

Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., y Ray, B. (2000). Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 60(1): 33-42.

Anaya, P., Cardenas, G., Lavayen, V., Garcia, A., y O'Dwyer, C. (2013). Chitosan gel film bandages: correlating structure, composition, and antimicrobial properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 121: 3939-3948.

Arancibia M.Y., Lopez-Caballero M.E., Gomez-Guillen M.C. y Montero P. (2015). Chitosan coatings enriched with active shrimp waste for shrimp preservation. *Food Control*, 54: 259-266.

Barbosa-Cánovas, G. V. y Juliano, P (2008). Food sterilization by combining high pressure and thermal energy. J. Welte-Chanes y E. Ed. Parada-Arias. Nueva York.

Barjinder Pal Kaur, P. Srinivasa Rao b, Prabhat K. Nema (2015). Effect of hydrostatic pressure and holding time on physicochemical quality and microbial

inactivation kinetics of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 33.

BEDCA. Base de Datos Española de Composición de Alimentos. Consultada en junio del 2016. Disponible en <http://www.bedca.net/>

Bidle KA y Bartlett DH. (2001). RNA arbitrarily primed PCR survey of genes regulated by ToxR in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9. *J Bacteriol* , 183(5):1688–93.

Borch, E., Kant-Müermans, M. -L., y Blixt, Y (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* , 33: 103–120.

Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. A., Rocha, C. M., Avides, M. C., Quintas, M. A. (2011). Physico-chemical characterization of chitosanbased edible films incorporating bioactive compounds of different molecularweight. *Journal of Food Engineering*, 106: 111-118.

Buckow, R. y Heinz, V (2008). High pressure processing e a database database of kinetic information. *Chemie Ingenieur Technik*, 80(8): 1081-1095.

Calci, K. R., Meade, G. K., Tezloff, R. C., y Kingsley, D. H. (2005). High-pressure inactivation of hepatitis A virus within oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1): 339-343.

Chaiyakosa, S., Charernjiratragul, W., Umsakul, K., Vuddhakul, V. (2007). Comparing the efficiency of chitosan with chlorine for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp. *Food Control*, 18: 1031–1035.

Considine, K. M., Kelly, A. L., Fitzgerald, G. F., Hill, C., & Sleator, R. D(2008). Highpressure processing e effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters*, 281(1): 1-9.

Cook, D. W. (2003). Sensitivity of *Vibrio* species in phosphate-buffered saline and in oysters to high-pressure processing . *Journal of Food Protection*, 66(12): 2276-2282.

Cui, H., Kong, Y., & Zhang, H. (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Journal of Signal Transduction* 10: 1-13.

Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J (2004). New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4); 273-285.

DOF (2014) Diario Oficial de la Federación. Acuerdo por el que se da a conocer el Plan de Manejo Pesquero de Camarón Café y Camarón Blanco en las costas de Tamaulipas y Veracruz.

http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5336631&fecha=12/03/2014

Dutta, J., Tripathi, S., & Dutta, P. K. (2012). Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food Science and Technology International*, 18:(1), 3-34.

Erkan N., (2007). Freshness and quality of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Archiv Lebensmittelhyg*, 58: 98-106.

Erkan, N., ÜRTEener, G., Alpas, H., Selçuk, A., Özden, Ö., & Buzrul, S. (2011). The effect of different high pressure conditions on the quality and shelf life of cold smoked fish. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(2): 104-110.

FAO. (2014). *SOFIA. El estado mundial de la pesca y acuicultura*. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf>

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultado en mayo del 2016. Disponible en <http://faostat.fao.org/>

Farr, D. (1990). High pressure technology in the food industry & Technology. *Trends in Food Science*, 1: 14-16.

Fatemeh Farajzadeh, Ali Motamedzadegan, Seyed-Ahmad Shahidi, Shabnam (2016). The effect of chitosan-gelatin coating on the quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under refrigerated condition. *Food Control*, 67: 163-170.

Filippin, L. I., Vercelino, R., Marroni, N. P., Xavier, R. M. (2008). Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clinical & Experimental Immunology*, 152: 415-422.

Gaofeng Yuan, Hua Lv, Wenyan Tang, Xiaojuan Zhang, Haiyan Sun. (2016). Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. *Food Control*, 59: 818-823.

Gaofeng Yuan, Xiaojuan Zhang, Wenyan Tang & Haiyan Sun (2015). Effect of chitosan coating combined with green tea extract on the melanosis and quality of Pacific white shrimp during storage in ice. *CyTA - Journal of Food*, 14: 35-40.

Gesche, E.; A. Vallejos, M.V.; T.M, M. Saez (2003). Efficiency of Sulphite-reducing bacteria as sanitary-indicator for water. MPN-method. *Arch. Med. Vet. XXXV*, 1: 99 - 107.

Gram, L. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol*, 31: 121-137.

Hite, B. H. (1899). The effect of pressure in the preservation of milk. *Bulletin of West Virginia University Agricultural Experiment Station*, 58: 15-35.

Hogan, E., Kelly, A. L., & Sun, D.-W (2005). High pressure processing of foods: an overview. In S. Da We (Ed.), *Emerging technologies for food processing*, 3-31.

Hsiao-Wen Huang, Hsiang-Mei Lung, Binghuei Barry Yang, Chung-Yi Wang (2014). Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*, 40: 250-259.

Iwahori, J., Yamamoto, A. (2010). Quantitative risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in finfish: a model of raw horse mackerel consumption in Japan. *Risk Analysis*, 30: 1817-1832.

Jay, J. Loessner, M. J. & Golden, D. A. (2009). *Microbiología moderna de los alimentos*. Ed. ACRIBIA. Zaragoza

Junjie Yi, Liang Zhang, Guowei Ding, Xiaosong Hu, Xiaojun Liao, Yan Zhang (2013). High hydrostatic pressure and thermal treatments for ready-to-eat wine-marinated shrimp: An evaluation of microbiological and physicochemical qualities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20: 16-23.

Kangde Yao, Junjie Li, Fanglian Yao, Yuji Yin. (2011). Chitosan-Based Hydrogels: Functions and Applications. Ed. CRC Press Florida. Tianjin

Kamil, J. Y. V. A., Jeon, Y. J., y Shahidi, F. (2002). Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*, 79: 69-77.

Kaur, B., Kaushik, N., Rao, P.S., & Chauhan, O. P. (2013). Effect of high-pressure processing on physical, biochemical, and microbiological characteristics of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Food and Bioprocess Technology*, 6(6): 1390 – 1400.

Kerch, G. (2015). The potential of chitosan and its derivatives in Prevention and treatment of age-related diseases. *Marine drugs* , 13: 2158-2182.

Khor, E., y Lim, L. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Bio-materials* , 24: 2339-2349.

Khoushab, F., y Yamabhai, MK. (2010). Chitin research revisited. *Marine Drugs*, 8: 1988-2012.

Kim, S. K., Mendis, E., & Shahidi, F. (2007). Marine fisheries by-products as potencial nutraceuticals: an overview . *Marine nutraceuticals and functional foods*, 13 (10): 2-9.

Kingsley, D. H., Holliman, D. R., Calci, K. R., Chen, H., & Flick, G. J. (2007). Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(2): 581-585.

LeBlanc, R. J., & Gill, T. A. (1984). Ammonia as an objective quality index in squid. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 17: 195 - 201.

- Lekjing, S. (2016). A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. *Meat Science*, 111: 192–197.
- Li, M., Pradhan, K.A., Cooney, L., Mauromoustakos, A., Crandall, P., Slavik, M., Li, Y. (2011). A predictive model for the inactivation of *Listeria innocua* in cooked poultry products during postpackage pasteurization. *Journal of Food Protection*, 7: 1261–1267.
- López-Caballero, M. E., Martínez-Álvarez, O., Gómez-Guillén, M. D.C., y Montero, P. (2007). Quality of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with melanosis-inhibiting formulations during chilled storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 42: 1029–1038.
- Manda, G., Nechifor, M. T., & Neagu, T. M. (2009). Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Current Chemical Biology*, 3: 342-366.
- Mathias-Rettig, K., Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *AGRO SUR*, 42 (2): 39-48.
- Metrick, C., Hoover, D. G., y Farkas, D. (1989). Effects of high hydrostatic pressure on heat-sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science*, 54: 1547-1564.
- Minami, A., Chaicumpa, W., Manas, C.N., Samosornsuk, S., Monden, S., Takeshi, K., Makino, S., Kawamoto, K. (2010). Prevalence of foodborne pathogens in open markets and supermarkets in Thailand. *Food Control*, 21: 221–226.
- Morganti, P., Morganti, G., & Morganti, A. (2011). Transforming nanostructured chitin from crustacean waste into beneficial health products: a must for our society. *Nanotechnology, Science and Applications*, 4: 123-129.
- Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Samson, C. T., Welti-Chanes, J., y Torres, J. A. (2011). High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food Bioprocess and Technology*, 4: 969-985.

Muzzarelli, R. A. A., & Muzzarelli, C. (2005). Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences. *Advances in Polymer Science*, 186: 151-209.

Nirmal, N., y Benjakul, S. (2009). Melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3578-3586.

No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of food science* , 72: 87-100.

Park, B. K., & Kim, M. M. (2010). Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *International Journal of Molecular Sciences* , 11: 5152-5164.

Pascual Anderson, María del Rosario, Calderón y Pascual, Vicente (1999). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Ed Diaz de Santos.. Madrid

Patterson, M. F. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1400-1409.

Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, R. K., & Gilmour, A. (1995). Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphatebuffered saline and foods. *Journal of Food Protection*, 58: 524-529.

Prashanth KVH, Tharanathan RN. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science & Technology* , 18: 117-131.

Quesada Jesús, Sendra Esther, Navarro Casilda y Sayas-Barberá. (2016). Antimicrobial Active Packaging including Chitosan Films with *Thymus vulgaris* L. Essential Oil for Ready-to-Eat Meat. *Foods* 2016, 5(3), 57

Ramírez, M. A., Rodríguez, A. T., Alfonso, L., & Peniche, C. (2010). Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Biotechnologia Aplicada* , 27, 270-276.

Raventos Santamaria, M. (2005). *Industria alimentaria: Tecnologías emergentes*. Ed. Ediciones UPC. Barcelona

Reesha K.V., Kumar Panda S., Bindu J., Varghese T.O., (2015). Development and characterization of an LDPE/chitosan composite antimicrobial film for chilled fish storage, *Int. J. Biol. Macromol*, 79: 934–942

Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Reglamento (CE) N° 1441/2007 de la comisión, de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) N° 2073.

Reglamento (CE) N°1881/2006 de la comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Barber X, Sendra E, Pérez-Alvarez JA, Fernández-López J. (2015). Effect of chitosan edible films added with *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oil on shelf-life of cooked cured ham. *J Food Sci Technol*, 52(10):6493-6501.

Sallam KI, (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18: 566–575.

Sayas-Barberá E, Quesada J, Sánchez-Zapata E, Viuda-Martos M, Fernández-López F, Pérez-Alvarez JA, Sendra E. (2011). Effect of the molecular weight and concentration of chitosan in pork model burgers. *Meat Sci*, 88 (4): 740-749.

Sethulekshmi, C. (2014). Chitin and its benefits. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 1: 171-175.

Shekarforoush, S. Basiri, H. Ebrahimnejad, S. Hosseinzadeh. (2015). Effect of chitosan on spoilage bacteria, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in cured chicken meat. *Int. J. Biol. Macromol*, 76: 303–309.

Sinha, S., Chand, S., & Tripathi, P. (2014). Microbial degradation of chitin waste for production of chitosanase and food related bioactive compounds. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50: 125-133.

Smelt, J. P. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 152-158.

Sogias, I. A. (2010). Exploring the factors affecting the solubility of chitosan in water. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211: 426-433.

Tharanathan, R. N., & Kittur, F. S. (2003). Chitin-the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43: 61-87.

Truong, B. Q., Buckow, R., Minh, H. N., & Costas, E. S. (2015). High pressure processing of barramundi (*Lates calcarifer*) muscle before freezing: The effects on selected physicochemical properties during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 169: 72-78.

Tungtong, S., Okonogi, S., Chowwanapoonpohn, S., Phutdhawong, W., & Yotsawimonwat, S. (2012). Solubility, viscosity and rheological properties of water-soluble chitosan derivatives. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 6: 315-322.

Viarsagh, M. S., Janmaleki, M., Falahatpisheh, H. R., & Masoumi, J. (2010). Chitosan preparation from persian gulf shrimp shells and investigating the effect of time on the degree of deacetylation. *Journal of Paramedical Sciences (JPS)*, 1.

Wen Wang, Min Li, Weihuan Fang, Abani K. Pradhan, Yanbin Li (2013). A predictive model for assessment of decontamination effects of lactic acid and chitosan used in combination on *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 124-130.

Wilson, D. R. (2008). High pressure in combination with elevated temperature as a method for the sterilisation of food. *Trends in Food Science and Technology*, 19: 289-299.

Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. (2010). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25: 170-179.

Yağiz, Y., Kristinsson, H. G., Balaban, M.O., Welt, B.A., Ralat, M., & Marshall, M. R (2009). Effect of high pressure processing and cooking treatment on the quality of Atlantic salmon. *Food Chemistry*, 116(4): 828–835.

Younes, I., y Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from Marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs* , 13: 1133-1174.

Zarei, M., Borujeni, M.P., Jamnejad, A., Khezzadeh, M. (2012). Seasonal prevalence of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*, 25: 107–109.

Zhang, J.Y., Mei, L.L., Zhu, M., Zhang, Y.J., Pan, X.X., Shi, Y.S., Zheng, G.Z. (2007). Quantitative inspection and analysis of *Vibrio parahaemolyticus* contamination in 301 seafoods. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 17: 509–510.

Zhang, J., Xia, W., Liu, P., Cheng, Q., Tahirou, T., Gu, W. (2010). Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Marine Drugs* , 8, 1962-1987.

Zhang, Zhang, N., Andresen, B. T., y Zhang, C. (2010). Inflammation and reactive oxygen species in cardiovascular disease. *World Journal of Cardiology* , 2, 408-410.