



Universidad Nacional de La Plata

**Irradiación gamma en anillas de calamar (*Illex
argentinus*) y filetes marinados de anchoíta
(*Engraulis anchoita*).
Aspectos tecnológicos y de calidad.**

Tesis de Doctorado

ALEJANDRA TOMAC

Presentada ante la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata como requisito para la obtención del grado académico de DOCTOR EN INGENIERÍA

Codirector: Dr. Rodolfo H. Mascheroni

Director: Ing. María I. Yeannes

Jurado de Tesis

Dra. Stella Maris Alzamora

Dr. Guillermo Hough

Fecha de defensa oral y pública: 22 de Marzo del 2013. La Plata.

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Laboratorio de Preservación y Calidad de Alimentos (Facultad de Ingeniería, UNMdP) y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET), bajo la dirección de la Ing. María Isabel Yeannes y la codirección del Dr. Rodolfo Horacio Mascheroni.

Mi más profundo agradecimiento es para las personas que me acompañaron y orientaron en este camino, y aquellas que lo hacen día a día desde hace años. Su presencia, colaboración y dedicación fue fundamental para el desarrollo de esta tesis:

- ▲ A la Ing. María Isabel Yeannes, directora de esta tesis, quien me ha guiado desde el comienzo en el camino de la investigación, compartiendo su invaluable conocimiento y experiencia sobre los productos pesqueros. Por su cariño, sus palabras sabias, su pasión por la investigación, su agradable compañía y su dedicación...gracias!
- ▲ Al Dr. Rodolfo H. Mascheroni, co-director de esta tesis, quien siempre estuvo dispuesto a recibir mis consultas afectuosamente y me facilitó el uso de las instalaciones del CIDCA, ofreciéndome durante este trayecto su vasto conocimiento científico y su experiencia en la investigación en un marco sumamente agradable.
- ▲ A la Lic. Patricia Narvaiz, cuya experiencia y entendimiento en la irradiación de alimentos me ha deslumbrado en reiteradas ocasiones. Por ofrecerme afectuosamente todo su conocimiento en la materia. Por confiar en mí y por los buenos momentos compartidos.
- ▲ A la Lic. Constanza Cova, la Técnica Maritza Guerrero y Marcelo Arcuri, así como a la gerencia de dosimetría del Centro Atómico Ezeiza, por su generosa colaboración durante los viajes realizados al Centro Atómico para irradiar.
- ▲ A la Lic. Silvia Baragnano, de la empresa Pranas S.A., por facilitar las muestras de marinados de anchoíta.
- ▲ A Mauro Cardoni, del Frigorífico Mía, por hacer lo imposible por conseguir calamar fresco.
- ▲ Al Departamento de Ingeniería Química y en Alimentos de la Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata, donde se desarrolló esta tesis y a la Facultad de Ingeniería de la UNLP por permitirme ser alumna del doctorado.
- ▲ Al CONICET y la Universidad Nacional de Mar del Plata, ya que gracias a las becas y subsidios otorgados por dichos organismos se pudo realizar esta tesis.

- ♣ A las distintas personas que componen la comunidad de la Facultad de Ingeniería de la UNMDP, que de alguna manera colaboraron con el desarrollo de esta tesis.
- ♣ A mis compañeros del GIPCAL, Celia, Gabi, Gerar, Ire, Mari, Mery Rose, Moni y Sil, a quienes aprecio como una familia, por el apoyo y el cariño, y por hacer del ambiente laboral un hogar.
- ♣ A mis amigas y amigos, hermanos del alma, y a su hermosa descendencia que me llena de alegría el corazón.
- ♣ A mi papá y mi mamá, por su constante apoyo, su amor y compañía en todos los proyectos en los que me embarqué, por su eterna confianza.
- ♣ A Fer y Guille, por ser indispensables para mí y por acompañarme bien cerquita aunque estemos lejos.
- ♣ A Gerar, el mejor compañero. Por su amor y por soñar conmigo la vida que elegimos cada día.
- ♣ A María, Juan, Clara y Petri.

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en revistas internacionales con referato, en capítulos de libros y en presentaciones a congresos:

Publicaciones

Modelling the effect of gamma irradiation on the inactivation and growth kinetics of psychrotrophic bacteria in squid rings during refrigerated storage. Shelf-life predictions. (2013). Tomac, A., Mascheroni, R.H. & Yeannes, M.I. Journal of Food Engineering, 117, 211-216.

Gamma radiation effect on quality changes in vacuum-packed squid (*Illex argentinus*) mantle rings during refrigerated (4-5 °C) storage. (2012). Tomac, A. & Yeannes, M.I. International Journal of Food Science and Technology, 47 (7), 1550-1557.

Gamma irradiated marinades of anchovy (*Engraulis anchoita*). Quality changes during refrigerated storage. (2012). Tomac, A. & Yeannes, M.I. Journal of Aquatic Food Product Technology. En revisión. N° Manuscrito: WAFP-2012-0160R1.

Capítulo de libro

Color of vacuum-packed squid (*Illex argentinus*) mantle rings treated with gamma radiation. (2012) .Tomac, A. & Yeannes, M.I. En: Color in Food: Technological and Psychophysical Aspects. Eds.: Caivano, J.L. y Buera, M. del Pilar. ISBN: 9781439876930 - CRCPress - pp. 201-209.

Presentaciones orales en congresos

Sensory acceptability of squid (*Illex argentinus*) rings preserved by gamma irradiation during refrigerated storage. (2012). Tomac, A., Cova, C., Narvaiz, P. & Yeannes, M.I. Presentado oralmente por Tomac, A. en el 16th World Congress of Food Science and Technology of IUFoST – 5 al 9 Agosto 2012 - Foz de Iguazu, Brasil - ISSN 2304-7992.

Preservación de anillas de calamar mediante irradiación gamma. Aspectos microbiológicos, sensoriales y fisicoquímicos. (2011). Tomac, A., Cova, C., Narvaiz, P. & Yeannes, M.I. Presentado oralmente por Tomac, A. en la XXXVIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear – 15-11-2011 - Buenos Aires.

Presentaciones en congresos

Efecto de la irradiación gamma sobre la aceptabilidad sensorial de anillas de calamar refrigeradas. (2011). Tomac, A., Cova, C., Narvaiz, P. & Yeannes, M.I. Actas del XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos – AATA – 19/21 Octubre 2011 – Buenos Aires. *Trabajo completo*

Preservación de anillas de calamar frescas con radiación gamma. (2011). Tomac, A., Narvaiz, P. & Yeannes, M.I. Libro de resúmenes - XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos – AATA – 19/21 Octubre 2011 – Buenos Aires.

Parámetros de calidad de calamar fresco y de tubos blanqueados (*Illex argentinus*). (2011). Tomac, A. & Yeannes, M.I. II Congreso Latinoamericano y III del Caribe de Higiene y Calidad en la Alimentación - Mayo 2011 – La Habana – Cuba.

Color changes in vacuum-packed squid mantle rings (*Illex argentinus*) induced by gamma radiation. (2010). Tomac, A. & Yeannes, M.I. Actas del AIC 2010 Interim Meeting of the International Color Association - “Color and Food: From the Farm to the Table” - 12/15 Octubre 2010 – Mar del Plata. *Trabajo completo*

Irradiación gamma en anillas de calamar (*Illex argentinus*) envasadas al vacío. (2009). Tomac, A. & Yeannes, M.I. Actas del XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos – AATA – 7/9 Octubre 2009 – Concordia. *Trabajo completo*

Características físico químicas y microbiológicas de filetes marinados de anchoita (*Engraulis anchoita*) envasados al vacío y almacenados a 5 °C. (2009). Tomac, A. & Yeannes, M.I. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos – 15/17 de Abril 2009 – Córdoba.

RESUMEN

En esta tesis se estudió la factibilidad de aplicar la irradiación gamma con el propósito de extender la vida comercial de dos productos pesqueros.

Se trabajó con dos productos que difieren en sus características en cuanto a la composición, preservación y tiempo de vida comercial, siendo los mismos anillas de calamar (*Illex argentinus*) y filetes marinados de anchoíta (*Engraulis anchoita*). Ambos productos son procesados en las industrias pesqueras de Mar del Plata, ya que esta ciudad se caracteriza por su vasta actividad portuaria e industrial afín, y es el lugar donde fue desarrollado este trabajo de tesis, con el objetivo de transferir a la industria los conocimientos aportados por el mismo.

En las distintas experiencias llevadas a cabo con anillas de calamar y marinados de anchoíta se aplicó la irradiación gamma mediante una fuente de Cobalto-60, en la planta de irradiación semi-industrial del Centro Atómico Ezeiza (CNEA). A su vez, se analizó el efecto de diferentes dosis de irradiación gamma sobre las características microbiológicas, fisicoquímicas y la aceptabilidad sensorial de ambos productos, durante su almacenamiento en refrigeración.

En el **Capítulo 1** se hace una Introducción a los aspectos generales involucrados en el desarrollo de este trabajo y se describen los objetivos del mismo.

En el **Capítulo 2** se presenta una Revisión Bibliográfica donde se detallan aspectos particulares de la irradiación de alimentos, desde el efecto de la misma sobre microorganismos y componentes del alimento, hasta la situación actual de la irradiación de alimentos en el mundo y en particular en Argentina. También se profundiza sobre las características de las especies pesqueras en general, y en particular sobre *Illex argentinus* y *Engraulis anchoita*, y se describen las características de los productos que fueron analizados en este trabajo, elaborados a partir de estas especies.

En el **Capítulo 3** se describen las materias primas utilizadas y la metodología de análisis empleada.

Las distintas experiencias llevadas a cabo con las anillas de calamar se detallan en el **Capítulo 4**, donde se describen las irradiaciones preliminar, definitiva, así como la irradiación comercial de anillas de calamar pretratadas con poli-fosfatos. Allí también se

detalla la aplicación de modelos matemáticos para predecir el comportamiento de las bacterias psicrótrofas y de las bases nitrogenadas volátiles durante el almacenamiento en refrigeración de anillas de calamar tratadas con irradiación gamma.

En el **Capítulo 5** se describen las experiencias de irradiación realizadas con filetes de anchoíta marinados, en las que se trabajó con partidas de marinados elaborados con soluciones de marinación con diferentes concentraciones de ácido acético.

En el **Capítulo 6** se detallan las conclusiones generales de este trabajo.

Se aplicó la irradiación gamma a dos productos pesqueros que se caracterizan por presentar diferencias notorias entre sí: un producto a partir de un molusco fresco y un marinado a partir de un pescado graso.

Los resultados de las experiencias aquí descritas permitieron concluir que fue factible aplicar la irradiación gamma en ambos productos pesqueros, con resultados satisfactorios en cuanto al mejoramiento de la calidad sanitaria y a la extensión de la vida comercial, en el caso de las anillas de calamar, sin que se viera afectada negativamente la aceptabilidad sensorial de los productos así desarrollados.

ÍNDICE

Publicaciones.....	iv
Resumen.....	vi
Índice.....	viii

Capítulo 1

1.1 Introducción.....	2
1.2 Objetivos.....	5

Capítulo 2

Revisión bibliográfica

2.1 Irradiación de Alimentos.....	7
2.1.1 Introducción y aplicaciones.....	7
2.1.2 Fuentes de radiación ionizante.....	11
2.1.3 Efecto de las radiaciones ionizantes.....	12
2.1.4 Efecto sobre microorganismos.....	14
2.1.5 Efecto de la irradiación sobre las macromoléculas del alimento. Aspectos nutricionales del alimento irradiado.	16
2.1.6 Irradiación de alimentos: Historia y Legislación.....	19
2.1.7 Situación actual de irradiación de alimentos en el mundo y Argentina.....	20
2.1.8 Costos.....	26
2.1.9 Productos pesqueros.....	26
2.2 Características de las especies pesqueras.....	27
2.2.1 Composición.....	27
2.2.2 Calidad y deterioro de los productos pesqueros.....	30
2.2.2.1 Cambios post-mortem de los productos pesqueros.....	31
2.2.2.1.1 Cambios autolíticos.....	31
2.2.2.1.2 Cambios bacteriológicos.....	34
2.2.2.1.3 Cambios en la fracción lipídica: oxidación e hidrólisis.....	36
2.2.3 Métodos para determinar la calidad de los productos pesqueros.....	37
2.2.2.4 Conclusiones.....	40
2.3 Calamar <i>Illex argentinus</i>.....	40
2.4 Anchoíta <i>Engraulis anchoíta</i>.....	48
2.4.1 Marinados de anchoíta.....	51
2.5 Modelos matemáticos.....	53

Capítulo 3

Materiales y Metodología

3.1 Materias primas	57
3.3.1 Experiencias realizadas con anillas de calamar.....	57
3.3.2 Experiencias realizadas con filetes marinados de anchoíta.....	60
3.2 Metodología	
3.2.1 Aplicación de la irradiación gamma.....	62
3.2.2 Análisis del efecto de la radiación gamma sobre las características microbianas, fisicoquímicas y sensoriales del producto durante el almacenamiento en refrigeración.....	63
3.2.2.1 Análisis microbiológicos.....	63
3.2.2.2 Análisis fisicoquímicos.....	66
3.2.2.2.1 Determinación del pH.....	66
3.2.2.2.2 Determinación de la actividad de agua (a_w) y la acidez.....	66
3.2.2.2.3 Determinación del contenido de agua.....	67
3.2.2.2.4 Determinación del contenido de lípidos y del perfil de Ácidos Grasos.....	67
3.2.2.2.5 Determinación del Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT).....	68
3.2.2.2.6 Determinación de la oxidación de lípidos. Sustancias reactivas al ácido 2-Tiobarbitúrico.	69
3.2.2.2.7 Determinación instrumental del color.....	69
3.2.2.2.8 Análisis instrumental de la textura de marinados de anchoíta.....	70
3.2.2.3 Análisis sensorial.....	70
3.2.2.3.1 Aceptabilidad sensorial.....	71
3.2.2.3.2 Determinación sensorial de la textura de marinados de anchoíta mediante análisis descriptivo.....	73
3.2.3 Análisis estadístico de datos. Correlaciones.....	74
3.2.4 Ajuste de modelos matemáticos.	75
3.2.4.1 Modelado de la inactivación de la flora psicrótofa inducida por la irradiación gamma. Determinación del valor D_{10}	75
3.2.4.2 Modelado del crecimiento de la flora psicrótofa durante la refrigeración. Predicciones de la vida útil y validación del modelo.....	75
3.2.4.3 Modelado de la producción de NBVT en anillas de calamar irradiadas, durante el almacenamiento en refrigeración.....	78

Capítulo 4.

Anillas de calamar preservadas con irradiación gamma	80
4.1 Irradiación preliminar de anillas de calamar sin piel.....	81
4.1.1 Tratamiento de la materia prima y metodología utilizada.....	81
4.1.2 Resultados y discusión.....	82
4.1.3 Conclusiones parciales.....	100
4.2 Irradiación definitiva de anillas de calamar sin piel.....	103
4.2.1 Tratamiento de la materia prima y metodología utilizada.....	103
4.2.2 Resultados y discusión.....	104
4.2.3 Conclusiones parciales.....	119
4.3 Irradiación comercial de anillas de calamar tratadas con poli-fosfatos.....	121
4.3.1 Tratamiento de la materia prima y metodología utilizada.....	122
4.3.2 Resultados y discusión.....	122
4.3.3 Conclusiones parciales.....	134
4.4 Modelado de la inactivación y crecimiento de bacterias psicrotófas en anillas de calamar preservadas con irradiación gamma.....	135
4.4.3 Cnclusiones.....	147
4.5 Modelado de la producción de bases nitrogenadas volátiles durante el almacenamiento de anillas de calamar en función de la dosis de irradiación.	149
4.5.3 Conclusiones.....	155
4.6 Conclusiones del Capítulo 4.....	157

Capítulo 5

Marinados de anchoíta tratados con irradiación gamma.....	160
5.1 Irradiación de marinados de anchoíta con elaborados con solución acuosa con 7 % de ácido acético.....	161
5.1.1 Tratamiento de la materia prima y metodología utilizada.....	161
5.1.2 Resultados.....	163
5.1.3 Conclusiones parciales.....	178
5.2 Irradiación de marinados de anchoíta elaborados con solución acuosa con 3 % de ácido acético.....	180
5.2.1 Tratamiento de la materia prima y metodología utilizada.....	180
5.2.2 Resultados y discusión.....	181
5.2.3 Conclusiones parciales.....	197
5.3 Conclusiones del Capítulo 5.....	199

Capítulo 6

6. CONCLUSIONES GENERALES.....202

BIBLIOGRAFÍA.....207

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

Los productos de la pesca son altamente perecederos en comparación con otros alimentos de origen animal, es por ello que a lo largo de la historia se han desarrollado métodos de preservación que permiten extender la vida útil de los mismos. La aplicación de bajas y altas temperaturas, la adición de sales, ácidos orgánicos y sustancias antimicrobianas, el envasado con atmósferas modificadas, la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje, altas presiones hidrostáticas y radiaciones ionizantes, entre otros, han sido utilizados para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos y retrasar o eliminar la actividad de microorganismos deteriorantes directamente involucrados con la vida útil.

La irradiación de alimentos es uno de los métodos de preservación que se ha estudiado de forma más extensa y estricta y ha probado ser una tecnología eficiente para disminuir recuentos microbianos y extender la vida útil de los alimentos (Josephson, 1983; Kodo, 1990; Kilcast, 1995; Pigott et al., 1990; Satin, 1997; Sommers et al., 2006; Urbain, 1986). Cuando un alimento se somete a la acción de las radiaciones ionizantes, la cantidad de energía absorbida por unidad de masa se define como dosis y su unidad es el Gray (Gy). Un Gy equivale a un Joule por kilogramo de alimento.

La radiación ionizante inactiva los microorganismos mediante dos mecanismos: por acción directa, cuando un rayo o partícula ionizante afecta el ADN de los microorganismos vivos y otros constituyentes celulares; e indirecta, cuando los productos de radiólisis, generalmente del agua, afectan la célula (Goldbith, 1971; Moseley, 1989). De esta forma se pueden inducir cambios en las sustancias que componen los alimentos tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y vitaminas. Sin embargo, las pérdidas nutricionales no son significativas al aplicarse dosis de radiación apropiadas para cada alimento (ADA Report, 1995; Giroux & Lacroix, 1998; ICGFI, 1999; Josephson et al., 1978; Kilcast, 1995). Además, el proceso de irradiación sólo aumenta pocos grados la temperatura del alimento, y esto sólo en el caso de emplear altas dosis de radiación (>10 kGy), evitando así las pérdidas de nutrientes por degradación térmica (Kilcast, 1995).

La aptitud nutricional y la inocuidad toxicológica de los alimentos irradiados han sido estudiadas y analizadas en profundidad durante más de 60 años y toda la evidencia científica confirma su seguridad. Organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), la Asociación Médica Norteamericana (AMA), la Asociación de Dietistas Norteamericana (ADA) y la Organización para la Agricultura y la Alimentación

de Naciones Unidas (FAO) han aprobado la irradiación como una técnica segura e inocua para el consumidor (Diehl, 2002; OMS, 1994, 1999).

Distintos objetivos tecnológicos pueden alcanzarse con la irradiación según la dosis que se aplique. Las dosis bajas (hasta 1 kGy) se utilizan para evitar enfermedades producidas por parásitos, inhibir el desarrollo de brotes en bulbos, tubérculos y raíces, y retardar la maduración o el envejecimiento de algunos productos frutihortícolas. Las dosis medias (1 - 10 kGy) permiten reducir la carga de microorganismos deteriorantes y eliminar microorganismos patógenos no esporulados (Farkas, 2006). La dosis altas (>10 kGy) se aplican para esterilizar alimentos. La irradiación permitiría entonces reducir la incidencia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), lo cual lleva una disminución de los gastos relacionados con la salud pública (Molins, 2001), así como disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por las mermas debidas al deterioro.

En pescado se han aplicado dosis de 1 a 3 kGy y en mariscos de 2 a 7 kGy para reducir recuentos microbianos (Kilcast, 1995). La radiación gamma permitió extender la vida útil de caballa (*Scomber scombrus*) envasada al vacío (Slavin et al., 1966); besugo *Sparus aurata* (Chouliara et al., 2004); merluza *Merluccius hubbsi* (Lescano et al., 1989); róbalo *Dicentrarchus labrax* (Ozden et al., 2007); anchoas *Stolephorus commersonii* enteras (Lakshmann et al., 1999); pez plata (*Argentina silus*) (Carver et al., 1969); camarones *Penaeus indicus* (Kannat et al., 2006) y calamar *Todarodes pacificus* salado y fermentado (Byun et al., 2000), entre otros. Sin embargo, no hay hasta el momento estudios para incrementar el tiempo de comercialización de calamar fresco mínimamente procesado, ni estudios que indiquen que se haya aplicado irradiación en la especie *Illex argentinus*.

El calamar *Illex argentinus* es la segunda pesquería en importancia en cuanto a volumen de capturas del Océano Atlántico Sudoccidental, luego de la merluza. En el año 2008, sus capturas superaron las 255 000 toneladas (MINAGRI, 2008). Existen varios productos a partir del calamar fresco, como tubo con o sin piel, tentáculos, aletas y anillas, así como conservas (que abastecen fundamentalmente mercado interno) y congelados (para abastecer principalmente el mercado externo). Las anillas se consumen generalmente rebozadas y fritas, y son conocidas en el país con el nombre de rabas.

En cuanto a la anchoíta *Engraulis anchoíta*, es una de las especies pesqueras más abundantes de la zona pesquera del Océano Atlántico Sudoccidental y se encuentra subexplotada. La *Engraulis anchoíta* es un pelágico pequeño cuya abundancia anual estimada varía entre 600 000 y 4.5 millones de toneladas. La pesca ocurre

predominantemente entre los meses de Julio y Noviembre. Las capturas en el 2006 fueron de alrededor de 30 000 toneladas en Argentina (Madureira et al., 2009), siendo las capturas promedio entre los años 2006 y 2011 superiores a las 26 000 toneladas (MINAGRI, 2012). A partir de la anchoíta se elabora la conserva tipo sardina, la anchoíta salada madurada, los filetes en aceite y también marinados. Los marinados son preserves de anchoíta que se comenzaron elaborando fundamentalmente para el mercado local y actualmente tienen un alto nivel de exportación.

En esta tesis se propone aplicar la irradiación gamma a fin de preservar productos de calamar *Illex argentinus* (anillas sin piel) y de anchoíta *Engraulis anchoíta* (filetes marinados en soluciones de ácido acético y sal). La utilización de productos que ya presentan otras barreras preservativas permitiría aplicar la irradiación gamma en dosis menores, que contribuyan a la estabilidad de los productos y a la extensión de su vida comercial, procurando que las modificaciones de los atributos sensoriales y nutricionales sean mínimas.

A fin de estudiar el efecto de la irradiación gamma sobre los parámetros de calidad, se seleccionaron estos productos porque los mismos difieren notablemente entre sí, en sus características intrínsecas y en el tiempo de comercialización. Las anillas son un producto fresco de una especie de molusco, que presenta un tiempo limitado en refrigeración (usualmente menor a 8-10 días). Los marinados de anchoíta son un producto elaborado a partir de pescado graso que, debido al tratamiento de marinación, pueden llegar a una vida útil máxima de 6 meses en refrigeración.

La importante actividad portuaria de la ciudad de Mar del Plata se ve reflejada en parte en los volúmenes de desembarcos de calamar *Illex argentinus* y anchoíta *Engraulis anchoíta*, los cuales representan el 51% y el 99% del total del país, respectivamente (promedio 2006-2011, MINAGRI, 2012). Estas cifras ponen de manifiesto la importancia de estudiar la aplicación de nuevas tecnologías que le otorguen a la industria pesquera productos novedosos que presenten un mayor tiempo de comercialización favoreciendo además las posibilidades de exportación.

En este contexto, sumado al hecho que no existen a la fecha estudios sobre la aplicación de la irradiación gamma en estas especies pesqueras, se resalta el interés científico y tecnológico de estudiar la viabilidad de extender la vida útil de estos productos mediante la irradiación gamma.

1.2 OBJETIVOS

Esta tesis plantea analizar desde un abordaje multidisciplinario el efecto de la irradiación gamma sobre las características microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales, así como su influencia sobre el tiempo de comercialización, de productos pesqueros preservados o mínimamente procesados (filetes marinados de anchoíta y anillas de calamar, respectivamente), durante el almacenamiento en refrigeración (4-5 °C).

Con el fin de cumplimentar el presente trabajo de Tesis Doctoral se plantean los siguientes objetivos particulares:

- ▲ Analizar el efecto de la irradiación gamma sobre los microorganismos en anillas de calamar y marinados de anchoíta. Obtener modelos de inactivación microbiana en función de la dosis de irradiación.
- ▲ Evaluar el efecto de la irradiación en el comportamiento de la microflora durante el almacenamiento en refrigeración y su influencia sobre el tiempo de comercialización de los productos. Obtener modelos de comportamiento de la microflora durante el almacenamiento en refrigeración en relación con la dosis de irradiación.
- ▲ Analizar el efecto de la irradiación gamma sobre distintos parámetros fisicoquímicos, incluidos aquellos relacionados con la frescura, durante el almacenamiento a 4-5 °C de anillas de calamar y marinados de anchoíta. Relacionar índices fisicoquímicos con resultados microbiológicos.
- ▲ Estudiar el efecto de la irradiación gamma sobre la estabilidad oxidativa de los lípidos de marinados de anchoíta durante el almacenamiento en refrigeración.
- ▲ Evaluar mediante métodos instrumentales el color de las anillas de calamar y marinados de anchoíta tratados con irradiación gamma, durante el almacenamiento en refrigeración.
- ▲ Estudiar el efecto de la irradiación gamma sobre la aceptabilidad sensorial de los productos irradiados.

- ▲ Estudiar el efecto de la irradiación gamma sobre la textura de marinados de anchoíta mediante métodos instrumentales y sensoriales y correlacionar los resultados de los mismos.

- ▲ Analizar la factibilidad técnica de obtener mediante la irradiación gamma, nuevos productos pesqueros que sean sensorialmente aceptables y presenten un tiempo de comercialización mayor al de aquellos actualmente existentes.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Irradiación de Alimentos

Calamar *Illex argentinus*

Anchoíta *Engraulis anchoita*

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Irradiación de alimentos

2.1.1 Introducción y aplicaciones

La irradiación de alimentos es un método físico de conservación que consiste en exponer el producto a la acción de radiaciones ionizantes durante un cierto período de tiempo. El tiempo de exposición es proporcional a la cantidad de energía que se desee que absorba el alimento. La cantidad de energía absorbida por unidad de masa se define como dosis y su unidad es el Gray (Gy), que equivale a Joule por kilogramo.

La preservación de alimentos mediante radiaciones ionizantes quizá sea la tecnología que ha sido más minuciosamente estudiada en cuanto a su seguridad toxicológica a lo largo de la historia. Durante más de 50 años se han llevado a cabo diversos estudios, cuya evidencia científica respalda la aptitud nutricional, la inocuidad toxicológica y la seguridad microbiológica de los alimentos tratados con radiaciones ionizantes (Diehl, 2002; Sommers et al., 2006; WHO, 1994, 1999). La inocuidad de los alimentos irradiados ha sido garantizada, entre otros, por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA), el Codex Alimentarius, la Asociación Médica Americana (AMA), la Asociación de Dietistas Americanos (ADA), así como la Academia Nacional de Medicina de Argentina (Narvaiz, 2009). La irradiación de alimentos ha demostrado ser una tecnología segura y eficiente para reducir las cargas microbianas e incrementar la vida útil de los alimentos (Josephson, 1983; Kilcast, 1995; Molins, 2001).

En este momento, 57 países han aprobado el tratamiento con irradiación de uno o más alimentos (Sommers et al., 2006). Sin embargo, su implementación industrial es aún incipiente, posiblemente debido a la falta de difusión del tema y a temores infundados que disminuyen la aceptación de esta tecnología. En Argentina en particular, la falta de armonización de las legislaciones nacionales es también una limitación (Narvaiz, 2009). Con respecto a lo anteriormente mencionado, los temores suelen estar relacionados con la confusión entre términos diferentes, como son la irradiación y la radioactividad. Es importante diferenciar siempre que un alimento irradiado no debe confundirse con uno radiactivo. En este último intervienen radioisótopos en su composición, es decir compuestos radiactivos. En cambio, un alimento irradiado es aquel que ha sido tratado con radiación ionizante. La irradiación no induce radiactividad en el alimento, más allá de la naturalmente presente causada por ^{14}C y ^{40}K . En el proceso de irradiación de alimentos

se utilizan más frecuentemente fuentes de Cobalto-60 (1,33 MeV (Megaelectrón-Volt)) y Cesio-137 (0,66 MeV), cuyas respectivas energías son demasiada bajas como para inducir radiactividad, algo que solamente sucede a energías superiores a los 16 MeV. Asimismo, de acuerdo a lo aprobado por la OMS la irradiación con electrones acelerados hasta 10 MeV y los rayos-x hasta 5 MeV tampoco la inducen (Barbosa-Cánovas et al., 1999; OMS, 1989).

Los principales objetivos de la irradiación de alimentos son controlar formas de vida indeseables, como bacterias, hongos, parásitos e insectos; interferir en procesos fisiológicos causantes de deterioro, y modificar propiedades tecnológicas (Molins, 2001).

Las aplicaciones de la irradiación en alimentos dependen de los objetivos que se deseen alcanzar y por lo tanto, de la dosis a utilizarse. Las mismas se presentan en la **Tabla 2.1**. En un rango creciente de dosis, la irradiación se puede aplicar para inhibir la brotación de bulbos, tubérculos y raíces; para esterilizar plagas de interés fitosanitario a fin de evitar su propagación a áreas libres en el comercio internacional; para esterilizar parásitos, como *Trichinella spiralis* en carne de cerdo, al interrumpir su ciclo vital e impedir la enfermedad en el hombre; para retrasar la maduración de frutas tropicales como mango, papaya y banana y la senescencia en frutas y algunas hortalizas; para prolongar el tiempo de comercialización de alimentos frescos por reducción de la contaminación microbiana total; para controlar microorganismos patógenos no esporulados que causan enfermedades al hombre; para modificar propiedades de interés tecnológico y para esterilizar alimentos (CNEA; 2011; Molins, 2001; Kilcast, 1995). La irradiación permite eliminar microorganismos patógenos que causan enfermedades transmitidas por alimentos, como la *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Vibrio* spp., entre otros, con las consecuentes reducciones en gastos para la salud pública (Borsa, 2006). Este aspecto es muy importante sobre todo cuando se trata de alimentar poblaciones más susceptibles, como niños y ancianos, así como pacientes comprometidos inmunológicamente (OIEA, 2009c). Una de las ventajas del proceso de irradiación es que el alimento puede irradiarse una vez envasado, evitando de esta manera posteriores contaminaciones.

Tabla 2.1. Aplicaciones de la irradiación de alimentos.

Aplicaciones	Alimento	Rango de dosis aproximado (kGy)
Dosis bajas (hasta 1 kGy)		
Inhibición de la brotación de bulbos, tubérculos y raíces	Papas, cebollas, ajo	0,05- 0,15
Esterilización de insectos	Frutas, granos	0,15- 0,5
Esterilización de parásitos	Carnes	0,3 – 1
Retraso de la maduración y de la senescencia	Frutas y vegetales, frutas tropicales, champiñones	0,2 – 0,5
Dosis media (1 – 10 kGy)		
Prolongación del tiempo de comercialización por reducción de la carga microbiana total (proceso similar a la pasteurización por calor, llamado radurización).	Carnes frescas, pescado, frutas finas	2 – 4
Eliminación de microorganismos patógenos no esporulados (excepto virus), causantes de enfermedades al hombre (radicidación).	Pollo, huevo, carne, hortalizas, mariscos	1 – 7
Dosis altas (10 – 50 kGy)		
Esterilización de alimentos al aplicar un tratamiento capaz de conservarlos sin desarrollo microbiano, a temperatura ambiente durante años (proceso semejante a la esterilización comercial, denominado radapertización).	Carne, comidas estériles	25 – 50

Fuente: CNEA, 2011; Kilcast, 1995; OMS; 1988.

Dentro de los métodos de preservación desarrollados, la mayoría no se pueden aplicar a la totalidad de los alimentos y la irradiación no es una excepción. Los alimentos líquidos son muy sensibles a las modificaciones de sus características sensoriales por la irradiación, ya que el alto contenido de agua favorece las reacciones químicas producidas por el efecto indirecto de las radiaciones, lo cual puede generar cambios en el sabor, aroma y color. Los alimentos con un alto porcentaje de lípidos y en atmósfera con contenido normal de oxígeno dentro del envase, también son sensibles a las radiaciones, dado que los ácidos grasos insaturados reaccionan preferentemente con radicales oxhidrilo pudiendo producir rancidez y algunas pérdidas nutricionales (Barbosa-Cánovas et al., 1999; Narvaiz, 2009). Sin embargo, existen métodos para minimizar el efecto de las radiaciones, como la irradiación a bajas temperaturas, la exclusión de oxígeno del envase y el uso de aditivos, como aceptores de radicales libres.

Por otra parte, la irradiación puede ser una alternativa al uso de sustancias químicas de toxicidad sospechada, tales como fumigantes, algunos antimicrobianos (nitrito de sodio en carnes) e inhibidores de brotación (hidrazida maleica). El bromuro de metilo se emplea para fumigar productos frutihortícolas con fines fitosanitarios, pero su

uso está en vías de ser prohibido por ser un depresor de la capa de ozono. La irradiación tiene además otras ventajas sobre el uso de los fumigantes como una mayor penetración y es un tratamiento más rápido que no requiere aireación posterior (Barbosa-Cánovas, 1999; Narvaiz, 2009).

Todos los métodos de preservación de alimentos tales como el calentamiento, la congelación, el agregado de productos químicos y la irradiación no están destinados a sustituir las buenas prácticas de manufactura e higiene. Ni la irradiación ni ningún otro método pueden invertir el proceso de descomposición y hacer que un alimento deteriorado sea comestible (Barbosa-Cánovas, 1999; Narvaiz, 2009).

Con respecto a los envases utilizados en alimentos irradiados, los resultados de amplias investigaciones demuestran que casi todos los materiales de envases de alimentos que se utilizan comúnmente son adecuados para la irradiación (CNEA, 2011). A su vez, los envases de polietileno y de poliamida (nylon-6) han sido aprobados por la FDA para ser utilizados en alimentos que se tratarán con irradiación hasta dosis de 60 kGy (FDA, 2001).

2.1.2 Fuentes de radiación ionizante

Existen tres fuentes de radiaciones ionizantes que se utilizan en plantas de procesamiento de irradiación comerciales.

Las plantas de irradiación gamma utilizan una fuente radiactiva, usualmente el Cobalto-60. La característica principal de la irradiación gamma es que tiene una alta penetración en el material a irradiar, lo que facilita su aplicación a grandes cantidades (pallets). El Cesio-137 es menos utilizado (Kilcast, 1995).

Otra fuente de irradiación son los electrones acelerados generados por máquinas. Tienen como desventaja una menor penetración, de hasta 8 cm en alimentos irradiados con dosis de 10 MeV. Su principal ventaja es que el equipo puede ser apagado cuando no se utiliza, pudiéndose integrar a operaciones de procesamiento de alimentos (Barbosa-Cánovas et al., 1999).

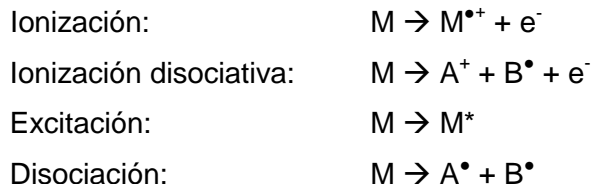
Una tercera fuente de radiación emplea rayos-X, generados por el bombardeo de electrones a un blanco metálico. Sin embargo, se utiliza poco por la baja eficiencia de conversión de electrones a rayos-X (Kilcast, 1995; Wilkinson & Gould, 1998).

A nivel internacional, aproximadamente el 90% de las instalaciones para irradiar alimentos comercialmente corresponden a plantas gamma de Cobalto-60, mientras que el 10% restante a aceleradores de electrones (CNEA, 2011).

2.1.3 Efecto de las radiaciones ionizantes

La radiación ionizante tiene energía suficientemente alta como para extraer electrones de las órbitas atómicas. Como se mencionó, los rayos gamma emitidos por radio nucleidos, los rayos-X y los electrones acelerados son formas de radiación ionizante (Wilkinson & Gould, 1998).

Cuando las radiaciones ionizantes actúan sobre la materia producen dos efectos básicos. El efecto primario, también llamado “directo”, causa la formación de iones, moléculas excitadas o rupturas moleculares. Estas últimas pueden generar radicales libres. Los radicales libres son partes de moléculas, grupos de átomos ó átomos altamente reactivos, ya que tienen un electrón no apareado en su orbital más externo. Por este motivo tienden a reaccionar con otros radicales libres o moléculas para alcanzar la estabilidad al aparear sus electrones impares (Potter & Hotchkings, 1995). A continuación se muestran las posibles reacciones producto del efecto primario de la irradiación (Molins, 2001; Narvaiz, 2008), donde M representa a una molécula y M• a un radical libre:

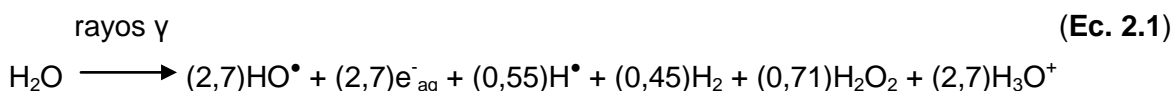


En el efecto *directo*, es una partícula o rayo ionizante lo que afecta al objetivo sensible a la irradiación, como puede ser el ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células microbianas. El efecto indirecto ocurre mientras el alimento está siendo irradiado. El mismo no es influenciado por la presión, temperatura, presencia de oxígeno, entre otros factores ambientales; es independiente de la composición del alimento y es la causa predominante de inactivación microbiana en alimentos irradiados (Goldblith, 1971).

El efecto secundario, también llamado *indirecto*, involucra la interacción de los productos del proceso primario y puede conducir a la formación de compuestos diferentes de los presentes en forma inicial. Para que la interacción suceda, los productos primarios tienen que entrar en contacto, lo cual requiere tiempo y ausencia de impedimentos (Josephson, 1983). El efecto secundario tiene lugar durante el almacenamiento posterior a la irradiación. En los alimentos y los organismos vivos el agua es el componente mayoritario y por lo tanto, la ionización ocurre en dicha molécula, produciéndose la

radiólisis del agua (Farkas, 2005). De esta manera, cuanto más alto sea el contenido acuoso del alimento, mayor será la intensidad del efecto indirecto ya que la movilidad de las sustancias será superior y con ello la reactividad química.

A partir de la ionización del agua se forman los radicales hidroxilo (HO^\bullet) e hidrógeno (H^\bullet), altamente reactivos, que por recombinación entre ellos o con otros iones o moléculas (como oxígeno) dan lugar a otras especies reactivas como el radical hidropéroxilo (HO_2^\bullet), siendo los únicos productos finales estables el hidrógeno (H_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estos mecanismos son los responsables de las modificaciones que ocurren en los microorganismos, enzimas y otros constituyentes de los alimentos debido al tratamiento de irradiación (Farkas, 1998, 2005; Kilcast, 1995; Potter & Hotchkings, 1995). La siguiente ecuación (**Ecuación 2.1**) muestra de manera simplificada los complejos mecanismos de la radiólisis del agua:



Siendo e^-_{aq} un electrón transportado por una molécula de agua, y H_3O^+ el ión hidronio (Molins, 2001).

Los productos finales estables de la radiólisis del agua (H_2 y H_2O_2) son parcialmente consumidos en las siguientes reacciones con radicales libres producidos por la irradiación (**Ec. 2.2**) (Molins, 2001):



En el efecto indirecto los microorganismos y constituyentes del alimento son principalmente afectados por los productos de radiólisis (radicales hidrógeno e hidroxilo, peróxido de hidrógeno, etc.) (Goldblith, 1971; Josephson, 1983). En este caso, el efecto está muy influenciado por los constituyentes del alimento. En particular, las proteínas, lípidos y otros componentes, reaccionan con los radicales libres producidos por radiólisis, provocando un efecto protector sobre los microorganismos frente al efecto indirecto. Un efecto protector similar es proporcionado a moléculas pequeñas como vitaminas y enzimas (Goldblith, 1971).

Existen en la literatura numerosos ejemplos de la acción de las radiaciones ionizantes sobre sistemas modelo, como soluciones acuosas de sustancias aisladas, o

mezclas de sustancias. Los efectos descritos en tales condiciones son mucho más intensos que los observados en sistemas complejos, como matrices alimentarias, en donde todas las sustancias presentes compiten por la absorción de energía y por lo tanto no deberían tomarse como representativos de los posibles cambios en los alimentos (Narvaiz, 2009).

2.1.4 Efecto sobre los microorganismos

La radiación ionizante inactiva microorganismos al producir cambios en las células microbianas, mediante los dos efectos anteriormente descritos.

Cuando el alimento se expone a radiaciones ionizantes la principal ocurrencia de daño en la célula del microorganismo se da en la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) que se está replicando (Grecz et al., 1983; Moseley, 1989). La molécula de ADN es una hélice doble cuya estructura está estabilizada por uniones electrostáticas tipo puente hidrógeno. Los daños pueden darse en los componentes de la hélice (bases) o en toda su estructura. Cuando toda la estructura del ADN es dañada se debe principalmente a que por el gran tamaño de la molécula la probabilidad de impacto es mayor y a que las uniones puente hidrógeno intercatenarias responsables de su estabilidad se rompen con energías relativamente bajas (Grecz et al., 1983; OIEA, 1982).

En el efecto directo, la lesión en el ADN puede ser una rotura en una sola hebra del ADN, o bien, si la orientación de la molécula de ADN es adecuada, se pueden romper ambas hebras. Las lesiones de una sola hebra pueden no ser letales. Sin embargo, una gran cantidad de lesiones de una sola hebra puede exceder la capacidad de reparación de las bacterias, lo que termina resultando en la muerte celular. Una rotura doble de cadena ocurre cuando un electrón o fotón colisionan áreas adyacentes o ambas hebras de la cadena de ADN. Esto corta la cadena del ADN en dos partes, siendo estas lesiones en general irreversiblemente letales. Sin embargo, dado que se necesita una orientación especial de la molécula de ADN para que ocurra un corte doble de las hebras, este ocurre con una frecuencia mucho menor que las roturas de hebra simples (Grecz et al., 1983; Molins, 2001).

Las interacciones de la radiación con las moléculas adyacentes al material genético son más complejas. La química de la irradiación del agua es bien conocida y como se mencionó anteriormente, los productos reactivos de la radiólisis del agua más importantes son el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno. Estas moléculas reaccionan con los ácidos nucleicos y los enlaces químicos que unen dos ácidos en una hebra simple, así como con los enlaces que unen un par base adyacente en la hebra apuesta. Dado que la localización de la ionización en la molécula de agua es al azar, las

reacciones subsecuentes con los ácidos nucleicos también lo son. El efecto indirecto también puede producir roturas de la cadena de ADN de simple o doble hebra (Molins, 2001). El radical hidroxilo (OH[·]) puede reaccionar con la estructura azúcar-fosfato de la columna de la cadena de ADN causando el corte del enlace éster fosfato y la aparición de roturas en cadenas simples (Moseley, 1989). Sin embargo, dado que la energía requerida es menor para romper un enlace puente de hidrógeno en comparación con un enlace covalente de la cadena principal, el radical hidroxilo puede llevarse el átomo de hidrógeno de una de las muchas uniones puente de hidrógeno intercatenarias (Grecz et al., 1983; OIAE, 1982).

Además del daño que la radiación produce en el material genético, puede provocar diversos efectos en los otros constituyentes celulares. La aplicación de la radiación en la célula resulta en la interacción directa e indirecta con los componentes celulares como las membranas, enzimas y plásmidos. Estas interacciones pueden tener un efecto letal en las células, sin embargo en general esto no sucede si no existe también daño en el material genético. Estas interacciones pueden afectar la supervivencia de las bacterias dañadas sub-letalmente, o bien complicar o impedir la supervivencia de la célula dañada (Dickson, 2001; Grecz et al., 1983).

Existen tres grupos principales de factores que afectan la resistencia microbiana a la irradiación: Parámetros de proceso, características de los microorganismos y parámetros del producto (Grecz et al., 1983; Mañas & Pagán, 2005).

Los parámetros del proceso de irradiación están definidos por la intensidad del tratamiento, la cual depende directamente de la dosis de irradiación absorbida (van Gerwen et al., 1999). La temperatura del producto durante el proceso de irradiación también influencia la letalidad microbiana. A mayor temperatura, mayor es la letalidad de los microorganismos.

A su vez, los diferentes grupos microbianos se caracterizan por tener distinta resistencia a la irradiación, la cual sigue el siguiente orden decreciente: Virus > Esporas > Mohos y levaduras > Bacterias Gram positivas > Bacterias Gram negativas.

De acuerdo a este ordenamiento, las bacterias Gram negativas, que corresponden a la flora deteriorante típica de los productos pesqueros, se encuentran entre las bacterias menos resistentes a la irradiación.

Entre los parámetros del producto, la sensibilidad a la irradiación se ve principalmente influenciada por la matriz alimentaria y por la atmósfera en la que el alimento es irradiado. La presencia de oxígeno promueve la formación de radicales libres y de sustancias oxidantes como peróxidos e hidroperóxidos, aumentando el efecto letal de la irradiación. A su vez, una disminución en la actividad de agua implicaría un

incremento en la supervivencia bacteriana luego del tratamiento de irradiación, al disminuir la contribución del efecto indirecto de las radiaciones. A menor cantidad de agua se reduce la movilidad de las moléculas y es menor la posibilidad de que puedan reaccionar. Tanto los microorganismos como el alimento se ven protegidos por la menor reactividad química (Barbosa-Cánovas et al., 1999; Josephson, 1983; van Gerwen et al., 1999). Por otra parte, el pH del alimento parecería afectar muy poco la letalidad microbiana debida a la irradiación (Buchanan et al., 2004).

2.1.5 Efecto de la irradiación sobre las macromoléculas del alimento. Aspectos nutricionales del alimento irradiado.

La aptitud nutricional de los alimentos irradiados ha sido estudiada con profundidad por distintos organismos internacionales (OMS, IOEA, FDA, FAO, etc.) a fin de asegurar la misma.

La aplicación de la irradiación puede inducir modificaciones en las proteínas, lípidos, carbohidratos y vitaminas de los alimentos, debido principalmente a la acción de los radicales libres, producto de la radiólisis de agua. Sin embargo, no se han reportado pérdidas significativas de la calidad nutricional de los constituyentes de lípidos, proteínas y carbohidratos a dosis adecuadas para la preservación de alimentos (≤ 10 kGy) (ADA Report, 1995; Giroux & Lacroix, 1998; ICGFI, 1999; Josephson et al., 1978).

Con respecto a los macronutrientes de los alimentos, se ha observado que las alteraciones producidas en los mismos por el tratamiento de irradiación son mínimas. En los micronutrientes, se han observado pérdidas leves de algunas vitaminas, dependiendo de su composición química y de ácidos grasos esenciales, que resultan comparables e incluso menores a las halladas cuando se utilizan otros métodos de preservación, como el calor. Se estima que solamente 6 de cada millón de uniones químicas covalentes se rompen por cada kGy absorbido (Narvaiz, 2012).

En los lípidos, la irradiación puede provocar la ruptura de la unión éster de los triglicéridos con la consecuente liberación de ácidos grasos, así como la peroxidación de ácidos grasos, siendo los ácidos grasos insaturados más sensibles a la irradiación debido a la presencia de dobles enlaces en su estructura, donde el déficit de electrones hace que sean más susceptibles a la reacción con los radicales hidroxilo formados por la irradiación (Thakur & Singh, 1994). Son varios los factores que determinan el efecto de la irradiación sobre los lípidos, como la composición (grado de insaturación y conjugación de dobles ligaduras de los ácidos grasos), la presencia de sustancias antioxidantes naturales, el estado físico de los lípidos, etc. (Molins, 2001). Es sabido que a mayor grado

de insaturación de los ácidos grasos, mayor es la susceptibilidad a la oxidación, resultando los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) más sensibles debido tanto al mayor número de sitios de ataque radiolítico como a la mayor estabilidad energética de la molécula debida a la deslocalización y resonancia electrónicas. Los lípidos de las especies pesqueras se caracterizan por presentar una importante proporción de AGPI en su composición (Huss, 1999). Sin embargo se ha comprobado que existen formas de minimizar el efecto de la irradiación sobre los lípidos. Por ejemplo, la ausencia de oxígeno en la atmósfera que rodea al alimento durante el proceso y el almacenamiento puede minimizar este efecto (Brewer, 2009), tal como fue observado por Kim et al. (2002) en carnes crudas de ternera, pavo y cerdo irradiadas con electrones acelerados. Asimismo, Erkan y Özden (2007) analizaron diversos estudios sobre el efecto de la irradiación gamma en la composición de ácidos grasos de diferentes especies de pescados. A partir de dicha revisión concluyeron que la irradiación sólo tiene efectos marginales en los lípidos de los productos pesqueros, incluyendo el ácido graso esencial alfa-linolénico. Tampoco se hallaron cambios significativos en los AGPI omega 3 debido a dosis de irradiación (hasta 6 kGy) en camarones congelados ni se vio comprometida negativamente la composición de ácidos grasos y estabilidad de la fracción lipídica (Abreu et al., 2010).

Las radiaciones ionizantes pueden producir modificaciones en las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas, las cuales están relacionadas con la orientación tridimensional y la disposición espacial de las mismas. Estas estructuras se caracterizan por estar unidas mediante uniones físicas débiles en comparación con las químicas covalentes, tipo Van der Waals o puente de hidrógeno, por lo tanto, la irradiación puede promover la desnaturalización proteica, reacciones de agregación así como la ruptura de enlaces. La ruptura y agregación proteica producidas por la irradiación estarían relacionadas con los cambios en las estructuras terciaria y cuaternarias, responsables de su configuración espacial, cuando sus grupos reactivos quedan expuestos a la acción de los productos radiolíticos del agua, como el electrón hidratado, y el radical hidroxilo (Urbain 1986). Sin embargo, el valor nutricional de las proteínas no se ve afectado por la irradiación ya que las estructuras secundaria (secuencia de aminoácidos) y primaria (tipo de aminoácidos) no resultan modificadas (Giroux & Lacroix, 1998; Josephson et al., 1978; Urbain, 1986). Por ejemplo, filetes de abadejo fueron irradiados a 53 kGy sin que se detectaran diferencias significativas en el contenido de aminoácidos (Venugopal et al., 1999).

Con respecto a las enzimas de los alimentos, estas son resistentes a la irradiación, tanto es así que es necesario aplicar un blanqueo previo a 70 °C para

inactivarlas en carnes esterilizadas por radiaciones a 45 kGy (Barbosa-Cánovas et al., 1999).

Para inactivar una enzima se debe destruir su sitio activo, no necesariamente el resto de la molécula. Teniendo en cuenta el efecto secundario de las radiaciones, cuanto mas agua tenga un alimento, mayor será el daño causado por la irradiación. Por ejemplo, en frutas la polifenoloxidasas de la cáscara de cítricos se activa provocando manchas marrones típicas del envejecimiento natural de estos alimentos (Narvaiz, 2012). En cambio las diastasas en miel suelen inactivarse parcialmente a dosis de 10 kGy, control de *Loque americana* (Narvaiz, 2012). Las enzimas que causan autólisis en alimentos de alto contenido proteico no son inactivadas por dosis de hasta 50 kGy. Por ejemplo, Hwang & Hau (1995) estudiaron la actividad residual de enzimas proteolíticas en pollo tratado con irradiación, que se consideran responsables del deterioro de la calidad de la carne. Analizaron las proteasas dependientes de Ca^{2+} (CDP) y la catepsina D. Los resultados indicaron que la actividad de la Catepsina D no era afectada por el tratamiento con irradiación hasta dosis de 50 kGy. La actividad de las CDP fue disminuida por esta dosis de irradiación, pero las enzimas no fueron inactivadas por completo. De acuerdo a Urbain (1986), las enzimas lipolíticas involucradas con la hidrólisis endógena de los fosfolípidos y lípidos neutrales no fueron inactivadas totalmente por la irradiación a 50 kGy.

La sensibilidad de las vitaminas a la irradiación depende de su estructura molecular, en particular su grado de insaturación y conjugación de dobles enlaces, su solubilidad en agua o grasa y de la complejidad de la matriz alimentaria que se irradie. Las vitaminas B1 (tiamina), C (ácido ascórbico), A (retinol) y E (alfa-tocoferol) son reconocidas por su sensibilidad a la irradiación; pudiéndose llegar a perder como máximo un 20 %, a dosis apropiadas para irradiar el alimento (Narvaiz & Ladomery, 1998). Sin embargo, la vitamina B1 es más sensible al tratamiento térmico que al de irradiación (ICGFI, 1999).

Los efectos de la irradiación en el valor nutricional de los alimentos son mínimos. Estas observaciones están sostenidas por los resultados de diversos estudios de alimentación que se realizaron para establecer la inocuidad de los alimentos irradiados (ICGFI, 1999).

2.1.6 Irradiación de alimentos: Historia y Legislación

Aunque la irradiación de alimentos es frecuentemente denominada como una nueva tecnología, la idea de utilizar radiaciones ionizantes para mejorar la calidad y la

vida útil de los alimentos surgió hacia finales del 1800. La historia de la irradiación de alimentos ha sido detallada con excelencia por Josephson (1983) y Diehl (1990).

Los avances en la irradiación de alimentos estuvieron muy ligados a los de la física de la radiación y al desarrollo de fuentes y sistemas para irradiar alimentos (1890-1940). Este período fue continuado por una etapa de investigación y desarrollo intensivos (1940-1970) que se solaparon con extensos estudios sobre la inocuidad nutricional, microbiológica y toxicológica de los alimentos tratados con irradiación durante la década del 70. A partir de 1970, la mayoría de los eventos relacionados con la irradiación de alimentos estuvieron relacionados con las regulaciones y legislaciones.

En el año 1970, 23 países organizaron el Proyecto Internacional en Irradiación de Alimentos (IFIP), con sede en el Centro de Investigaciones Nucleares de Karlsruhe, Alemania. Paralelamente, organizaciones pertenecientes a Naciones Unidas como la Organización para los Alimentos y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) constituyeron el Comité Conjunto de Expertos en Irradiación de Alimentos (JECFI). El objetivo de este comité era recopilar y evaluar la información existente sobre el tema y encarar nuevas investigaciones para esclarecer los puntos que necesitaran confirmación (Narvaiz, 2009). El JECFI en su conclusión final aseguró que la irradiación de cualquier alimento irradiado con dosis de hasta 10 kGy no presenta peligros para la salud del hombre. Esta dosis no constituye un límite, sino que se eligió porque la mayoría de las aplicaciones en irradiación de alimentos se desarrolla en este rango (OMS, 1989).

En el año 1999, luego de un episodio que causó la muerte de 5 niños y la enfermedad de alrededor de 700 personas debido al microorganismo patógeno *Escherichia coli* O157:H7, Estados Unidos aprobó la irradiación de carnes rojas (vaca, cordero, cerdo) fresca y congelada (FDA, 1999). En el año 2002 Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda aprobaron leyes que autorizan la irradiación de alimentos con fines cuarentenarios.

En Argentina, los aspectos generales de irradiación de alimentos están legislados por el artículo 174 del Código Alimentario Argentino (CAA, 1978). Asimismo, en otros artículos se autoriza la irradiación de papa, cebolla y ajo para inhibir la brotación; de frutillas para prolongar la vida útil; de champiñón y espárrago para retardar su envejecimiento y de especias, frutas y vegetales deshidratados, para reducir la contaminación microbiana.

En el año 1996, con la intención de armonizar con legislaciones más avanzadas, en particular la brasilera en el ámbito MERCOSUR, la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) solicitó a la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) que evaluara la aprobación de irradiación de ciertas clases de productos en el CAA. Estas clases eran carnes rojas, carne de cerdo, huevo desecado, pescados y productos pesqueros, granos y sus harinas y productos fruti-hortícolas con fines cuarentenarios. Hasta este momento, la CONAL no acepta esta propuesta y prefiere mantener las autorizaciones de irradiación por producto.

A mediados del 2003, a raíz del lamentable fallecimiento de niños por síndrome urémico hemolítico causado por hamburguesas contaminadas con *Escherichia coli* O157:H7 en Argentina, el Ministerio de Salud de la Nación solicitó a CONAL que evaluara la aprobación de carne picada irradiada. Aún no hay expedición al respecto (Narvaiz, 2009).

En el año 2003, el Instituto Argentino de Normatización y Certificación de Argentina (IRAM) aprobó la norma 20.301: *Buenas Prácticas de Procesamiento para la Irradiación de Alimentos destinados al Consumo Humano*, elaborada por el Subcomité *Irradiación de Alimentos*, creado en 2001. Esta norma fue propuesta por IRAM a la Organización Internacional de Normatización (ISO) en el año 2004; se creó un Grupo de Trabajo sobre irradiación de alimentos en ISO para tratar esta propuesta dentro del Comité Técnico 34: Alimentos y en el año 2012 fue publicada como norma ISO 14.470: *Irradiación de alimentos- Requisitos para el desarrollo, validación y control de rutina del proceso de irradiación ionizante empleado para el tratamiento de alimentos* (Narvaiz, 2012).

Asimismo, el Codex Alimentarius tiene dos normas en las que regula distintos aspectos de la irradiación de alimentos (Codex Alimentarius, 2003a; 2003b).

2.1.7 Situación actual de irradiación de alimentos en el mundo y Argentina

La irradiación comercial de alimentos se realiza en 32 países del mundo, con alrededor de 200 instalaciones de irradiación en operación. En la **Figura 2.1** se presentan coloreados con rosa los países que irradian alimentos.

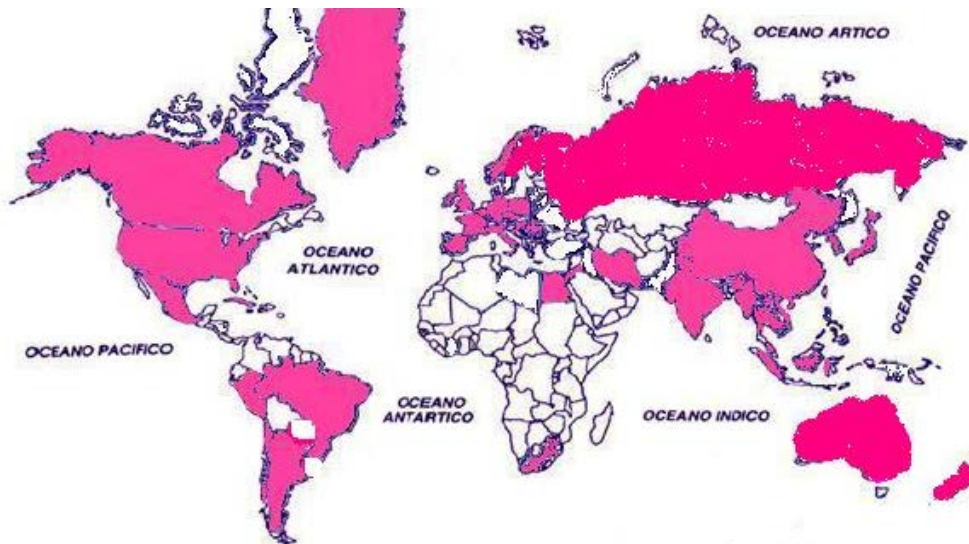


Figura 2.1. Países que irradian alimentos en la actualidad.

Los países que aplican la tecnología son, en orden aproximado de volúmenes decreciente: China, Estados Unidos, República de Sudáfrica, Holanda, Japón, Vietnam, Indonesia, Francia, Hungría, Bélgica, Corea, India, México, Canadá, Brasil, Croacia, Argentina, República Checa, Dinamarca, Polonia, Turquía, Egipto, Finlandia, Indonesia, Israel, Irán, Inglaterra, Noruega, Tailandia y Chile (Narvaiz, 2009; OIEA, 2009a).

Actualmente se comercializan en el mundo alrededor de 400.000 toneladas por año de alimentos irradiados, lo cual constituye aún un volumen incipiente. En la **Figura 2.2** se muestran las toneladas de alimentos irradiados en los distintos continentes, donde se observa que Asia y Oceanía son los mayores productores.

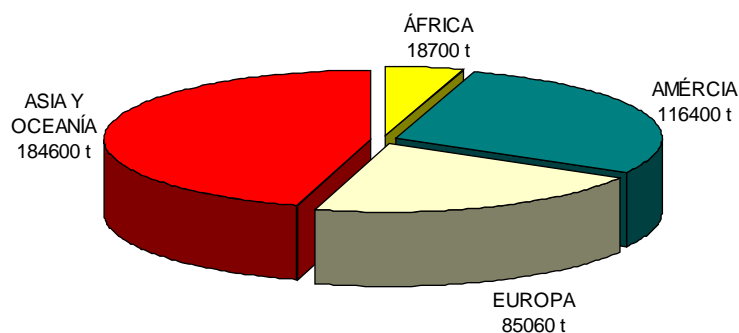


Figura 2.2. Distribución de los alimentos irradiados por continente (toneladas).
Fuente: Kume et al. (2009)

Las especias y alimentos deshidratados son los que se irradian con más frecuencia, como se puede observar en la **Figura 2.3**, donde se presentan los porcentajes de alimentos irradiados clasificados por rubros, durante el año 2005, a nivel mundial (Kume et al., 2009).

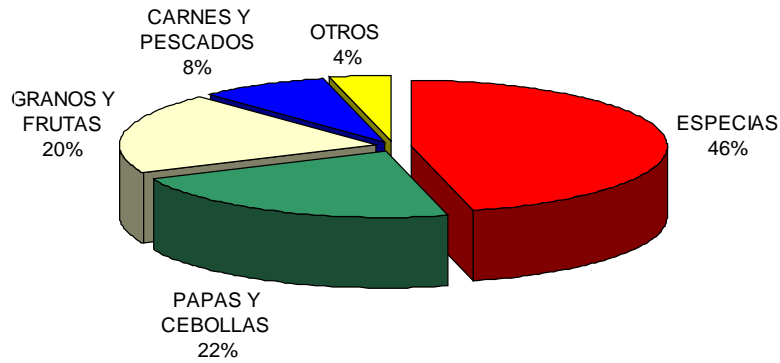


Figura 2.3. Porcentajes de clases de alimentos irradiados en el mundo.
Fuente: Kume et al. (2009)

La región asiática y Oceanía abarcan el mayor volumen de alimentos irradiados, con un total de 184.600 toneladas, siendo china el principal productor, con el 80% del total (Kume et al., 2009). En China hay 103 instalaciones gamma y 6 de electrones, que irradian especias, ajo, cebolla, papa, manzana, tomate, arroz, salsa china y aderezos, en volúmenes cercanos a las 146.000 toneladas por año (Kume et al., 2009). Los volúmenes de alimentos irradiados en el resto del continente asiático y Oceanía se muestran en la **Figura 2.4**.

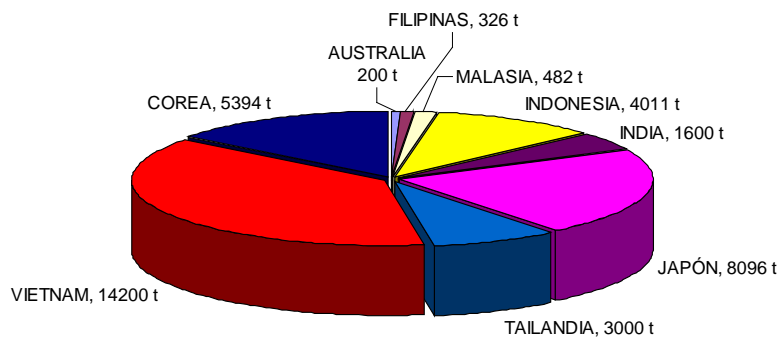


Figura 2.4. Toneladas de alimentos irradiados en Asia y Oceanía (sin incluir China).
Fuente: Kume et al. (2009)

En India el número de instalaciones gamma para alimentos creció últimamente de 6 a 9. Allí se procesan unas 1.500 toneladas de especias y vegetales deshidratados anuales (Kume et al., 2009).

Indonesia irradia comercialmente cerca de 4.100 toneladas/año de alimentos en una instalación gamma, incluyendo especias y vegetales deshidratados, cacao en polvo, alimentos para bebés y otros congelados. Vietnam declaró la producción de 40.000 toneladas de alimentos irradiados en el año 2006, con 4 instalaciones de Cobalto-60 y un acelerador de electrones (Narvaiz, 2009).

El sudeste asiático ha mostrado en los últimos años una actividad creciente en irradiación de frutas tropicales exóticas con fines fitosanitarios para mercados del hemisferio norte. También Pakistán, India, Australia, Nueva Zelandia, México y Hawaii, con destino principal a Estados Unidos.

América es el segundo continente en cuanto al volumen de alimentos irradiados, alcanzando las 116.400 toneladas/año (**Figura 2.2**). Estados Unidos es el país que irradia la mayor cantidad, llegando a un total de 92.000 toneladas de alimentos, de las cuales el 87% corresponde a especias (Kume et al., 2009). En Estados Unidos existen alrededor de 50 instalaciones comerciales que irradian especias, hortalizas, frutas, carne picada y pollo. Alrededor de 5.000 supermercados venden hamburguesas irradiadas y desde el año 2004 el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) autorizó la provisión de este producto a comedores escolares (Narvaiz, 2009).

Brasil irradia un total de 23.000 toneladas de alimentos, de las cuales el 87% corresponde a especias y vegetales deshidratados (Kume et al., 2009).

Con respecto a la Unión Europea, se irradian un total de 15.060 toneladas anuales de alimentos. De éstas, 7.200 toneladas corresponden a Bélgica y el resto a Francia, Holanda, Polonia, Hungría y Alemania (**Figura 2.5**). En Francia se irradian 3.111 toneladas/año de especias, pollo congelado deshuesado, frutas desecadas, ancas de rana congeladas y langostino en 5 instalaciones industriales.

En Ucrania se irradian 70.000 toneladas de alimentos, de las cuales 42.000 corresponden a trigo (Kume et al., 2009).

En Sudáfrica se irradian 18.185 toneladas de papa, cebolla, frutas, especias, miel, carnes, pescados y productos procesados (Kume et al., 2009; Narvaiz, 2009; OIEA, 2009b).

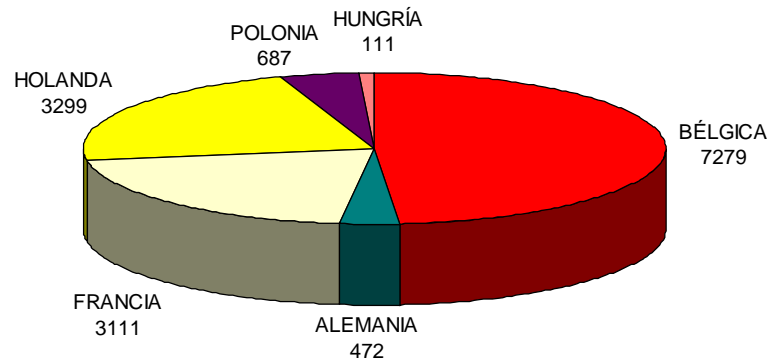


Figura 2.5. Toneladas de alimentos irradiados en la Unión Europea.
Fuente: Kume et al. (2009)

Nuestro país fue pionero en América Latina en conocimiento y aplicaciones de la energía nuclear, así como en la irradiación de alimentos.

Argentina produce Cobalto-60 en la Central Nuclear de Embalse, provincia de Córdoba, el cual es fraccionado y encapsulado posteriormente en el Centro Atómico Ezeiza para su venta a granel o en fuentes selladas, a través de DIOXITEK, una empresa del Estado argentino con participación mayoritaria de CNEA. La comercialización está actualmente en manos de una empresa multinacional.

Hasta el momento, existen en el país dos plantas de irradiación de alimentos, de Cobalto-60, ambas localizadas en la provincia de Buenos Aires.

La planta de irradiación-semi industrial del Centro Atómico Ezeiza, es estatal y funciona desde la década de 1970. La planta IONICS está instalada en el Talar de Pacheco. Es una empresa privada que ofrece sus servicios desde 1989. El inventario radiactivo de ambas oscila generalmente entre $2,22 \times 10^{16}$ y $2,96 \times 10^{16}$ Becquerel (Bq).

En estas plantas se irradian especias para el mercado local, que son utilizadas como ingredientes minoritarios en otros alimentos, como por ejemplo chacinados. Según la legislación vigente (CAA), como la especia irradiada corresponde a menos del 10% del alimento, no es necesario que el envase del producto final se rotule como "irradiado". También se irradian otros productos, mayormente deshidratados como cacao en polvo, suero bovino desecado, hígado desecado, huevo desecado o congelado, vegetales deshidratados, extracto de carne, polen, harina de soja, harina de legumbres, etc. (CNEA, 2011).

Antes del año 2009, el volumen total irradiado en las dos instalaciones rondaba las 4.000 toneladas por año, siendo la mayor contribución la de la planta privada (Narvaiz, 2009). Durante el año 2003, se irradiatoron 220 toneladas de alimentos en la

Planta de irradiación semi-industrial del Centro Atómico Ezeiza, en la **Figura 2.6** se muestran los porcentajes de los distintos rubros de alimentos.

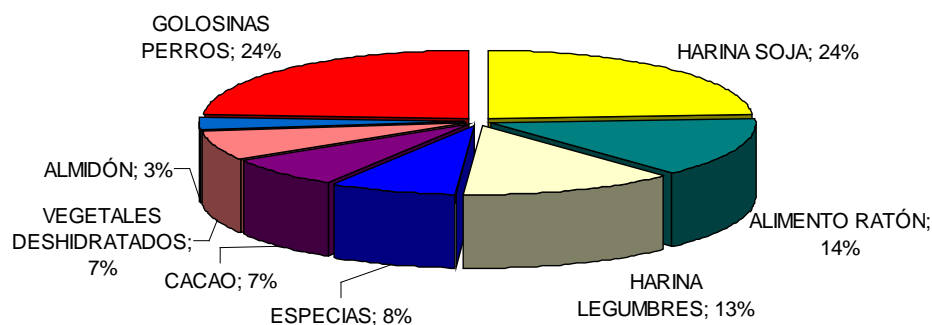


Figura 2.6. Porcentajes de alimentos irradiados en el Centro Atómico Ezeiza en el año 2003.
Fuente: Narvaiz, 2012.

En el 2011, en la planta IONICS se irradiaron 5.000 toneladas de alimentos, incluyendo envases para alimentos (720 toneladas). Los principales rubros de alimentos irradiados fueron especias y vegetales deshidratados. En el mismo año, se irradiaron 43,5 toneladas de alimentos balanceados (50%), hierbas (41%) y especias (9%), en la planta del Centro Atómico Ezeiza.

La instalación del Centro Atómico Ezeiza actúa también como promotora de esta tecnología, destinando parte de sus servicios a investigación y desarrollo sobre la factibilidad de irradiación de diversos productos, entre ellos, alimentos (CNEA, 2011).

En los últimos años hubo un continuo incremento de los volúmenes industriales de alimentos irradiados en ambas plantas, así como del interés de la industria alimentaria para que se construyan más plantas de irradiación en el país. Sin embargo, la implementación industrial a gran escala de esta tecnología se encuentra limitada principalmente por el rechazo a nuevas aprobaciones por la Comisión Nacional de Alimentos (Narvaiz, 2009).

Esta situación coloca al país en desventaja con respecto a una futura comercialización de alimentos irradiados en ámbitos regionales donde Brasil, Chile, Costa Rica, Cuba, Paraguay, Perú, México aprueban ampliamente este tratamiento. A su vez, se podrían perder importantes oportunidades en el comercio internacional con países de alto poder adquisitivo como Estados Unidos, que tiene una alta demanda de productos frutihortícolas en contra estación (Narvaiz, 2009).

Por estos motivos se considera necesaria la armonización de las legislaciones nacionales, para lo cual son necesarios estudios previos de factibilidad de irradiación de diversos alimentos.

2.1.8 Costos

Al igual que cualquier tipo de tratamiento de alimentos, la irradiación tiene un costo. A nivel mundial se estima que el mismo no supera el 3% del precio del producto. El costo de irradiación está estimado en centavos por kilo de alimento, lo cual es competitivo con el de otros tratamientos, pudiendo resultar incluso menos costoso. La construcción de una instalación gamma de irradiación de alimentos implica inversiones que oscilan entre uno y cuatro millones de pesos, cantidades comparables a las correspondientes a las instalaciones de tratamiento de alimentos mediante otras tecnologías (esterilización de alimentos líquidos a muy alta temperatura, por ejemplo) (CNEA, 2011).

2.1.9 Irradiación de productos pesqueros

Los productos marinos son altamente perecederos, siendo deteriorados principalmente por bacterias Gram negativas (Huss, 1995). Sin embargo su conocida calidad nutricional, debida principalmente al alto contenido proteico y a la composición de sus lípidos ricos en ácidos grasos poliinsaturados esenciales (Pigott & Tucker, 1990), ha impulsado el desarrollo de diversas tecnologías para preservarlos, entre ellas, la irradiación.

Los beneficios del tratamiento con irradiación sobre la mejora de calidad microbiológica y la preservación del pescado y productos pesqueros son respaldados por más de 40 años de investigación (IAEA, 1969). La irradiación gamma ha sido utilizada como un método efectivo para extender la vida útil de productos pesqueros al reducir cuantitativa y cualitativamente las poblaciones microbianas (Arvanitoyannis et al., 2010).

Existen recopilaciones de trabajos sobre productos pesqueros tratados con radiaciones ionizantes (Arvanitoyannis et al., 2010; Foley, 2006; IAEA, 1969; 2000). Por ejemplo, se han aplicado dosis de irradiación entre 0 y 7 kGy en pescado y mariscos obteniéndose resultados satisfactorios en cuanto a la extensión de la vida útil (IAEA, 1969; Kilcast, 1995).

La irradiación gamma permitió extender la vida comercial de diversos productos pesqueros al reducir la carga microbiana inicial.

La aplicación de 2 kGy permitió extender en 4 días el tiempo de almacenamiento a 13 °C de anchoas (*Stolephorus commersonii*) enteras (Lakshmanan et al., 1999). Se pudo incrementar la vida útil de caballa (*Scomber scombrus*) envasada al vacío con una dosis óptima de 2,5 kGy, durante el almacenamiento a 0,6 °C (Slavin et al., 1966). Filetes de besugo *Sparus aurata* salados y envasados al vacío presentaron una vida útil en refrigeración 13 días superior a la de los filetes sin irradiar, debido al tratamiento con 3 kGy (Chouliara et al., 2004). Se incrementó en 6 días la vida útil de pez plata (*Argentina silus*) almacenado a 0,6 °C, mediante la aplicación de 0,5-1,0 kGy (Carver et al., 1969). Abadejo *Dicentrarchus labrax* entero irradiado con 5 kGy presentó una vida útil 4 días superior durante almacenamiento a 4°C, en comparación con las muestras sin irradiar (Özden et al., 2006). El tiempo de comercialización de filetes de merluza *Merluccius hubbsi* fue triplicada por la aplicación de 3,3 kGy de irradiación gamma, durante el almacenamiento a 0 °C (Narvaiz et al., 1989). Ejemplares de besugo *Nemipterus japonicus* eviscerado, salado e irradiado con 2 kGy tuvieron una vida útil de 28 días en comparación con 9 días de la muestra sin irradiar (Jeevanandam et al., 2001). La aplicación de 2,5 kGy, en conjunto con otras barreras tecnológicas, también permitió desarrollar camarones (*Penaeus indicus*) estables a temperatura ambiente durante 2 meses (Kannat et al., 2006).

Sin embargo, no se conocen registros sobre la aplicación de irradiación sobre un producto fresco de calamar *Illex argentinus* ni en filetes marinados de *Engraulis anchoita*.

2.2 Características de las especies pesqueras

2.2.1 Composición

La composición química de los peces y moluscos varía considerablemente entre las diferentes especies y también entre individuos de una misma especie, en función de la edad, el sexo, el medio ambiente y la estación del año. La variación normal hallada en los principales constituyentes de filetes de pescado se muestra en la **Tabla 2.2**, donde se puede observar que las mismas pueden ser muy importantes, dependiendo de los factores anteriormente mencionados (Connell, 1975; Huss, 1999; Madrid et al., 1994).

Tabla 2.2. Variación normal de la composición de filetes de pescado, en porcentaje

CONSTITUYENTE	PORCENTAJE
AGUA	66-81
PROTEÍNAS	16-21
LÍPIDOS	0,2-25
CARBOHIDRATOS	<0,5
CENIZAS	1,2-1,5

Fuente: Huss (1999).

Las variaciones que se observan en la composición química del pez están directamente relacionadas con la alimentación, el nado migratorio y los cambios gonadales relacionados con el desove.

El pez pasa períodos de inanición por razones naturales o fisiológicas, como el desove o la migración o bien por factores externos como la escasez de alimento. El desove requiere mayores niveles de energía y por lo tanto, los peces que tengan reservas energéticas almacenadas como lípidos recurrirán a las mismas. Algunas especies realizan largas migraciones para llegar a las zonas específicas de desove y es por ello que para obtener energía, degradan las proteínas además de los lípidos, agotando las reservas de ambos, lo que origina una reducción de la condición biológica del pez (Connell, 1975; Huss, 1999).

En las especies pesqueras, el contenido de carbohidratos en el músculo es muy bajo, usualmente inferior al 0,5%. En general se encuentra en el hígado como glucógeno (carbohidrato de reserva). Debido a este bajo contenido, luego de la muerte el pH del músculo de pescado resulta poco ácido, por lo que el mismo es más perecedero en comparación con otros alimentos cárnicos (Huss, 1999; Madrid et al., 1994).

De todos los componentes de las especies pesqueras, la fracción lipídica es el que muestra la mayor variación. En ciertas especies esta variación presenta una curva estacional característica, que muestra un mínimo cuando se acerca la época de desove. Esta curva estacional pueden observarse en los ejemplares de *Engraulis anchoita* (**Sección 2.4**) (Connell, 1975; Huss, 1999).

Dado que el contenido de lípidos influye sobre las características tecnológicas del pescado, es útil clasificar a las especies según el porcentaje de grasa como magras (menor al 1,5-2,5 %) y grasas (mayor a 2,5 %). Las especies grasas incluyen los pelágicos como la anchoíta y la caballa y las magras, a la merluza, el calamar y el bacalao (Huss, 1999; Jacquot, 1961; Madrid et al., 1994).

Los lípidos de la mayoría de los peces óseos se dividen en dos grandes grupos: los fosfolípidos y los triglicéridos. Los fosfolípidos constituyen la estructura integral de la unidad de membranas en la célula, por lo que se denominan lípidos estructurales. El músculo blanco de un pez magro típico contiene menos del 1 % de lípidos. De este porcentaje, los fosfolípidos constituyen el 90 por ciento (Ackman, 1980). Los triglicéridos son empleados para el almacenamiento de energía en depósitos de grasas, generalmente dentro de células especiales rodeadas por una membrana fosfolipídica y una red de colágeno relativamente débil. Algunos peces contienen ceras esterificadas como parte de sus depósitos de grasa (Huss, 1999; Madrid et al, 1994).

Los lípidos de los peces están compuestos por ácidos grasos de cadena larga, con 14 a 22 átomos de carbono, los cuales presentan un alto grado de insaturación, como el ácido linoleico (C18:2 n6), ácido linolénico (C18:3 n3), ácido araquidónico (C20:4 n6) ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n3) y ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 n3) (Huss, 1999; Madrid et al., 1994; Stansby y Hall, 1967). La composición de lípidos puede variar con la alimentación del animal y la estación del año.

Los lípidos de los peces son importantes para la nutrición del hombre, ya que algunos ácidos como el linoleico y linolénico se consideran esenciales al no ser sintetizados por el organismo. En los peces estos ácidos grasos constituyen alrededor del 2% del total de lípidos. A su vez, contienen otros ácidos grasos poliinsaturados como el docosahexaenoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA), los cuales son importantes para la salud, ya que intervienen en la formación de sistema nervioso central y del sistema visual. A su vez, colaboran con la disminución del riesgo de enfermedades crónicas como cáncer y artritis (Madrid et al., 1994; Sahena et al., 2009; Weaver & Holub, 1988)

El alto contenido proteico de las especies pesqueras también las hace atractivas desde el punto de vista nutricional, dado que contienen todos los aminoácidos esenciales y tienen un alto valor biológico. Las proteínas del músculo del pez se pueden dividir en proteínas estructurales (actina, miosina, tropomiosina y actomiosina), sarcoplasmáticas (mioalbúmina, globulina y enzimas) y proteínas del tejido conectivo (colágeno) (Madrid et al., 1994; Suzuki, 1987).

La estructura conformacional de las proteínas de los peces es fácilmente modificada mediante distintos tratamientos que pueden ocasionar su desnaturalización, como la congelación, deshidratación, tratamientos con altas concentraciones salinas o el calor. Cuando las proteínas son desnaturalizadas bajo condiciones controladas, sus propiedades pueden ser utilizadas con propósitos tecnológicos. Un ejemplo es la

producción de productos a partir de surimi, en los cuales se emplea la capacidad de las proteínas miofibrilares para formar geles (Huss, 1999; Suzuki, 1987).

Por otra parte, los peces tienen una fracción de compuestos extractables que contienen nitrógeno, los cuales son compuestos de naturaleza no proteica, solubles en agua y de bajo peso molecular. Esta fracción denominada nitrógeno no proteico (NNP) constituye entre un 9 y 18% del nitrógeno total en los teleósteos (Huss, 1999). Los principales componentes de esta fracción son bases volátiles como el amoníaco y el óxido de trimetilamina (OTMA), creatina, aminoácidos libres, nucleótidos y bases purínicas y en el caso de peces cartilagosos, urea. La composición de los mismos varía entre especies y también dentro de la misma especie, dependiendo de la talla, estación del año, muestra de músculo, etc (Huss, 1999; Madrid et al., 1994).

En las especies de agua de mar, como el calamar *Illex argentinus* y la anchoíta *Engraulis anchoíta*, el OTMA constituye una parte característica e importante de la fracción NNP. Este compuesto se encuentra en todas las especies marinas entre un 1 y 5 % del tejido muscular (peso seco), pero estaría ausente en especies de agua dulce y en organismos terrestres (Anderson y Fellers, 1952; Hebard et al., 1989). Se cree que el pez puede obtener OTMA al alimentarse de plancton y también se ha demostrado que algunas especies de peces son capaces de sintetizar OTMA a partir de TMA, pero esta síntesis se considera de menor importancia (Belinski, 1964). Entre sus diversas funciones, el OTMA actúa como depresor del punto de congelamiento de los fluidos corporales involucrados en la regulación osmótica de los peces (Huss, 1999; Pedrosa-Menabrito & Regenstein, 1990). La cantidad de OTMA en el tejido muscular depende de la especie, la estación del año y el área de pesca.

Con respecto a la cantidad de vitaminas y minerales, ésta es específica de la especie y además puede variar con la estación del año. En general, la carne de pescado es una buena fuente de vitamina B y en el caso de las especies grasas, también de vitaminas A y D. El músculo del pescado se considera una fuente particularmente valiosa de calcio y fósforo, así como también de hierro y cobre. Los peces de mar tienen un alto contenido de yodo (Huss, 1999).

2.2.2 Calidad y deterioro de los productos pesqueros

Los productos pesqueros se deterioran más rápido que otros alimentos de origen animal, debido a su composición y al pH menos ácido de su carne.

La velocidad de deterioro varía según las especies dependiendo de diversos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos. Dentro de los intrínsecos se pueden mencionar el tamaño, la edad, el estado fisiológico y nutricional y la composición de los ejemplares pesqueros. Además, depende de la composición cualitativa y cuantitativa de la microflora, la cual está directamente relacionada con la zona de captura (Shewan, 1977). Los métodos de captura, la higiene durante la manipulación, las condiciones de almacenamiento y conservación, entre otros, son factores externos (Connell, 1975; El-Marrakchi et al., 1992; Huss, 1999).

La pérdida de frescura de estos productos está caracterizado por la actividad autolítica de enzimas endógenas y también por el desarrollo de microorganismos deteriorantes (Connell, 1975; Huss, 1999; Pedrosa-Menabrito & Regenstein, 1988).

La extensión de los cambios provocados por estas actividades, origina distintas etapas de deterioro y en consecuencia, diferentes grados de frescura, los cuales revisten suma importancia para la calidad y aceptación del pescado en las transacciones comerciales, cuando es utilizado como materia prima o como producto final.

2.2.2.1 Cambios post-mortem de los productos pesqueros

Luego de la captura y la posterior muerte de las especies pesqueras, tienen lugar una serie de cambios de origen enzimático y bacteriológico, que provocan modificaciones en sus características sensoriales y fisicoquímicas.

Se ha estudiado que la primer etapa de estas modificaciones está relacionada con la autólisis (auto-degestión) provocada por las enzimas, mientras que en etapas más avanzadas intervienen también bacterias (Huss, 1999).

2.2.2.1.1 Cambios autolíticos

Dentro de los cambios autolíticos que tienen lugar luego de la muerte de las especies pesqueras están aquellos relacionados con el metabolismo energético, la degradación de nucleótidos, la proteólisis y la degradación de OTMA a DMA.

De forma sintetizada se resumen a continuación los aspectos más relevantes de estos cambios.

Autólisis y metabolismo energético

Al momento de la muerte, el corazón se detiene y la sangre ya no es oxigenada, por lo que no ocurre la respiración normal y se restringe la producción de energía a partir de los nutrientes ingeridos. En la respiración normal, el glucógeno o las grasas son oxidadas por las enzimas del tejido, en una serie de reacciones que finalmente producen dióxido de carbono (CO₂), agua y adenosina trifosfato (ATP), un compuesto orgánico rico en energía. Este tipo de respiración se efectúa en dos etapas: una anaeróbica y otra aeróbica. La última depende de la continua presencia del oxígeno (O₂), que sólo está disponible en el sistema circulatorio.

En condiciones de anaerobiosis, el ATP puede ser sintetizado a través de otras dos importantes rutas a partir de la creatina fosfato o la arginina fosfato. La primera ruta está restringida al músculo de los vertebrados (peces teleósteos), mientras que la segunda es característica de algunos invertebrados como los cefalópodos (calamar y pulpo). En cualquiera de los casos, la producción de ATP cesa en cuanto se agotan la creatina fosfato o la arginina fosfato.

Para la mayoría de los peces teleósteos, la glucólisis es la única ruta posible para la producción de energía cuando el suministro de oxígeno se ve interrumpido. Este proceso, más ineficiente, genera principalmente ácido láctico y ácido pirúvico como productos finales. A su vez, mediante la glucólisis se producen dos moles de ATP por cada mol de glucosa, en comparación con los 36 moles de ATP producidos por cada mol de glucosa si los productos glucolíticos finales son oxidados aeróbicamente en la mitocondria del animal vivo. De esta manera, el músculo anaeróbico no puede mantener su nivel normal de ATP después de la muerte y cuando el nivel intracelular declina de 7-10 m moles/g a <1,0 m moles/g de tejido, el músculo entra en *rigor mortis*. En el rigor mortis, el músculo se contrae, tornándose duro y rígido, y todo el cuerpo se vuelve inflexible. Esta condición generalmente se mantiene durante uno o más días y luego se resuelve el rigor (Connell, 1975; Huss, 1999).

La resolución del rigor mortis hace que el músculo se relaje nuevamente y recupere la flexibilidad, pero no la elasticidad previa. La proporción entre el comienzo y la resolución del rigor varía según la especie y está influenciada por la temperatura, la manipulación, el tamaño y las condiciones físicas del pescado (Huss, 1999).

La glucólisis post mortem resulta en la acumulación de ácido láctico, con la consecuente disminución del pH en el músculo. El descenso del pH es menor al observado en mamíferos, porque el músculo de pescado contiene un nivel relativamente bajo de glucógeno, por lo que se genera menos ácido láctico. El estado nutricional del pez y el grado de agotamiento al momento de la muerte, también influyen en los niveles de glucógeno almacenado y consecuentemente en el pH final. Resulta interesante notar que la octopina es el producto final del metabolismo anaeróbico de los cefalópodos, como

el calamar y no es de naturaleza ácida, así que los cambios post mortem en el pH en este tipo de especies, no están relacionados con la producción de ácido láctico a partir del glucógeno.

Asimismo, a medida que el pH disminuye, se reduce la carga neta de la superficie de las proteínas musculares, causando su desnaturalización parcial y disminuyendo su capacidad de enlazar agua, lo que afecta la textura.

Cambios autolíticos relacionados con enzimas proteolíticas

El ablandamiento del músculo por la resolución del rigor y eventualmente el proceso de deterioro, coincide con los cambios autolíticos. La manipulación física acelera los mismos en pescado refrigerado, ya que muchas de las enzimas autolíticas se encuentran en paquetes discretos limitados por membranas, los cuales se rompen cuando están sujetos a abuso físico, originando el contacto entre enzimas y sustratos (Huss, 1999).

Numerosas enzimas proteolíticas han sido aisladas del músculo de pescado. La descomposición proteolítica está generalmente relacionada con un extenso ablandamiento del tejido. Uno de los más notables ejemplos de la proteólisis autolítica es la incidencia de estallido ventral (belly-burst) en especies pelágicas, como la anchoíta *Engraulis anchoita* (Huss, 1999; del Valle, 1982).

Dentro de las enzimas proteolíticas del tejido del pescado, se encuentran las catepsinas. Éstas son proteasas "ácidas" que usualmente están empacadas en los lisosomas. Las catepsinas suelen estar inactivas dentro del tejido vivo pero son liberadas dentro de los fluidos celulares luego de abuso físico o congelación y descongelación del músculo. Se cree que las catepsinas D y L desempeñan un papel primordial en la degradación autolítica del tejido del pescado (Huss, 1999).

Las calpainas son endopeptidasas intracelulares, cisteína y calcio dependientes. Éstas actúan sobre la Línea Z de las miofibrillas de las proteínas, y se consideran las principales responsables de la autólisis postmortem de la carne. La mayoría de las calpainas son activas a pH fisiológico, por lo que serían importantes en el ablandamiento del pescado durante el almacenamiento refrigerado (Huss, 1999; Suzuki, 1987).

Las colagenasas son enzimas que causan "desgajamiento", o ruptura de los miotomas, durante el almacenamiento. Los miotomas son bloques de células musculares separadas mediante tejido conectivo denominado miocomata. Cada célula muscular o fibra está rodeada por tejido conectivo que se une a la miocomata al final de la célula

mediante finas fibrillas de colágeno, las cuales se deterioran por la acción de las colagenasas (Huss, 1999).

La autólisis de las proteínas produce péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres y disminuyen la aceptación comercial de los pelágicos. A su vez, se ha demostrado que la autólisis acelera el crecimiento de las bacterias del deterioro, proporcionando un medio de crecimiento superior para este tipo de organismos. La inducción del deterioro bacteriano por autólisis también ocasiona la descarboxilación de aminoácidos, produciendo aminas biógenas y disminuyendo significativamente el valor nutritivo del pescado (Huss, 1999).

Cambios autolíticos: formación de dimetilamina

La enzima OTMA-asa, o OTMA dimetilasa, es la responsable de descomponer el OTMA en dimetilamina (DMA) y formaldehído (FA). Este último ha sido asociado con el endurecimiento de la textura del músculo, al inducir el entrecruzamiento de las proteínas musculares ocasionando además la pérdida de su capacidad para enlazar agua (Connell, 1975; Huss, 1999). La mayoría de las enzimas OTMA dimetilosas están unidas a la membrana y se tornan más activas cuando el tejido es roto por la congelación o por la solubilización en detergentes (Huss, 1999).

Autólisis y catabolismo de nucleótidos

Debido a la autólisis también ocurre la degradación de los compuestos relacionados con el ATP, como la degradación del ATP para formar adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), inosina (Ino) e Hipoxantina (Hx). La degradación de los catabolitos del ATP procede de la misma forma en la mayoría de los pescados, pero la velocidad de cada reacción (de un catabolito a otro), varía entre una especie y otra (huss, 1999).

2.2.2.1.2 Cambios bacteriológicos

La principal causa de alteración de las especies marinas es el desarrollo microbiano (Liston, 1980; Gram & Huss, 1996). Los microorganismos se encuentran en todas las superficies externas, como la piel y las branquias, así como en las vísceras de los peces vivos recién capturados, en un número total que puede variar considerablemente, dependiendo más del medio ambiente de captura, que de la especie

(Connell, 1975; Huss, 1999; Shewan, 1977). En general, los pescados capturados en aguas muy frías y limpias contienen menor número de microorganismos.

En la superficie de los peces se pueden encontrar diversas especies de bacterias. La microflora de los peces de aguas templadas está dominada por bacterias psicrótrofas Gram negativas con forma de bastones. Las bacterias psicrótrofas son aquellas capaces de desarrollarse a bajas temperaturas, como las de refrigeración (2-8 °C) (ICMSF, 1983). También se han hallado microorganismos Gram positivos. En las especies de agua tropicales predomina la flora mesófila Gram positiva (Huss, 1999; Shewan, 1977).

El desarrollo bacteriano depende de la especie, la edad, el tamaño, la alimentación, el estado fisiológico así como de las composiciones cualitativas y cuantitativas de la microflora inicial. También influyen el arte de pesca, y las condiciones de manipulación y temperaturas de almacenamiento (El-Marrakchi et al., 1992; Huss, 1999).

En el pescado recién capturado, el músculo es estéril porque el sistema inmunológico del pez previene el crecimiento de bacterias en el mismo. Cuando el pez muere, el sistema inmunológico colapsa y las bacterias proliferan libremente. En la superficie de la piel, las bacterias colonizan en una amplia extensión la base de las escamas. Durante el almacenamiento, las bacterias invaden el músculo penetrando entre las fibras musculares. La acción proteolítica de las enzimas descripta anteriormente, colabora con la invasión microbiana al ablandar el tejido muscular. Dado que sólo un número limitado de microorganismos realmente invade el músculo y el crecimiento microbiano se lleva a cabo principalmente en la superficie, el deterioro es probablemente una consecuencia de la difusión de enzimas bacterianas hacia el interior del músculo y de la difusión externa de nutrientes (Connell, 1975; Huss, 1999).

Durante el almacenamiento, las bacterias entran en fase exponencial de crecimiento casi inmediatamente después de la muerte del pez, incluso cuando el pescado es colocado en hielo, probablemente porque la microflora se encuentra adaptada a las temperaturas de enfriamiento. Durante el almacenamiento en hielo, la población bacteriana se duplica en aproximadamente 1 día y después de 2 o 3 semanas alcanza unas 10^8 - 10^9 UFC/g de músculo (Gram, 1989; Huss, 1999).

Las bacterias psicrótrofas Gram-negativas constituyen el principal grupo de microorganismos responsables del deterioro en los productos de la pesca refrigerados, entre ellas se han aislado *Achromobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Shewanella spp.*, *Cytophaga spp.* También se han aislado otros géneros como *Vibrio spp.*, *Clostridium spp.*, *Micrococcus spp.*, *Alteromonas spp.*, *Moraxella spp.*,

enterobacterias y coliformes, bacterias ácido lácticas y mohos y levaduras (Gram & Dalgaard, 2002; Gram & Huss, 2000; Huss, 1999; Shewan, 1977). Sin embargo, no todos los grupos generan olores y sabores asociados al deterioro, ya que existen bacterias específicas del deterioro, como *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas spp.*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio spp.*, *Alteromonas spp.* y *Aeromonas spp.* (Dalgaard et al., 1997; Huss, 1999; Shewan, 1977).

La actividad bacteriana induce ciertos cambios bioquímicos durante el almacenamiento y el deterioro, que generan componentes volátiles entre los que se incluyen la TMA, compuestos sulfurosos volátiles, aldehídos, cetonas, ésteres, hipoxantina, así como también otros compuestos de bajo peso molecular.

Dentro de estos, la reducción del OTMA da lugar a la TMA, por algunas bacterias específicas del deterioro que emplean el OTMA como aceptor terminal de electrones durante la respiración anaeróbica. El componente reducido, la TMA es uno de los compuestos dominantes del pescado deteriorado, tiene el olor típico del pescado (Connell, 1975; Huss, 1999).

2.2.2.1.3. Cambios en la fracción lipídica: oxidación e hidrólisis

Además de los cambios mencionados, durante el almacenamiento tienen lugar dos reacciones que involucran a los lípidos del pescado, la oxidación y la hidrólisis.

Estas reacciones resultan en la producción de diversas sustancias, algunas de las cuales tienen sabores y olores desagradables. Algunas pueden contribuir a los cambios de textura mediante uniones covalentes a las proteínas musculares. Las reacciones pueden ser no enzimáticas o catalizadas por enzimas ya sean microbianas, intracelulares o digestivas del mismo pescado. La extensión de estas reacciones depende principalmente de la especie de pescado y de la temperatura de almacenamiento (Connell, 1975; Huss, 1999).

Los pescados grasos son particularmente susceptibles a la degradación lipídica, la cual puede ocasionar severos problemas en la calidad, incluso durante el almacenamiento a temperaturas bajo cero.

Con respecto a la oxidación, los lípidos de las especies pesqueras se caracterizan por presentar una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, lo que los hace más susceptibles a la oxidación mediante un mecanismo autocatalítico (Huss, 1999; Ólafsdóttir et al., 1997).

La autooxidación se inicia por la escisión de un átomo de hidrógeno del átomo de carbono central de la estructura pentahédrica presente en la mayoría de las acilcadenas de los ácidos grasos con más de un doble enlace. El radical lipídico (L·) que se forma reacciona muy rápidamente con el oxígeno atmosférico formando un radical peróxido (LOO·), el cual puede nuevamente escindir un hidrógeno de otra acilcadena produciendo un hidroperóxido (LOOH) y un nuevo radical L·. Esta propagación continúa hasta que uno de los radicales es removido mediante reacción con otro radical o con un antioxidante (AH) del cual resulta un radical (A·) mucho menos reactivo.

Posteriormente, debido a la catálisis de iones de metales pesados los hidroperóxidos continúan dividiéndose hasta formar cadenas carbonadas más cortas, que son los productos secundarios de la autooxidación: aldehídos, cetonas, alcoholes, pequeños ácidos carboxílicos y alcanos. Estos productos producen diferentes aromas y sabores y, en algunos casos, decoloración amarillenta. Algunos de los aldehídos pueden ser determinados como *sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico*.

Los iones metálicos son de gran importancia en el proceso de iniciación, ya que catalizan la formación de especies reactivas al oxígeno, como el radical hidróxilo (OH·), el cual reacciona inmediatamente con los lípidos o cualquier otra molécula en el lugar donde ha sido generado (Huss, 1999).

Los hidroperóxidos de los ácidos grasos pueden también ser formados enzimáticamente, catalizados por la enzima lipoxigenasa, la cual está presente en los diferentes tejidos del pescado en cantidades variables. La enzima es inestable y probablemente tiene importancia en la oxidación de los lípidos sólo en el pescado fresco. La célula viva posee algunos mecanismos de protección dirigidos contra los productos de la oxidación lipídica, como la enzima, la glutatión peroxidada y el alfa-tocoferol (Huss, 1999).

Por la hidrólisis de los triglicéridos se generan ácidos grasos libres durante el almacenamiento, debido a la actividad de enzimas originadas en el tracto digestivo o excretadas por ciertos microorganismos. También por lipasas celulares, pero en menor grado (Connell, 1975; Huss, 1999).

2.2.3 Métodos para determinar la calidad de los productos pesqueros

A raíz de los cambios mencionados anteriormente, que ocurren durante el almacenamiento de los productos pesqueros, se han desarrollado distintos métodos para determinar la calidad de los productos pesqueros. Los mismos pueden ser bacteriológicos, químicos, físicos y sensoriales.

Existen varias investigaciones que sostienen que el recuento bacteriano total es el mejor índice de calidad para pescado almacenado en hielo, debido a que los microorganismos son el principal factor de descomposición del mismo (Connell, 1975; Gram, 1992; Huss et al., 1997; Shewan, 1977). Según estos autores, el pescado presenta un nivel evidente de deterioro cuando la carga microbiana total alcanza valores de 10^6 - 10^7 UFC/g de músculo.

De acuerdo con estos hechos, la ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1983) ha establecido un límite microbiológico para pescado y moluscos, fresco o congelado, que establece un valor máximo aceptable de recuento total en placa de bacterias psicrótrofas de 10^6 UFC/g.

Asimismo, varios autores han expresado que, de acuerdo con la calidad sensorial y otros índices químicos del deterioro, un valor de 10^6 UFC/g de recuento de bacterias psicrótrofas serían el máximo aceptable para distintos productos pesqueros como corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) y lenguado patagónico (*Paralichthys patagonicus*) (Massa, 2006) y róbalo (*Dicentrarchus labrax*) (Özden et al., 2007).

También se debe tener en cuenta que el recuento en placa de microorganismos mesófilos aerobios ha sido muy utilizado como indicador microbiológico de la calidad higiénica de los alimentos (ICMSF, 1983). La presencia de mesófilos podría indicar fallos en el control de la temperatura de refrigeración en alimentos refrigerados o la falta de limpieza en las instalaciones de producción. A su vez, resulta útil para conocer el origen probable de la contaminación durante el procesamiento de los productos pesqueros (ICMSF, 1983).

Tanto las anillas de calamar como los marinados de anchoíta son productos factibles de contaminación durante su elaboración. Los marinados de anchoíta son procesados manualmente, tanto en el descabezado y eviscerado de la anchoíta entera, como en las etapas posteriores de marinación y envasado. En el caso de las anillas de calamar, su manipulación para obtener las mismas, así como un inadecuado manejo de los tiempos y temperaturas durante los pre-tratamientos con soluciones de poli-fosfato de sodio podrían implicar una contaminación microbiológica del producto a partir de los operarios y del ambiente. Por este motivo es interesante analizar dicha flora en los productos utilizados en esta tesis.

Como resultado de los procesos enzimáticos y bacterianos anteriormente descritos, durante el deterioro ocurre la acumulación gradual de ciertas aminas volátiles en el músculo como la TMA, DMA y el amoníaco. Como se explicó anteriormente, la DMA es producto de la actividad enzimática sobre el OTMA y es generada durante el almacenamiento durante las primeras etapas de autólisis. La TMA se produce por la reducción bacteriana del OTMA. Durante la etapa autolítica, el nivel de TMA se mantendría en sus valores iniciales. Una vez que se hace más importante la proliferación bacteriana, tiene lugar la etapa de deterioro microbiano y la producción de TMA a partir de OTMA se acelera (Connell, 1975; Huss, 1999; Oehlschlager, 1997).

La TMA, DMA y el amoníaco se cuantifican en conjunto mediante la determinación del Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT), el cual ha sido y es ampliamente utilizado para evaluar la calidad del pescado y productos de la pesca (Hozbor et al., 2005; Huss, 1995; Shakila et al., 2003).

El NBVT es particularmente útil para evaluar la calidad de calamar (LeBlanc & Gill, 1984; Woyewoda & Ke, 1980). También ha demostrado ser de utilidad para determinar la pérdida de frescura en marinados de anchoita (*Engraulis anchoita*) (Yeannes & Casales, 2008) (*Engraulis encrasicolus*) (Gökoglu et al., 2009) y de sardina (*Sardina pilchardus*) (Gökoglu et al., 2004).

La determinación del NBVT se destaca por la simplicidad de la técnica analítica y un bajo requisito en cuanto al nivel de recursos humanos y de laboratorio, resultando por estos motivos ampliamente utilizada en la industria pesquera (Huss, 1995; Shakila et al., 2003; Rehbein & Oehlschlager, 2009).

Se debe tener en cuenta que las bases nitrogenadas volátiles pueden provocar un incremento en el valor de pH en el producto pesquero, lo que indicaría la pérdida de calidad y posible deterioro. Es por este motivo que el monitoreo del pH durante el almacenamiento cobra relevancia (Connell, 1975; Huss, 1999).

La oxidación de los lípidos puede generar aromas y sabores indeseables. Como se mencionó, los lípidos de las especies pesqueras son muy susceptibles a la oxidación por lo que la determinación de la extensión de la misma durante el almacenamiento y debido al efecto de la irradiación es relevante.

La cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), es un método utilizado para determinar el grado de oxidación lipídica. El mismo permite cuantificar mediante la determinación de la absorbancia los productos secundarios de la oxidación de lípidos que al reaccionar con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) producen pigmentos coloreados. Algunos de estos productos son malondialdehído (MDA) y otros aldehídos (ALs). El malondialdehído reacciona con el TBA para formar un producto que

presenta su máximo de absorbancia a una longitud de onda de 532 nm (pigmento rosado) (TBA-RS₅₃₂). A su vez, otros aldehídos reaccionan con el TBA produciendo un pigmento amarillo cuya máxima absorbancia se da a los 455 nm (TBA-RS₄₅₅) (Kosugi, Kato & Kikugawa, 1987).

Los cambios autolíticos relacionados con las enzimas proteolíticas provocan cambios en la textura. Estos cambios pueden ser determinados tanto sensorial como instrumentalmente.

2.2.4 Conclusiones

Todos los procesos anteriormente descritos influyen sobre las características fisicoquímicas, nutricionales y sensoriales de los pescados y moluscos, al provocar modificaciones en el aspecto, el color, el aroma, el sabor y la textura de los mismos, determinando así su calidad durante el almacenamiento.

La extensión de dichos cambios dependerá de los factores intrínsecos y extrínsecos anteriormente mencionados y además, del efecto de la irradiación sobre los mismos. Todos ellos influirán sobre la calidad y características de las materias primas utilizadas en esta tesis y por lo tanto, en los productos obtenidos a partir de las mismas: las anillas de calamar *Illex argentinus* y los marinados de filetes de *Engraulis anchoita*.

A continuación se describen las características más relevantes de las especies mencionadas.

2.3 Calamar *Illex argentinus*

Los calamares, al igual que las sepias y los pulpos, pertenecen a un grupo particular de moluscos denominado cefalópodos. Este grupo está compuesto por más de 700 especies que se distribuyen en las aguas marinas desde el ecuador hasta las regiones polares (Brunetti et al., 1999).

Los calamares se caracterizan por tener una cabeza bien desarrollada rodeada por cuatro pares de brazos y dos tentáculos. En el centro de la corona de brazos se encuentra la boca, que tiene un par de mandíbulas o pico. El cuerpo o manto (también denominado tubo o vaina), expulsa el agua de su interior por un sistema de sifón,

permitiéndole el desplazamiento por propulsión a chorro. El esqueleto es una conchilla interna quitinosa, denominada pluma.

En la dermis del calamar se encuentran células que contienen pigmento, denominadas cromatóforos, las cuales están inervadas desde el cerebro. Éstas tienen la capacidad de contraerse o expandirse liberando pigmento de manera tal que el calamar puede adaptar su coloración al medio que lo rodea. También poseen una glándula secretora de tinta que les permite ocultarse de sus depredadores (Brunetti et al., 1999). En la **Figura 2.7** se presenta una imagen de un ejemplar de *Illex argentinus*.

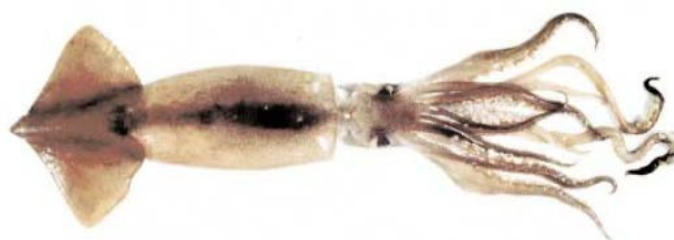


Figura 2.7. Vista dorsal del calamar *Illex argentinus*
Fuente: SAGPYA (2011)

El calamar *Illex argentinus* pertenece a la familia Ommastrephidea, que está constituida por los calamares de aleta corta y representa la especie de mayor importancia desde el punto de vista pesquero ya que más de la mitad de las capturas mundiales de cefalópodos corresponden a ella (Roper et al., 1984), siendo una de las zonas pesqueras de mayor importancia el Océano Atlántico Sur-Occidental (Brunetti et al., 1999).

Illex argentinus es una especie de cefalópodo nerítico-oceánica que se distribuye frecuentemente a lo largo de la plataforma y el talud continental del Océano Atlántico Sudoccidental entre las latitudes 20° S y 55° S. Es más abundante en el área comprendida entre las latitudes 35° S y 52° S, como se muestra en la **Figura 2.8** (Brunetti et al., 1998; Leta, 1981).

Es la especie de calamar más abundante de la región. Sus volúmenes de captura se sitúan en segundo lugar con respecto a las capturas marinas.

El tamaño medio de los ejemplares de esta especie es de 25 cm, pudiéndose encontrar ejemplares de hasta 40 cm de largo. El peso medio de los ejemplares es de 600 gramos, habiendo ejemplares de hasta 1 kg.

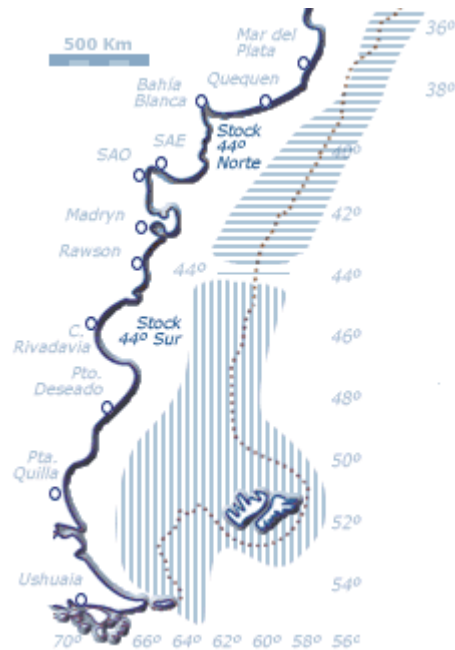


Figura 2.8. Distribución geográfica de *Illex argentinus*
Fuente: SAGPYA (2011)

En Argentina, en el año 2006, las capturas marinas totales excedieron el millón de toneladas, de las cuales el calamar *Illex argentinus* representó el 27,3% con capturas de alrededor de 270 000 toneladas (MINAGRI, 2007). Sin embargo, las capturas de la especie han mostrado fluctuaciones en el tiempo, como se puede apreciar en la **Figura 2.9**, registrándose en los últimos años capturas de menor volumen en comparación con el año 2007.

En el año 2006, alrededor de 180.000 toneladas de calamar *Illex* se exportaron de Argentina, siendo el destino principal España, representando el 28% de las exportaciones de productos marinos (MINAGRI, 2007).

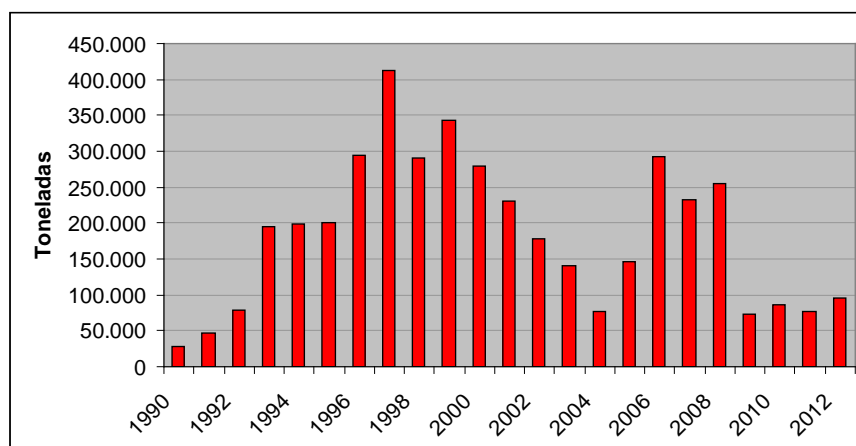


Figura 2.9. Desembarcos de *Illex argentinus* en el país.
Fuente: SAGPYA (2012)

La composición proximal del manto y tentáculos de *Illex argentinus* fue determinada por Melaj et al. (1994), quienes informaron un porcentaje de humedad, proteínas, lípidos y cenizas del 79,71, 18,00, 0,54 y 1,76%, respectivamente. Estos resultados fueron similares a los de otros autores para otras especies de calamar (Kreuser, 1986; Shirasaka, 1973) y coinciden con los indicados en la **Tabla 2.1**. El calamar es una especie pesquera que presenta un bajo contenido de lípidos, generalmente menor al 2%.

El calamar presenta varias ventajas en comparación con otros productos pesqueros. Tiene un alto rendimiento en comparación con otros productos marinos, ya que las partes comestibles representan entre un 60 y un 80% de su peso, mientras que en pescado suelen ser del 50%. Su carne es de color blanco y se caracteriza por tener un sabor suave. Sus proteínas presentan una alta funcionalidad, que es importante durante el procesamiento. También presenta un bajo contenido lipídico (Melaj et al., 1994; Mignino et al., 2008; Sugiyama et al., 1989).

El manto de calamar presenta una estructura tisular única. Las fibras musculares difieren de las fibras de los pescados por ser más resistentes y presentar a su vez un arreglo muy diferente (Sugiyama et al., 1989). Según el estudio de la ultraestructura del tejido de *Loligo pealei*, el 98% del espesor del manto corresponde a fibras musculares arregladas en filas de bandas ortogonales, que se encuentran recubiertas por dos túnicas de tejido conectivo. Las bandas radiales conectan estas túnicas mientras que las bandas circunferenciales (más anchas) se distribuyen a lo largo de la circunferencia del manto (Otwell & Giddings, 1980).

El calamar es procesado industrialmente a fin de obtener diferentes productos que abastecen tanto al mercado interno como externo.

El calamar se comercializa entero, el tubo (manto o vaina) con o sin piel, tentáculos y aletas y anillas. Para obtener el tubo sin piel, el calamar se procesa mediante el descabezado, eviscerado, corte de aleta, pelado y lavado. Las etapas de lavado sirven para disminuir la carga microbiana inicial.

Las anillas se obtienen por cortes transversales del manto sin piel. Las anillas suelen prepararse para su consumo rebozadas con harina y fritas (rabas), así como hervidas en ensaladas de mariscos y moluscos frías, o en salsas.

En la **Figura 2.10** se presentan los diferentes productos obtenidos a partir de calamar.



Figura 2.10. Productos de calamar: tubo con piel y aletas, tubo sin piel, tentáculos y anillas.

El calamar entero congelado así como sus productos congelados abastecen principalmente la demanda del mercado internacional. Por su parte, el calamar fresco así como sus productos frescos y conservas, abastecen el mercado local. Las anillas suelen comercializarse frescas o congeladas y envasadas al vacío.

Los tubos y anillas de calamar se suelen tratar con soluciones que contienen mezclas de poli-fosfatos. Estas soluciones son ampliamente utilizadas en la industria pesquera para mejorar la capacidad de retención de agua de las proteínas. Esto beneficia la calidad final del producto al retener la humedad natural, el flavor y nutrientes, mejorar la textura y reducir las pérdidas de fluidos durante la cocción y el almacenamiento (“drip loss”). A su vez, los fosfatos retardan la oxidación lipídica y estabilizan el color al quelar cofactores (metálicos) enzimáticos (Gonçalves & Ribeiro, 2008, 2009; Knipe 2004; Lampila, 1993).

El pretratamiento de los productos pesqueros, previo al envasado y la irradiación, se utiliza para prevenir la pérdida de fluidos durante el almacenamiento. La combinación del tratamiento con 10% de poli-fosfato de sodio seguido de irradiación a 1,5 kGy ha sido recomendada para caballa (Hussain et al., 1985). Con este tratamiento se logró un incremento de hasta dos semanas en la vida útil, con mínimas pérdidas (Wilkinson & Gould, 1998).

En particular, el tratamiento con poli-fosfatos se ha aplicado en calamar para mejorar la textura de la carne del manto (Kolodziejska et al., 1987).

Como se mencionó anteriormente, luego de la captura del calamar, tienen lugar una serie de reacciones enzimáticas y microbiológicas de deterioro que llevan a la pérdida de frescura y calidad del mismo.

Estos cambios de pueden determinar a través de índices químicos, como la cuantificación de las bases nitrogenadas volátiles. Como se mencionó anteriormente, durante las primeras etapas del deterioro se forma DMA por la degradación enzimática del óxido de OTMA. Si bien la DMA es generada en cantidades medibles, estas no son lo suficientemente importantes como para aumentar los niveles estadísticos del NBVT. Posteriormente, una vez superado el *rigor mortis*, las membranas pierden su capacidad de interferir con la invasión microbiana. Por lo tanto, la flora típica de estos productos y del medio marino invade el músculo, generándose la TMA por la degradación bacteriana del OTMA. Por ello, la actividad microbiana provoca un aumento exponencial del NBVT (Huss, 1995; Oehlenschläger, 1997).

El deterioro producido por la actividad enzimática y bacteriana se caracteriza por la pérdida de calidad sensorial debida a cambios en el aroma, el color, el sabor y la textura. Por ejemplo, la TMA formada por la actividad microbiana, así como otros compuestos volátiles, modifican el olor característico del calamar fresco. El calamar en un estado avanzado de deterioro presenta aromas pútridos y amoniacales.

El color es considerado uno de los atributos más importantes de la apariencia de los alimentos y es utilizado generalmente para determinar distintos aspectos de la calidad como el grado de deterioro (Francis, 1995; Potter & Hotchkiss, 1995). El color es un parámetro muy importante en la evaluación de la calidad del calamar. Si bien el color de la piel se ve modificado, es más importante tener en cuenta el color del músculo, en especial el del manto (Dragonetti Saucero, 2008). En los ejemplares frescos de *Illex argentinus* la piel del dorso presenta un color marrón que es más oscuro en el centro, debido a la mayor cantidad de cromatóforos, mientras que la piel de la región abdominal es más clara (Dragonetti Saucero, 2008). En la **Figura 2.10** se muestran calamares *illex argentinus* con el color marrón característico. A medida que avanza el deterioro, el color de la piel se vuelve más rojizo-violáceo.



Figura 2.10. Ejemplares de *Illex argentinus* congelados a bordo

Con respecto al manto, el color del mismo en el calamar fresco es blanco marfilino. Durante el deterioro, el color se va tornando más rojizo, hasta alcanzar un color similar al del vino en ejemplares muy deteriorados (Dragonetti Saucero, 1008).

Otros autores han estudiado los cambios de color durante el almacenamiento de calamar, observando la aparición de coloración rosada en el manto durante el almacenamiento de *Loligo plei* (Lapa-Guimaraes et al., 2002) y de *Loligo formosana* (Sungsri-In et al., 2011). A su vez, *Thanonkaew* et al. (2006) analizaron los cambios de color en *Loligo peali*, hallando una pigmentación amarilla que se relacionaría con los productos de la oxidación de los fosfolípidos del calamar.

Se ha observado que el manto del calamar vivo es translúcido, sin signos de turbidez. La misma va aumentando luego de la muerte, posiblemente debido al solapamiento de los filamentos de actina y miosina durante la contracción muscular. La aparición de turbidez es más lenta durante el rigor mortis. Asimismo, la desnaturalización proteica influye sobre el aumento de la misma (Yoshioka et al., 2003).

Los cambios en la textura durante el almacenamiento estarían relacionados con la pérdida de firmeza y elasticidad. Los mismos serían más lentos que los observados en el color y el aroma, ya que por la disposición de las fibras musculares y el colágeno, el músculo mantiene cierta firmeza y elasticidad aún cuando el ejemplar se encuentre alterado (Dragonetti Saucero, 2008).

Varios autores han realizado estudios sobre la calidad de calamar fresco y durante su deterioro, a fin de evaluar la extensión del tiempo de almacenamiento.

Melaj et al. (1997) analizaron el calamar *Illex argentinus* durante el almacenamiento en agua refrigerada a 2-5 °C. De acuerdo a la tabla descriptiva estructurada desarrollada por Melaj et al., (1993-1994) para *Illex argentinus* entero, Melaj

et al., (1997) determinaron que la categoría de los ejemplares de esta especie disminuyó de categoría “comercial” a “marginal”, luego de 8 días.

Lapa-Guimaraes et al. (2002) han trabajado con *Loligo plei*, observando que la calidad sensorial de los ejemplares enteros almacenados a 0-1 °C disminuía a los 7 días y era negativa a los 10 días. Vaz-Pires et al. (2008) determinaron una vida útil sensorial de 9 días para calamar *Illex condecti* entero, almacenado a 2 °C. Asimismo, Paarup et al. (2002a) detectaron el rechazo sensorial de *Todaropsis eblanae* a los 10 días de almacenamiento, debido principalmente a aromas amoniacaes.

Paarup et al. (2002b) observaron el rechazo sensorial de manto de calamar (*Todaropsis eblanae*) envasado al vacío a los 7 días de almacenamiento a 4 °C. Yamanaka et al. (1987) describieron la pérdida de calidad sensorial en *Todarodes pacificus* luego de 8 días de almacenamiento a 0 °C, describiendo a partir del décimo día un estado de descomposición avanzado debido al aroma pútrido y la textura blanda.

De acuerdo a estos resultados, se observa que el tiempo de almacenamiento en refrigeración del calamar entero o en tubo se encontraría dentro de los 8-10 días.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente y en la **Sección 2.1**, la aplicación de la irradiación gamma podría retardar las reacciones de deterioro al reducir la carga microbiana presente en el calamar.

A su vez, las etapas involucradas en el proceso de producción de las anillas de calamar podrían significar un aumento en los niveles de contaminación microbiológica debido a la manipulación y al tiempo de la misma, haciendo aún más significativo el uso de la irradiación como una barrera tecnológica destinada a incrementar la vida comercial de este producto.

También cabe mencionar que según lo indicado anteriormente, el manto de calamar se caracteriza por presentar un bajo contenido de lípidos. Como se indicó en la **Sección 2.1**, los alimentos con alto contenido de lípidos son más sensibles a la oxidación inducida por la irradiación. En este contexto, la irradiación gamma podría ser un método útil para disminuir las poblaciones microbianas de un producto bajo en contenido lipídico, como lo es el manto de calamar.

La preservación de calamar fresco mediante la irradiación gamma podría significar el desarrollo de nuevos productos a partir de esta especie, que presenten como ventaja una vida comercial más extensa.

Asimismo, un mayor tiempo de comercialización implicaría la posibilidad de abastecer mercados internacionales prescindiendo del tratamiento de congelación utilizado hasta el momento.

2.4 Anchoíta *Engraulis anchoíta*



Figura 2.12. *Engraulis anchoíta*.

La *Engraulis anchoíta* (**Figura 2.12**) es la especie pelágica más abundante de Océano Atlántico Sudoccidental. Se encuentra en las aguas desde el sur de Brasil (24 °S) hasta el Golfo de San Jorge, en la Patagonia argentina (48 °S). La distribución geográfica de esta especie se presenta en la **Figura 2.13**.

En las aguas frente a las costas de Uruguay y Argentina, al sur del los 34 °S, se han identificado al menos dos poblaciones de anchoíta, el grupo bonaerense y el patagónico. Estos se encuentran muy próximos hacia finales de la primavera y principios del verano, pudiéndose establecer un límite aproximado hacia los 41 °S. Por el contrario, los cardúmenes adultos de ambos efectivos se hallan separados por una distancia mayor a las 500 mn durante el invierno. De estos grupos, la población bonaerense constituye el conjunto íctico más abundante de la zona, estimándose la biomasa total entre 1 y más de 5 millones de toneladas (Hansen, 2000). Por este motivo, la anchoíta presenta un interesante potencial económico ya que se encuentra sub explotada (Hansen, 2000; Massa et al., 2007).



Figura 2.13. Distribución geográfica de *Engraulis anchoita*. Fuente: FAO (2012)

En Argentina, la pesca de la *E. anchoíta* ocurre predominantemente entre los meses de Julio y Noviembre, como se puede observar en la **Figura 2.14**. Las capturas registradas en el país en el año 2006 fueron alrededor de 30 000 toneladas (Madureira et al., 2009), siendo las capturas promedio entre los años 2006 y 2011 superiores a las 26 000 toneladas (MINAGRI, 2012).

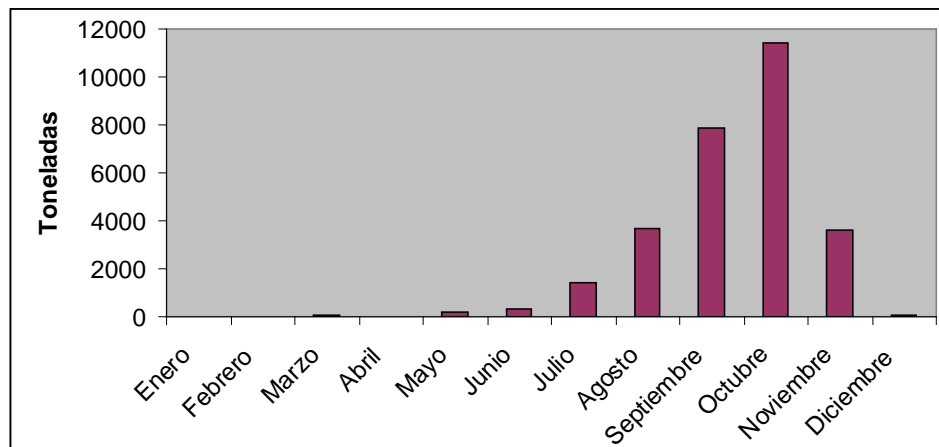


Figura 2.14. Desembarcos de *Engraulis anchoita* por mes (promedio 2004-2011). Fuente: SAGPYA (2012)

La talla promedio de los ejemplares de esta especie es de 13 cm y su peso medio de 35 g (SAGPYA, 2012).

La anchoíta es una especie grasa, muy nutritiva por su contenido proteico (entre 15 y 20%) y la elevada calidad nutricional de sus lípidos, constituidos por un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (alrededor del 27%) correspondiendo el 24% de los ácidos grasos totales a ácidos grasos de la serie omega 3, como el ácido docosahexaenoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA) (Massa et al., 2012).

Como se mencionó en la **Sección 2.2**, la composición química de la anchoíta varía según la época del año, como puede observarse en la **Tabla 2.3**. Se puede observar que la mayor variación se da en el contenido de lípidos.

Tabla 2.3. Composición química proximal de la *Engraulis anchoita* capturada en diferentes épocas del año (Yeannes & Casales, 1995).

Época de captura	Contenido de agua	Lípidos	Proteínas	Cenizas
Mayo	69,45	9,43	19,24	2,05
Junio	71,05	6,79	19,00	3,16
Julio	77,26	4,13	17,8	1,45
Septiembre	75,75	3,93	18,59	1,73
Octubre	76,99	3,55	16,38	3,08
Noviembre	79,56	1,68	15,83	1,18

Argentina es un país pionero en cuanto a la explotación y manufactura de anchoíta. También es el principal productor de diferentes tipos de productos alimenticios a partir de anchoíta, dirigidos tanto al mercado doméstico como internacional. Más del 80 por ciento de esta producción corresponde al producto salado, mientras que el 20 por ciento restante se prepara como alimento con valor agregado. En el año 2005, Argentina exportó productos a base de anchoíta por US\$ 26 millones (Madureira et al., 2009).

A partir de la anchoíta se elabora la conserva tipo sardina, la anchoíta salada madurada, los filetes en aceite y también marinados. Los marinados son preserves de anchoíta que se comenzaron elaborando fundamentalmente para el mercado local y actualmente tienen un alto nivel de exportación.

Los marinados se comercializan en el país envasados generalmente con cobertura de aceite vegetal pudiéndose hallar también con el agregado de diversas especias, tales como, pimienta negra, laurel, pimentón, ají molido y se exportan envasados al vacío o en barriles con una solución débil de marinación. En España se consumen los denominados “boquerones” que son el producto de la marinación en

vinagre de una serie de especies de engráulidos, que suelen sustituirse por el consumo del producto proveniente de la Argentina y preparado de acuerdo al gusto local.

2.4.1. Marinados de *Engraulis anchoíta*

La anchoíta, como todos los productos pesqueros, es un alimento altamente perecedero y es por eso que el proceso de marinación ha sido utilizado como un método de preservación de productos de la pesca durante años.

La preservación implica crear un medio ambiente hostil para los microorganismos de forma tal de inhibir su desarrollo, reducir su supervivencia o causar su muerte (Leistner, 2000).

La marinación consiste en la inmersión de pescados enteros o en trozos en soluciones de marinación que suelen contener ácidos orgánicos y sal y que son posteriormente envasados con líquidos cobertores como aceites, salsas o salmueras. El principal efecto preservativo del proceso de marinación es el aumento de la acidez y la disminución de la actividad de agua por la incorporación de ácidos orgánicos y sal. Estas barreras son las que limitan las reacciones deteriorantes tanto enzimáticas como microbianas durante el almacenamiento de los productos pesqueros preservados mediante dicha tecnología (Meyer, 1965; Sallam et al., 2007; Yeannes & Casales, 2008). Por ejemplo, durante dicho proceso la a_w y el pH del filete de *E. anchoíta* disminuiría de 0,99 a 0,96 y de 6,4 a 4,2, respectivamente, con el consecuente aumento de la acidez (Cabrer et al., 2002).

El proceso de marinación de pescados y la estabilidad de marinados de diversas especies pesqueras ha sido estudiado en anchoítas (Fuselli et al., 1994; Cabrer et al., 2002; Günsen et al., 2011), sardinas (Gökoglu et al., 2004; Kilinc & Cakli, 2004) y en paparda del Pacífico (Sallam et al., 2007).

La calidad del producto durante el almacenamiento está determinada por los efectos de las barreras intrínsecas del proceso de marinación (bajo pH, aumento de la acidez, incorporación de sal, disminución de a_w) y de la barrera extrínseca que es el almacenamiento a bajas temperaturas (refrigeración).

Estas barreras son las que determinan la extensión de los cambios debidos al deterioro, que fueron descritos en la **Sección 2.2**. Estos cambios están relacionados también con las modificaciones en el color, la textura, el aroma y el sabor de este tipo de producto.

Los marinados de anchoíta frescos tienen un color blanquecino producto del desangrado previo a la marinación en un baño de salmuera (Yeannes & Casales, 1995; Yeannes & Casales, 2008) y del tratamiento con ácidos orgánicos durante la misma (**Figura 3.2**). Durante el almacenamiento, las modificaciones en el color son tan importantes, que éste es considerado junto con la textura, uno de los indicadores del deterioro (Yeannes et al., 2007).

Durante el deterioro se observan cambios en el color que tienden al oscurecimiento del color grisáceo blanquecino, hacia los amarillos y marrones (Yeannes & Casales, 1995; Yeannes et al., 2007). Además, si el ejemplar ha sufrido estallido ventral, es probable que dicha zona presente una coloración más oscura (rojiza) debido al contacto con las vísceras.

La textura es una propiedad muy importante del músculo de las especies pesqueras. La misma puede tornarse blanda debido a la degradación autolítica durante el deterioro ó bien, puede endurecerse por la formación de formaldehído durante el almacenamiento congelado (Huss, 1999). Asimismo, puede modificarse por los procesos tecnológicos de conservación o preservación, como por ejemplo, el proceso de marinación en *Engraulis anchoita* (Yeannes & Casales, 2008). En particular, la textura es una característica muy importante en los marinados de anchoíta, a tal punto que ha sido utilizada para determinar el grado óptimo de marinación de *Engraulis anchoita* (Yeannes & Casales, 1995; Cabrer et al., 2002). Además, su modificación se ha mencionada como un cambio característico durante el almacenamiento de productos pesqueros marinados, al observarse el ablandamiento de estos debido al deterioro (Günsen et al., 2011; Yeannes y Casales, 2008; Yeannes et al., 2007).

Los marinados son preservas que tienen una vida útil prolongada pero limitada, principalmente por la acción de la microflora característica del producto y al deterioro de sus características sensoriales (Meyer, 1965; Capaccioni et al., 2011). En la Argentina, de acuerdo a práctica del ente regulador SENASA, la vida útil de estos productos está determinada en 6 meses en refrigeración.

Por lo tanto, la aplicación de la irradiación gamma podría utilizarse para extender la vida comercial de los marinados de anchoíta, al eliminar la carga microbiana.

Debido a que los alimentos con alto contenido de lípidos, como la anchoíta, son más sensibles a la oxidación, en este trabajo se propuso envasar el producto al vacío sin aceite agregado.

Es importante mencionar que la *Engraulis anchoita* puede estar parasitada con diferentes especies de parásitos nematodos, entre los que se pueden nombrar el *Anisakis simplex* por su incidencia (Timi et al., 2001). Actualmente, de acuerdo con la resolución 91/493/EEC de la Comunidad Europea (CE, 1991) es requisito congelar durante 24 horas los ejemplares de las especies pesqueras que sean preservadas mediante marinación, a fin de destruir las larvas de parásitos nematodos presentes en la materia prima, en particular, *Anisakis simplex*. Por tales motivos, en este momento los marinados de *E. anchoita* se elaboran a partir de anchoítas congeladas. Como se mencionó anteriormente, bajas dosis de irradiación son efectivas para esterilizar parásitos, por lo cual existiría la posibilidad que el tratamiento de irradiación permitiera prescindir de la etapa previa de congelación de la materia prima, al mismo tiempo que extender la vida comercial del producto.

A su vez, la irradiación podría llegar a permitir que se prescinda del almacenamiento en refrigeración durante el transporte y el almacenamiento del producto, con la consecuente reducción de los gastos que esto involucra.

2.5 Modelos matemáticos

La posibilidad de modelar matemáticamente el efecto de las distintas dosis de irradiación sobre poblaciones microbianas y otros índices de calidad de los productos pesqueros es de suma importancia tanto para la investigación como para industria, ya que no existen antecedentes de irradiación sobre los productos analizados en esta tesis.

A su vez, la posibilidad de predecir el efecto de la irradiación gamma sobre el comportamiento microbiano permitiría reducir costos y tiempo relacionados con tests preliminares de irradiación.

La irradiación gamma ha probado tener un efecto letal sobre los microorganismos, al dañar su ADN y otros constituyentes de la célula microbiana tales como las membranas (Dickson, 2001; Josephson, 1983). Sin embargo, la resistencia a la irradiación por parte de los mismos depende de varios factores, como los parámetros del proceso, las características del microorganismo y del producto que se irradie. Las bacterias Gram negativas, que son las principales deteriorantes de los productos pesqueros (Huss, 1995), se encontrarían dentro del grupo microbiano con menor resistencia a la irradiación (Dickson, 2001; Mañas & Pagán, 2005).

Se ha observado que la respuesta de los microorganismos al tratamiento de irradiación se ajustaría a una cinética de inactivación de primer orden (Dickson, 2001; Mañas & Pagán, 2005), a partir de la cual se puede estimar la dosis de irradiación necesaria para reducir la población de un determinado grupo de microorganismos en un ciclo logarítmico (D_{10}).

La calidad, vida útil e inocuidad de los alimentos están determinadas principalmente por la presencia y el desarrollo de microorganismos deteriorantes y patógenos.

La posibilidad de desarrollar alimentos inocuos se basa en el adecuado entendimiento del comportamiento de los microorganismos frente a los agentes de inactivación. Además, es esencial el conocimiento de las relaciones entre los factores intrínsecos (pH, a_w , etc.) y extrínsecos (temperatura, atmósfera, etc.) y las respuestas de los microorganismos patógenos y deteriorantes de los alimentos para evaluar y administrar la inocuidad y vida útil de los mismos (McMeekin et al., 1993).

La cuantificación y descripción de estas relaciones mediante modelos matemáticos representa un gran beneficio para la tecnología de los alimentos ya que permiten hacer predicciones del crecimiento o descenso de los microorganismos según diferentes tratamientos (Coll Cárdenas et al., 2001; McKeekin et al., 1993; Zwietering et al., 1990).

Los modelos primarios describen la respuesta de microorganismos en función del tiempo, para un set de condiciones dado. Modelos de crecimiento, crecimiento-descenso, inactivación, modelos exponenciales, Gompertz, Logístico y Baranyi & Roberts son algunos ejemplos de éstos (McKellar & Lu, 2004). El modelo de Gompertz y el modelo de Gompertz modificado por Zwietering et al. (1990) son unos de los más utilizados para describir el crecimiento microbiano (Gibson et al. 1987; Gibson & Roberts, 1989). Los modelos secundarios describen la relación entre los parámetros de los modelos primarios y los factores ambientales como la temperatura, el pH, la a_w , las sustancias preservantes, etc. (Fakruddin et al., 2011). Los modelos terciarios son softwares basados en modelos primarios y secundarios que permiten predecir la respuesta de los microorganismos bajo diferentes condiciones (Coll Cárdenas et al., 2001).

El modelado matemático del crecimiento microbiano también representa importantes ventajas para la industria alimentaria en términos de economizar costos y tiempo. En particular, hallar una expresión matemática que prediga el efecto de la irradiación gamma sobre el comportamiento microbiano implicaría la reducción de costos y tiempo relacionados con tests preliminares de irradiación.

Además, estos modelos permitirían predecir la vida útil cuando el alimento es tratado con irradiación gamma con el propósito de extender la misma.

CAPÍTULO 3

MATERIALES

METODOLOGÍA

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. MATERIAS PRIMAS

En las distintas experiencias que se llevaron a cabo, se utilizaron diversos productos de calamar (*Illex argentinus*) y de anchoíta (*Engraulis anchoita*), los cuales fueron obtenidos modificando algunas de las variables involucradas en los procesos de elaboración.

Se utilizaron anillas de calamar sin piel, frescas ó tratadas con soluciones con polifosfatos, así como filetes marinados de anchoíta, los cuales fueron elaborados con soluciones de ácido acético en diferentes concentraciones (7 y 3% p/v).

Los diagramas de flujo de los procesos llevados a cabo en cada caso se describen en las **Figuras 3.1** y **3.2** para las anillas de calamar y los marinados de anchoíta, respectivamente.

Cabe destacar que todas las partidas de anillas de calamar y de marinados de anchoíta fueron obtenidas en empresas pesqueras locales, tal como son elaboradas y comercializadas, a fin de trabajar con productos que representen lo más fielmente posible las condiciones de la industria pesquera.

3.1.1. Experiencias realizadas con anillas de calamar

Se llevaron a cabo tres experiencias de irradiación con anillas sin piel, de manto de calamar *Illex argentinus*.

La materia prima utilizada en cada caso se describe con detalle en las diferentes secciones del **Capítulo 4**, así como los resultados del efecto de la dosis de irradiación y del tiempo de almacenamiento sobre los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales analizados en cada experiencia. Las mismas se presentan a continuación:

a) Irradiación preliminar (0, 2, 3 y 4 kGy) de anillas de calamar frescas para determinar la dosis mínima a aplicar en la posterior irradiación definitiva (**Sección 4.1**)

b) Irradiación definitiva (0, 4,8 y 8,4 kGy) de anillas de calamar frescas (**Sección 4.2**).

c) Irradiación comercial (0; 1,8; 3,3 y 5,8 kGy) de anillas elaboradas industrialmente, tratadas con poli-fosfato de sodio (**Sección 4.3**).

En la **Figura 3.1** se muestra el diagrama de flujo del tratamiento de las anillas de calamar, donde se discriminan las etapas que fueron realizadas en la planta de producción de aquellas llevadas a cabo en el laboratorio.

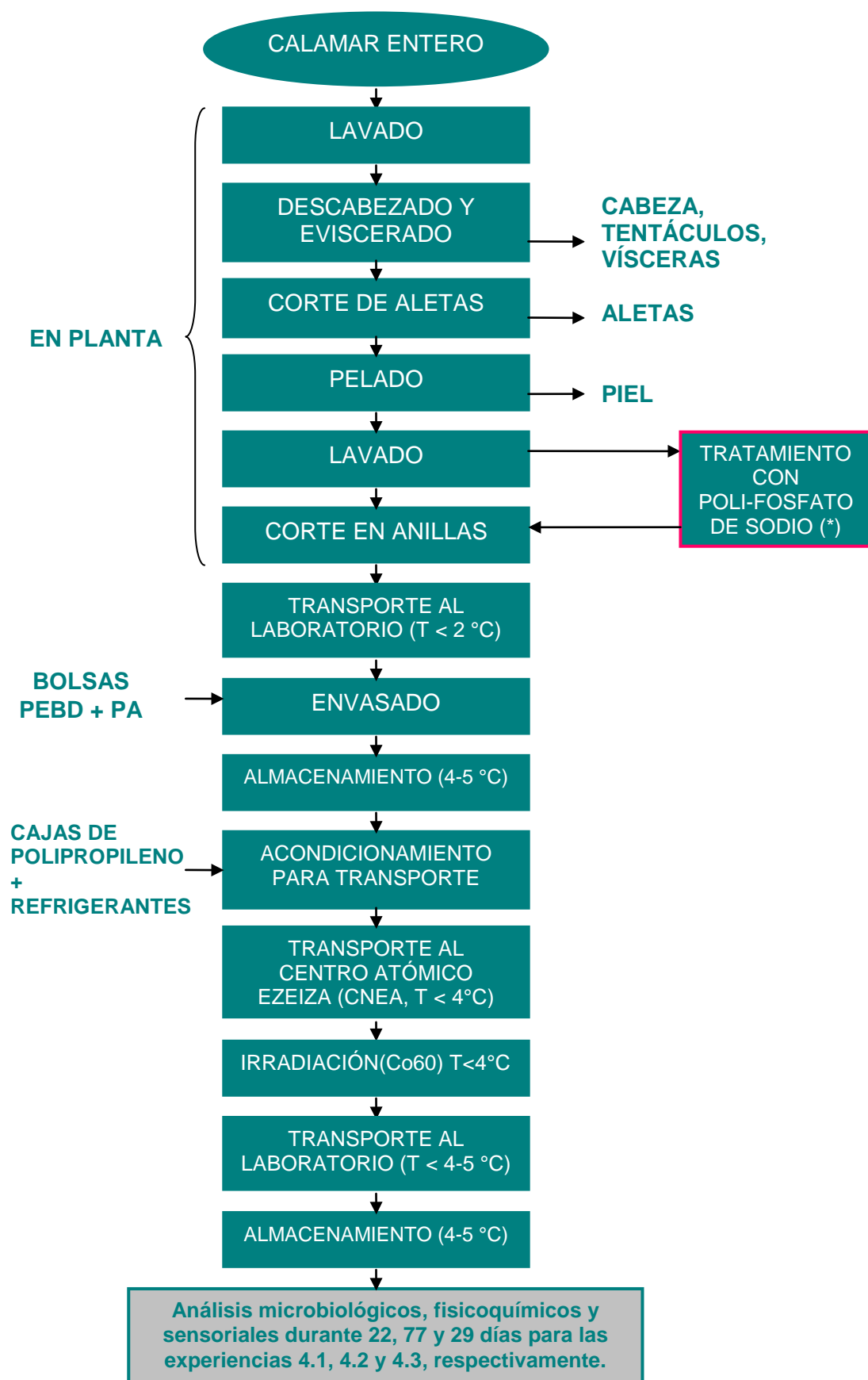


Figura 3.1. Diagrama de flujo del tratamiento de anillas de calamar. La etapa (*) es válida únicamente para la experiencia 4.3. (Elaboración propia).

3.1.2. Experiencias realizadas con filetes marinados de anchoíta

Se realizaron dos experiencias con filetes de anchoíta (*Engraulis anchoíta*) marinados, tratados con irradiación gamma. En el **Capítulo 5** se detallan las materias primas utilizadas y los resultados de dichas experiencias, considerando aspectos microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales.

También se describen los resultados de la determinación instrumental de la textura y su posterior correlación con resultados sensoriales.

Las experiencias con marinados de anchoíta fueron las siguientes:

a) Irradiación comercial (0, 1,8 y 3,3 kGy) de filetes marinados de anchoíta elaborados con una solución acuosa 7% p/v de ácido acético, envasados al vacío (**Sección 5.1**).

c) Irradiación (0, 2, 3 y 4 kGy) de filetes marinados de anchoíta elaborados con una solución acuosa 3% p/v de ácido acético, envasados al vacío (**Sección 5.3**).

El diagrama de flujo general para las distintas experiencias se muestra en la **Figura 3.2**.

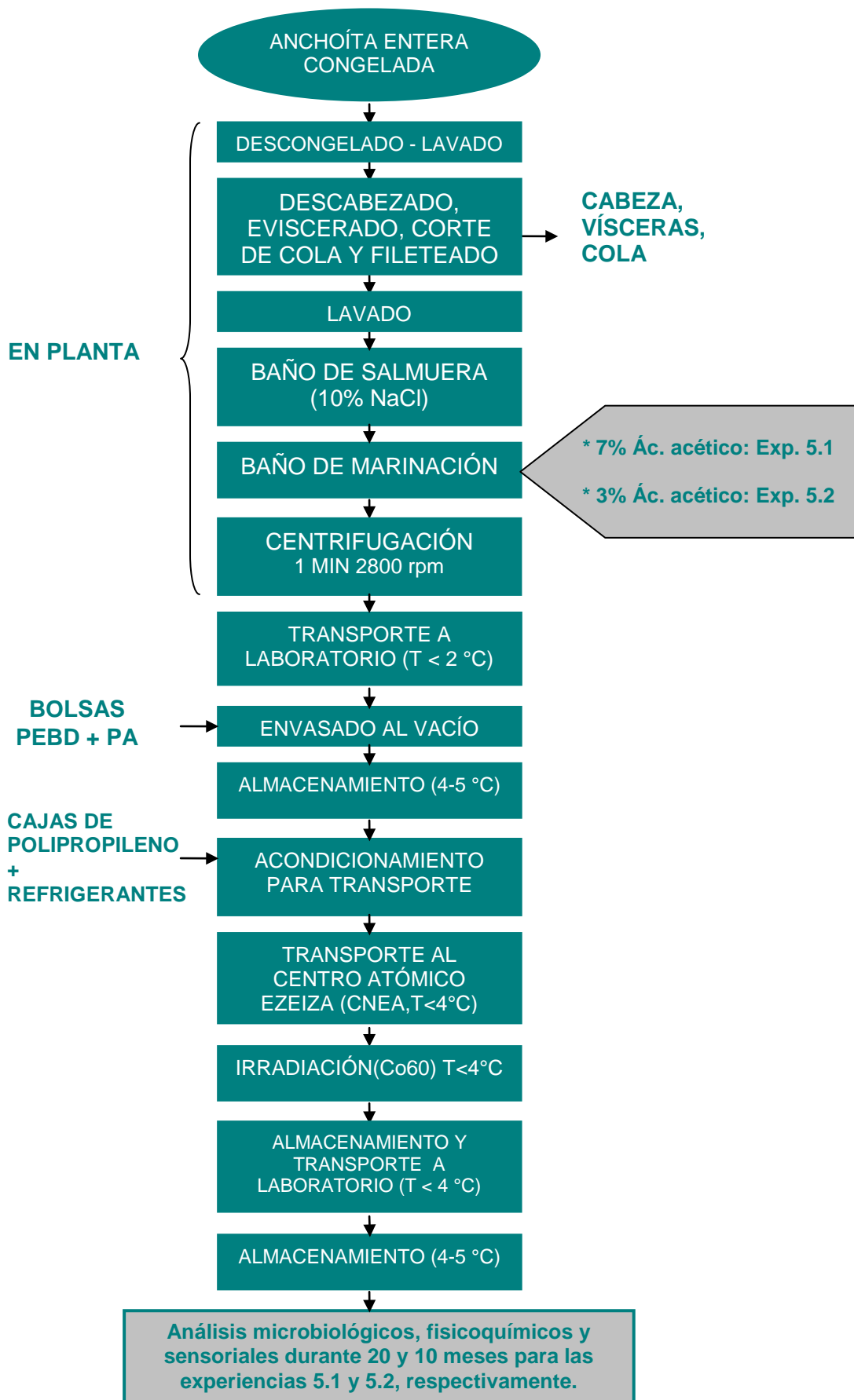


Figura 3.2. Diagrama de flujo del tratamiento de los filetes marinados de anchoíta. Elaboración propia sobre el trabajo de Yeannes & Casales (1995).

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Aplicación de la irradiación gamma

La irradiación gamma de los productos se llevó a cabo utilizando una fuente de Cobalto 60, en la planta de irradiación semi-industrial (PISI) del Centro Atómico Ezeiza, Comisión Nacional de Energía Atómica. Esta planta tiene una actividad de $2,22 \times 10^{16}$ Bq. El Becquerel es la unidad para la actividad radiactiva y representa la actividad de una cantidad de material radioactivo con decaimiento de un núcleo por segundo ($3,7 \times 10^{10}$ Becquerels equivalen a 1 Curie).

En cada experiencia de irradiación, la medición de las dosis mínimas y máximas de radiación absorbidas por las muestras, procedimiento llamado “dosimetría”, estuvo a cargo de la Sección Dosimetría de Altas Dosis, Gerencia de Aplicaciones y Tecnología de Radiaciones, Centro Atómico Ezeiza. Se colocaron dosímetros en los bultos a irradiar para medir las dosis máxima y mínima absorbidas, cuyo cociente se conoce como uniformidad de dosis. Un dosímetro es un sistema o instrumento que da una respuesta medible y reproducible al estar en un campo de irradiación, lo cual sirve para medir la dosis (OIEA, 1982).

En el caso de las experiencias de irradiación comercial se utilizaron dosímetros de Amber-Perspex, películas plásticas utilizadas en procesos de rutina que se calibran con dosímetros de referencia. Se mide espectrofotométricamente el cambio de transmisión óptica luego de irradiar. Cuando se trató de irradiaciones no comerciales (de investigación), fueron utilizados dosímetros con soluciones acuosas de dicromato de plata, utilizándose la reacción de reducción del cromo de valencia 7 a 3 en presencia de radiaciones ionizantes, medida espectrofotométricamente en la región ultravioleta del espectro, para conocer la dosis absorbida (ISO/ASTM 51401-2003 (E)).

Los productos se irradiaron una vez envasados en bolsas termosellables de PEBD (polietileno baja densidad) y PA (poliamida) para evitar la posterior recontaminación. Las muestras ya envasadas fueron colocadas en cajas de polipropileno con tapa, de $2 \pm 0,1$ cm de espesor de pared. Una vez colocadas las muestras en igual número en cada caja se distribuyó uniformemente una cantidad determinada de refrigerantes con el objetivo de mantener la temperatura por debajo de los $5 \text{ }^\circ\text{C}$ durante la irradiación y el transporte. Los refrigerantes se mantuvieron dentro de las cajas, y una vez terminado el proceso de irradiación las cajas se colocaron en la cámara refrigerada de la Sección Irradiación de Alimentos, Gerencia de Aplicaciones y Tecnología de Radiaciones ($4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

Las distintas cajas tenían igual forma y tamaño, a fin de uniformar la distribución de dosis en las mismas. Al momento de la irradiación se colocó una de las caras de cada caja (identificada como frente) ante la fuente emisora. A mitad del tiempo de irradiación estimado, la caja se giró 180° para lograr una mejor distribución de dosis.



Figura 3.3. Cajas de polipropileno conteniendo las muestras tratadas con radiación gamma

3.2.2 Análisis del efecto de la radiación gamma sobre las características microbianas, fisicoquímicas y sensoriales del producto durante el almacenamiento en refrigeración.

3.2.2.1. Análisis microbiológicos

Los siguientes análisis se realizaron para monitorear el comportamiento de la flora microbiana nativa en las anillas de calamar y los marinados de anchoíta frente a la aplicación de diferentes dosis de irradiación gamma, durante el almacenamiento en refrigeración.

Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como log UFC/g (Unidades Formadoras de Colonias por gramo de muestra).

3.2.2.1.1. Preparación de la muestras

Por tratarse de alimentos sólidos se requirió el tratamiento previo de las muestras a fin de liberar los microorganismos en un medio fluido (ICMSF, 1983). Para ello, se procesaron 10 g de muestra con 90 ml de diluyente en un homogeneizador circular (Stomacher 400). El diluyente consistía en una solución salina (0,85% NaCl) con 0,1% de peptona (ICMSF, 1983). La masa de muestra fue sacada en forma aséptica de cada envase cerrado. Los recuentos de microorganismos se realizaron por siembra en masa o en superficie según correspondiera para cada grupo en particular, considerando en cada caso el factor de dilución específico. Los recuentos de microorganismos totales y el aislamiento de los grupos microbianos determinados se realizaron utilizando los medios de cultivo y condiciones de incubación de acuerdo a ICMSF (1983).

3.2.2.1.2. Recuento de Bacterias Psicrótrofas (BP)

Como se mencionó en la **Sección 2.2**, las bacterias psicrótrofas Gram-negativas constituyen el principal grupo de microorganismos responsables del deterioro en los productos de la pesca frescos (Gram & Dalgaard, 2002; Gram & Huss, 2000; Huss, 1995) y son capaces de desarrollarse a bajas temperaturas, como las de refrigeración (2-8 °C) (ICMSF, 1983), por lo tanto, resulta de interés su seguimiento en los productos objeto de esta tesis.

Se cuantificaron las BP mediante recuento en placa, utilizando Agar para Recuento en Placa, por siembra en masa. Se incubó a $7 \pm 0,5$ °C durante 10 días (ICMSF, 1983).

3.2.2.1.3. Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas totales (BAM)

El recuento de BAM es utilizado como indicador microbiológico de la calidad higiénica de los alimentos y da una idea de la contaminación durante el procesamiento de los productos pesqueros (ICMSF, 1983). Por estas razones, resulta de interés efectuar el análisis de las mismas durante el almacenamiento de ambos productos tratados con irradiación gamma.

Se cuantificaron las BAM por recuento en placa, por siembra en masa de Agar para Recuento en Placa, incubando a $35 \pm 0,5$ °C durante 48 horas (ICMSF, 1983).

3.2.2.1.4. Recuento de *Staphylococcus* spp. Investigación de *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos suelen encontrarse en las fosas nasales y en las manos de las personas. Una inadecuada higiene y/o manipulación podría llevar a la presencia de dichas bacterias en los alimentos (ICMSF, 1983). Por dichos motivos se investigaron bacterias *Staphylococcus* spp. en las anillas de calamar y en los marinados de anchoíta.

Se cuantificaron bacterias *Staphylococcus* spp. por siembra en superficie en Agar Baird Parker (90 ml con: 6,3 ml de glicina (20% p/v), 1 ml de telurito de potasio (1%p/v), y 5 ml de yema de huevo) incubando a $35 \pm 0,5$ °C durante 48 horas (ICMSF, 1983).

Para identificación de *S. aureus* se utilizó el test de coagulasa y siembra en agar sal de manitol (ICMSF, 1983).

3.2.2.1.5. Recuento de Coliformes totales y Enterobacterias totales

Dado que los coliformes y las enterobacterias son bacterias entéricas indicadoras de contaminación, directa o indirecta, de origen fecal, se efectuó su determinación en estos productos.

Se hizo el recuento directo en placa utilizando Agar Violeta Rojo Bilis para coliformes y Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa para enterobacterias, incubando a $35 \pm 0,5$ °C durante 24 horas (ICMSF, 1983).

También se identificaron coliformes fecales en Caldo Verde Brillante Bilis incubando a $35 \pm 0,5$ °C durante 48 horas (ICMSF, 1983).

3.2.2.1.6. Investigación de microorganismos clostridios sulfito-reductores (CSR)

Los clostridios sulfito-reductores (CSR) son microorganismos del género *Clostridium* que tienen la capacidad de reducir el sulfito a sulfuro (ICMSF, 1983). A este grupo pertenecen los microorganismos patógenos *C. perfringens* y *C. botulinum* (ICMSF, 1983). Considerando que los CSR son microorganismos anaerobios, éstos podrían desarrollarse en los productos envasados al vacío (marinados de anchoíta y las anillas de calamar experiencia 4.3). Por esta razón se investigó la presencia de CSR y de *C. perfringens*. en dichos productos.

Se sembró 1 ml de muestra en Agar Sulfito Polimixina-Sulfadiazina (SPS) en placa. El medio SPS es selectivo para sulfito-reductores ya que al contener sulfito sódico, el mismo es reducido a sulfuro por la mayor parte de los *Clostridium*. A su vez, el sulfuro reacciona con el citrato de hierro, dando lugar a sulfuro de hierro, que se manifiesta por la formación de un precipitado negro alrededor de las colonias. Se incubó en jarras de anaerobiosis a $35 \pm 0,5$ °C y $46 \pm 0,5$ °C durante 48 horas. Para confirmar la presencia de *C. perfringens*, las colonias negras se confirmaron mediante cultivo en agar nitrato movilidad (ICMSF, 1983).

3.2.2.1.7. Recuento de mohos y levaduras

Los mohos y levaduras son microorganismos indicadores que pueden crecer a una mayor velocidad que las bacterias en medios más hostiles, como alimentos con baja actividad de agua y bajo pH (inferior a 5) (ICMSF, 1983), por lo tanto, se consideró apropiado investigarlos en los marinados de anchoíta.

Se realizó el recuento en placa de mohos y levaduras utilizando Agar H&L (Britania). La siembra se realizó en superficie, esparciendo con espátula. Las placas se incubaron a $25 \pm 0,5$ °C durante 5 días.

3.2.2.2. Análisis fisicoquímicos

3.2.2.2.1. Determinación del pH

El pH se midió con pH-metro digital (INSTRU, IN07601) con electrodo de vidrio, utilizando una relación muestra:agua destilada 1:1 (AOAC, 1993, Sec. 981.12). Se determinó por triplicado.

3.2.2.2.2. Determinación de la actividad de agua (a_w) y la acidez

Como se mencionó anteriormente, el principal efecto preservativo del proceso de marinación es el aumento de la acidez y la disminución de la actividad de agua por la incorporación de ácidos orgánicos y sal. Estas barreras son las que limitan las reacciones

deteriorantes tanto enzimáticas como microbianas. Por esto, resulta importante conocer dichos parámetros a fin de caracterizar los productos de marinados de anchoíta.

La a_w se midió utilizando un higrómetro digital Aqualab, modelo CX-2T (Decagon, Pullman, USA). Las determinaciones se hicieron por cuadruplicado.

La acidez de los marinados de anchoíta se determinó por triplicado por titulación con solución acuosa de 0,1 N de NaOH (Kirk et al., 1996). Los resultados se expresaron como porcentaje de ácido acético (%).

3.2.2.2.3. Determinación del contenido de agua

El contenido de agua se determinó a 105 ± 1 °C hasta peso constante (AOAC, 1993, Sec. 984.25). Se realizó por triplicado.

3.2.2.2.4. Determinación del contenido de lípidos y del perfil de Ácidos Grasos

Los lípidos de los marinados de anchoíta fueron extraídos a partir de 100 g de marinados procesados, utilizando una mezcla de solventes de cloroformo-metanol-agua destilada en una proporción 2:2:1,8 (v/v/v), de acuerdo a la técnica de Bligh & Dyer (1959). El contenido de lípidos fue determinado gravimétricamente.

El perfil de ácidos grasos de los marinados de anchoíta fue determinado mediante cromatografía gaseosa, luego de la metilación de los mismos. Para la separación y cuantificación de los metil ésteres de ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo gaseoso (Shimadzu® GC-17A, Japan) equipado con una columna capilar de sílica fundida (Omegawax 320, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) (30 m x 0.32 mm ID, 0.25 μ m fase de film) y un detector por ionización de llama. El volumen inyectado fue 1 μ L, hecho por duplicado. El gas portador fue nitrógeno. La temperatura del puerto inyector y del detector se mantuvo a 250 °C. La temperatura del horno de la columna se incrementó desde 150 a 225 °C, a una velocidad de 1,5 °C min^{-1} . Los ácidos grasos se identificaron por comparación de su tiempo de retención y las áreas de los picos utilizando como referencia un estándar (PUFA-1, Marine Source Supelco®, Cat. No. 4-7033). Los ácidos grasos fueron cuantificados como la relación de porcentaje del área de cada pico con respecto al área total.

3.2.2.2.5. Determinación del Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT)

Como se mencionó anteriormente, una de las principales modificaciones químicas luego de la captura es la acumulación de aminas volátiles en el músculo, como TMA, DMA y el amoníaco, las que se cuantifican en conjunto mediante la determinación del Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT), el cual ha sido ampliamente utilizado para evaluar la calidad del pescado y productos de la pesca (Hozbor et al., 2005; Huss, 1995; Shakila et al., 2003). Teniendo esto en cuenta es que se consideró seleccionar esta determinación para el seguimiento del estado de frescura de estos productos.

Se determinó el Nitrógeno Básico Volátil Total a las anillas de calamar y marinados de anchoíta mediante el método comercial para NBVT adaptado del método de destilación directa (Giannini et al., 1979).

Se homogeneizaron 10 g de homogenato de muestra con 300 mL de agua destilada, 2 mL de antiespumante siliconado y 5 g de óxido de magnesio. El destilado se recogió en 50 mL de solución acuosa de ácido bórico 2% p/v con 1 mL de indicador mixto (100 mL etanol, 0,05 g de rojo de metilo y 0,075 g de verde de bromocresol) hasta un volumen final de 230 mL. Luego se tituló con solución acuosa de ácido sulfúrico 0,1 N hasta el viraje del indicador a color gris. Se determinó por duplicado. Los resultados se calcularon mediante la **Ecuación 3.1** y se expresaron en miligramos de NBVT por 100 gr de muestra húmeda.

$$NBVT (mg / 100g) = \frac{V * N * 140,08}{m} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

siendo V el volumen (mL) de ácido sulfúrico utilizado en la titulación, N la normalidad del ácido sulfúrico /0,1 y m la masa (g) de muestra húmeda.

3.2.2.2.6. Determinación de la oxidación de lípidos. Sustancias reactivas al ácido 2-Tiobarbitúrico.

Dado que la oxidación de los lípidos puede producir cambios en el aroma, sabor, color, textura e incluso en el valor nutricional del alimento y teniendo en cuenta que los lípidos de las especies pesqueras se caracterizan por presentar una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que los hacen muy susceptibles a la oxidación (Huss,

1995; Ólafsdóttir et al., 1997), se consideró importante efectuar la determinación del grado de oxidación de los marinados de anchoíta.

Para ello, se determinaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre las que se encuentran algunos aldehídos que son productos secundarios de la oxidación de lípidos. Es la metodología más utilizada en productos pesqueros.

La extracción se realizó de acuerdo a lo descrito por Tironi et al. (2007). Dos gramos de homogenato de filetes marinados de anchoíta fueron homogeneizados con 16 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% p/v. Luego 2 ml de TBA al 0.5% p/v fueron agregados a 2 ml del filtrado e incubados a 70 °C durante 30 minutos (Botsoglou et al., 1994). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Shimadzu® UV-1601 PC, Kyoto, Japan) a longitudes de onda de 532 y 455 nm. Para cuantificar MDA y otros aldehídos los números de TBA-RS₅₃₂ y TBA-RS₄₅₅ se expresaron como mg de MDA y mg de ALs por kg de muestra húmeda, respectivamente. Para el cálculo de éste último se consideró el peso molecular promedio de los aldehídos más comúnmente encontrados (89,6 g mol⁻¹). Las extracciones fueron realizadas por duplicado y las incubaciones con TBA por triplicado de cada duplicado. El número de TBA-RS se determinó de acuerdo a la siguiente **Ecuación 3.2**.

$$mg\ MDA/ Kg = \frac{(Abs - B) * M * Vf * Ve * 1000}{\epsilon * l * Va * m} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

siendo Abs la absorbancia medida a 532 o 455 nm, B la absorbancia del blanco (2 mL TCA + 2 mL TBA), M el peso molecular (g mol⁻¹) del MDA o el promedio de los aldehídos, Vf (mL) el volumen final de la reacción (Va + V_{TBA}), Ve (mL) el volumen del extracto (16 mL), Va el volumen de la alícuota (2 mL), ε el coeficiente de absortividad molar (L mol⁻¹ cm⁻¹) y l el camino óptico (1 cm).

3.2.2.2.7. Determinación instrumental del color

Los parámetros de color del espacio CIELAB (CIE, 1978) L*, a* y b* fueron determinados en las anillas crudas o en la cara interna de los marinados de anchoíta con un colorímetro portátil (Lovibond, SP60, Reino Unido), utilizando Iluminante D65 y un ángulo de visión 10°. L* es una medida de la luminosidad de la muestra (0 a 100). Los valores positivos de a* (0 a 60) son una medida de la intensidad de color rojo mientras que los negativos (0 a -60) representan las tonalidades verdes. Por su parte b* mide la

intensidad de color amarillo (valores positivos de 0 a 60) y azul (valores de 0 a -60). De cada muestra se tomaron 5 anillas o filetes y a cada uno se le realizaron 3 determinaciones de los parámetros de color.

Estos resultados se utilizaron en la ecuación de diferencia de color CIEDE2000 (CIE, 2001) para calcular la diferencia de color de cada muestra con respecto al día previo a la irradiación.

3.2.2.2.8. Análisis instrumental de la textura de marinados de anchoíta

Si bien la textura ha sido determinada sensorialmente para evaluar la calidad del pescado, se han desarrollado métodos instrumentales que permiten correlacionar con los resultados sensoriales. Como por ejemplo, ensayos de corte con cuchilla, ensayos de compresión, etc. (Huss, 1995).

Se analizó la textura a marinados de anchoíta envasados al vacío, tratados con irradiación gamma.

Para ello se determinó la textura por ensayo de corte con cuchilla a filetes de anchoíta marinados envasados al vacío y tratados con irradiación gamma a dosis de 0, 2, 3 y 4 kGy, luego de 6 meses de almacenamiento a 4-5 °C.

Se utilizó un analizador de textura TX-T2i (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, UK), controlado por el software Texture Expert® (CIDCA, La Plata), con una celda de carga de 25 kg y una sonda de tipo cuchilla de 3 mm de espesor y 70 mm de longitud para realizar cortes transversales de los filetes en la parte media del filete. La velocidad pre y post-ensayo fue 3 mm/s, la velocidad de ensayo 0,5 mm/s y la distancia 20,0 mm.

Los filetes de anchoíta marinados, de $4,4 \pm 0,4$ mm de espesor y $17,4 \pm 1,3$ mm de ancho ($n=60$) fueron cortados para uniformar la longitud de los mismos en 80 mm. La determinación se realizó sobre 13 filetes de cada muestra. Se obtuvieron gráficos de fuerza de corte (N) en función del tiempo (s), a partir de los cuales se determinó la fuerza máxima de corte, que se define como la fuerza máxima necesaria para cortar la muestra (N) y el trabajo de corte, que es el trabajo requerido para mover la cuchilla a través de la muestra y se calcula como el área debajo de la curva fuerza-tiempo (Ns).

3.2.2.3. Análisis sensorial

3.2.2.3.1. Aceptabilidad sensorial

Los análisis sensoriales se realizaron en base a las descripciones de ASTM (1968). Se evaluó la aceptabilidad sensorial de los marinados de anchoíta y de las anillas de calamar mediante el test de aceptabilidad tipo panel piloto de acuerdo a las consideraciones de Witting de Penna (2001), a fin de conocer la posible reacción del potencial consumidor frente a estos nuevos productos irradiados.

La aceptabilidad de ambos productos irradiados y de las muestras control correspondientes en cada caso (mismo producto sin irradiar, almacenado en iguales condiciones) fue evaluada por 50 panelistas no entrenados, usuales consumidores de este tipo de productos en diferentes fechas posteriores a la irradiación. En el caso de la irradiación preliminar, se utilizaron 12 panelistas para conocer a priori la aceptabilidad de los nuevos productos antes del ensayo formal.

Para evaluar los atributos aceptabilidad global, apariencia, color, aroma, sabor y textura, los panelistas utilizaron una escala hedónica verbal de 9 puntos, en la que el mayor valor de agrado correspondía a *me gusta muchísimo* y el de menor agrado a *me disgusta muchísimo*. La escala utilizada se estableció a partir de la traducción al español de la escala hedónica de 9 puntos desarrollada por Peryam & Pilgrim (1957), la cual fue consensuada entre los colegas del laboratorio, de forma tal de minimizar y evitar ambigüedades, teniendo en cuenta las consideraciones de Curia et al. (2001).

En la siguiente tabla se muestra la escala utilizada con los correspondientes valores asignados.

Tabla 3.1. Escala hedónica verbal utilizada para evaluar la aceptabilidad de anillas de calamar y marinados de anchoíta.

Escala verbal	Puntaje
Me gusta muchísimo	9
Me gusta mucho	8
Me gusta	7
Me gusta poco	6
No me gusta ni me disgusta	5
Me disgusta poco	4
Me disgusta	3
Me disgusta mucho	2
Me disgusta muchísimo	1

Los marinados de anchoíta fueron servidos a temperatura ambiente (18 ± 1 °C), sin ningún tratamiento posterior. Se sirvieron 4 filetes (20 g aproximadamente) en cada uno de los recipientes de polipropileno con tapa, codificados con números de 3 cifras utilizando la Tabla de números al azar (ICMSF, 1983).

Para las evaluaciones de anillas de calamar, las mismas fueron preparadas según el protocolo previamente seleccionado que se describe a continuación. Luego fueron servidas a temperatura ambiente en recipientes cerrados y codificados. Se sirvieron 2 anillas (12 g aproximadamente) en cada uno, cubiertas con aceite especiado (15 g aproximadamente).

La evaluación se llevó a cabo en cabinas individuales aproximadamente 2 horas antes del almuerzo.

Se solicitó a los panelistas que probaran de a una muestra por vez, y se les ofreció agua y galletitas crackers sin sal para que limpiaran el paladar entre las muestras.

En la siguiente imagen (**Figura 3.4**) se muestra como fueron presentadas las muestras y la planilla de evaluación a los panelistas.



Figura 3.4. Presentación de las anillas de calamar y planilla evaluación sensorial.

3.2.2.3.1.1. Determinación del protocolo de preparación de las anillas de calamar para el test de aceptabilidad

Se realizaron ensayos para determinar el protocolo de preparación de las anillas para la evaluación. Se decidió cocer las anillas mediante hervor en agua y colocarlas, una vez frías, en inmersión en aceite vegetal levemente especiado.

Para ello se analizaron diferentes tiempos de cocción en agua hirviendo en una relación agua:anillas:sal (100:10:1) durante 3, 5, 7, 10, 13, 16 y 20 minutos. Panelistas con experiencia en productos pesqueros seleccionaron el tiempo óptimo de cocción basándose en la textura y el sabor, determinando que el mismo fuera 10 minutos.

Se utilizó aceite de girasol para formular distintos aceites especiados, usando diferentes concentraciones y combinaciones de pimienta negra en granos, hojas secas de romero y de laurel. Se seleccionó la formulación con 0.27%p/v de romero y 1.5%p/v de pimienta negra en granos, por presentar un sabor suave que no enmascarara el sabor típico del calamar. El aceite se preparó colocando las especias y calentando a 45°C durante dos horas. Luego se mantuvo durante 20 horas a 18 ± 1 °C y posteriormente fue filtrado. Las anillas hervidas se colocaron en aceite especiado durante 18 horas a 4-5 °C previo a la evaluación.

3.2.2.3.2. Determinación sensorial de la textura de marinados de anchoíta mediante análisis descriptivo

Por lo mencionado anteriormente (**Sección 3.2.2.2.8.**) en cuanto a la importancia de la textura en los marinados de anchoíta, se llevó a cabo la determinación sensorial de la misma durante el almacenamiento en refrigeración.

Para ello, se trabajó con 7 panelistas entrenados de entre 30 y 60 años, con amplia experiencia en la evaluación sensorial de productos pesqueros, que estaban previamente entrenados en el método de perfil de textura (Norma IRAM 20005-1/2, 1996; Civille y Szczesniak, 1973).

Los panelistas evaluaron el descriptor *dureza al corte*, el cual fue definido y consensuado entre ellos como la *fuerza requerida para cortar transversalmente la parte media del filete, valiéndose de un tenedor metálico*, representando así con un utensilio cotidiano las condiciones del ensayo instrumental.

Se utilizó una escala continua de 0 a 10 en orden creciente de intensidad de dureza. Los panelistas consensuaron los extremos y anclajes de la escala utilizada. El puntaje 10 representaba la mayor dureza, cuya referencia correspondía a la dureza de un filete de anchoíta crudo sin marinar. El puntaje 5 representaba la dureza típica del

producto marinado. Se tuvo en cuenta la tabla desarrollada por Yeannes & Casales (1995) para determinar el grado de marinación de filetes de *E. anchoita* basándose en la condición de la textura, donde se define el grado óptimo de marinación como una textura firme y consistente que se corta fácilmente con tenedor. Asimismo, en dicho trabajo se define a la textura del pescado crudo como dura y resistente al corte, que se corta únicamente con cuchillo.

Los marinados de anchoíta fueron servidos a temperatura ambiente (18 ± 1 °C), presentándose en un tamaño similar al utilizado en los ensayos de corte para permitir comparaciones más precisas con los resultados instrumentales.

Se sirvieron 4 filetes (20 g aproximadamente) de cada muestra en platos plásticos, codificados con números de 3 cifras utilizando la Tabla de números al azar (ICMSF, 1983). Las evaluaciones se llevaron a cabo en cabinas de evaluación sensorial individuales, preparándose cada una con un tenedor metálico y la hoja de respuestas.

Los marinados irradiados y sin irradiar fueron evaluados a los 5, 125, 180, 240 y 330 días posteriores a la aplicación de la irradiación gamma.

3.2.3 Análisis estadístico de datos. Correlaciones

Para el análisis estadístico de los resultados microbiológicos, fisicoquímicos e instrumentales (pH, humedad, a_w , NBVT, TBA-RS, textura, color (L^* , a^* , b^* y DE2000)) se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado. Se aplicó el análisis de varianza factorial (ANOVA) con dos factores (dosis de irradiación (kGy) y tiempo de almacenamiento (días)) para analizar el efecto de los mismos, así como el de la interacción entre ellos. Posteriormente se compararon las medias mediante el Test de Tukey ($p < 0,05$).

Los resultados de los tests de aceptabilidad sensorial fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,05$), ya que se utilizaron escalas categóricas. Se utilizó el software R project (R Development Core Team, 2008).

Los recuentos de bacterias psicrótrofas en anillas de calamar se correlacionaron con los valores de NBVT mediante regresión polinomial usando OriginPro®.

Los resultados sensoriales e instrumentales de la determinación de textura de los marinados de anchoíta, fueron correlacionados mediante regresión lineal (OriginPro® versión 8).

3.2.4 Ajuste de modelos matemáticos.

Se ajustaron distintas ecuaciones matemáticas para modelar el comportamiento de la irradiación gamma sobre la flora psicrotropa y el NBVT durante el almacenamiento en refrigeración de anillas de calamar.

3.2.4.1. Modelado de la inactivación de la flora psicrotropa inducida por la irradiación gamma. Determinación del valor D_{10} .

Se utilizó una cinética de primer orden para modelar la inactivación de microorganismos psicrotrophos debido a la irradiación gamma, reemplazando la variable tiempo por la dosis de irradiación (d) en la **Ecuación 3.3**, donde $N(d_0)$ y $N(d)$ son los números de microorganismos psicrotrophos antes del tratamiento de irradiación y luego del mismo para una determinada dosis, respectivamente. Los valores de la constante de velocidad, k (kGy^{-1}) para un set determinado de condiciones fueron obtenidos a partir de la regresión lineal de $\log [N(d)/N(d_0)]$ versus dosis de irradiación. El valor D_{10} para microorganismos psicrotrophos se determinó calculando la inversa de la pendiente ($1/k$)

$$\log [N(d)/N(d_0)] = -k \cdot d \quad \text{Ecuación 3.3}$$

3.2.4.2. Modelado del crecimiento de la flora psicrotropa durante el almacenamiento en refrigeración. Predicciones de la vida útil y validación del modelo

En esta experiencia, se utilizaron dos abordajes basados en el modelado empírico del crecimiento de la flora psicrotropa superviviente en anillas de calamar envasadas al vacío durante el almacenamiento a 4-5 °C, a fin de predecir la extensión de la vida útil merced a la utilización de la irradiación gamma:

3.2.4.2.1. Modelo de Gompertz modificado

Los datos experimentales de las curvas de crecimiento microbiano para cada dosis de irradiación estudiada (0, 1,8; 3,3 y 5.8 kGy) se ajustaron a un modelo primario de crecimiento, la ecuación de Gompertz modificada (Zwietering et al., 1990):

$$\log N = \log N_0 + A \exp \left[- \exp \left(\frac{\mu e}{A} (L - t) \right) + 1 \right] \quad \text{Ecuación 3.4}$$

donde $\log N$ es el logaritmo decimal del número de bacterias psicrótrofas en el tiempo t y $\log N_0$ el recuento de psicrótofos el día posterior a la irradiación ($\log \text{UFC/g}$), μ es la velocidad de crecimiento específica ($\log \text{UFCg}^{-1} \text{ día}^{-1}$), L es la duración de la fase de demora en el crecimiento (días), A es el logaritmo del aumento de la población microbiana (diferencia entre la asíntota superior $-\log N$ cuando el tiempo t tiende a infinito y los recuentos iniciales) y siendo e , el número de Euler (2,7182 aproximadamente).

Los datos fueron ajustados a la ecuación de Gompertz modificada mediante regresión no lineal (utilizando el algoritmo de Marquardt) con el software OriginPro® versión 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA). El ajuste y la precisión de las estimaciones de los datos obtenidos para cada dosis de irradiación se evaluaron mediante la raíz del error cuadrático medio (RMSE) y el coeficiente de determinación (R^2). Teniendo en cuenta que la RMSE es una medida de la discrepancia entre los datos y la estimación del modelo, un valor pequeño indicaría un ajuste adecuado del modelo. La RMSE se calculó mediante la siguiente ecuación (**Ec. 3.5**), donde X_{ip} es el valor predicho, X_i es el valor experimental y n es el número de pares de datos:

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_{ip} - X_i)^2} \quad \text{Ecuación. 3.5}$$

A fin de predecir los recuentos de bacterias psicrótrofas para diferentes dosis de irradiación fue necesario hallar una ecuación que relacionara los parámetros cinéticos del modelo de Gompertz (μ , L y A) con la dosis. Los datos fueron ajustados a ecuaciones polinómicas de segundo orden, para hallar modelos secundarios que describieran la influencia de la dosis de irradiación (d) sobre los parámetros cinéticos: $\mu = \mu_1 + \mu_2 d + \mu_3 d^2$; $L = L_1 + L_2 d + L_3 d^2$ y $A = A_1 + A_2 d + A_3 d^2$.

Luego, se desarrolló un modelo completo (modelo completo de Gompertz modificado, MCGM) introduciendo la ecuación de inactivación (**Ec. 3.3**) y los modelos secundarios en la ecuación de Gompertz (**Ec. 3.4**).

3.2.4.2.2. Modelo polinomial

Se utilizó la regresión polinomial de orden 2 para ajustar los datos experimentales a una ecuación empírica a fin de describir la dependencia de crecimiento de psicrótofos

sobrevivientes con la dosis de irradiación y el tiempo de almacenamiento. Se propuso el siguiente modelo polinómico (**Ecuación 3.6**):

$$y = \beta_0 + \beta_1\chi_1 + \beta_2\chi_2 + \beta_3\chi_1^2 + \beta_4\chi_2^2 + \beta_5\chi_1\chi_2 \quad \text{Ecuación 3.6}$$

donde es el logaritmo del recuento de bacterias psicrótrofas (log UFC/g), χ_1 y χ_2 son las variables independientes dosis de irradiación (kGy) y tiempo de almacenamiento (días), respectivamente, β_0 es el coeficiente independiente, β_1 y β_2 son los términos lineales, β_3 y β_4 son los términos cuadráticos y β_5 es el coeficiente de interacción.

Se estudió la precisión de las estimaciones del modelo ajustado y la significancia de los términos lineales, cuadráticos y la interacción en el modelo global mediante el análisis de varianza (ANOVA) de los modelos polinómicos utilizando el software R-project (R Development Core Team, 2008).

Se utilizó el error porcentual promedio relativo (EPr) para comparar el ajuste del modelo polinomial y el ajuste del MCGM a los datos experimentales, el cual se calculó teniendo en cuenta el número de datos analizados (n), mediante la **Ecuación 3.7**:

$$E Pr = 100 \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{\text{Valor Experimental} - \text{Valor Calculado}}{\text{Valor Experimental}} \right| \quad \text{Ecuación 3.7}$$

3.2.4.2.3. Validación del modelo seleccionado

Se utilizó un set de datos independientes para validar el modelo que permitiera los ajustes más precisos y para evaluar la precisión de las predicciones de la vida útil. Para ello se utilizaron los resultados de la irradiación definitiva de anillas de calamar (**Sección 4.2**). Las predicciones de la población de bacterias psicrótrofas luego de la irradiación (log UFC/g) fueron graficadas con los datos experimentales para analizar su correlación. A su vez, la predicción de la vida útil de las anillas irradiadas con 4,8 kGy fue comparada con el valor hallado experimentalmente.

3.2.4.3. Modelado de la producción de NBVT en anillas de calamar irradiadas, durante el almacenamiento en refrigeración.

En esta experiencia se planteó la posibilidad de modelar la producción de bases nitrogenadas volátiles utilizando un modelo de crecimiento microbiano, la ecuación de Gompertz modificada por Zwietering et al. (1990).

Para ello, los resultados de las curvas experimentales de producción de NBVT fueron ajustados al modelo de Gompertz modificado (Zwietering et al., 1990), en la que se reemplazó el log N por NBVT (mgN 100g⁻¹):

$$NBVT = NBVT_0 + A \exp \left[- \exp \left(\frac{\mu e}{A} (L - t) \right) + 1 \right] \quad \text{Ecuación 3.8}$$

donde NBVT₀ es el valor de NBVT inicial, μ es la velocidad de producción de NBVT (mg 100g⁻¹ día⁻¹), L es la duración de la fase en que no hay cambios en el valor inicial de NBVT (días), A es el aumento de NBVT y e es el número de Euler (2,7182 aproximadamente).

Los datos fueron ajustados a la ecuación de Gompertz modificada mediante regresión no lineal, utilizando el algoritmo de Marquardt (Origin Pro 8.8, OriginLab Corporation, Northampton, MA). El ajuste y la precisión de las estimaciones de los datos obtenidos para cada dosis de irradiación se evaluaron mediante el coeficiente de determinación (R²).

Se llevó a cabo un procedimiento similar al descrito en el modelado de bacterias psicrótrofas. Para predecir los valores de NBVT para diferentes dosis de irradiación se hallaron ecuaciones, los datos fueron ajustados a ecuaciones polinómicas de segundo orden ($\mu = \mu_1 + \mu_2 d + \mu_3 d^2$; $L = L_1 + L_2 d + L_3 d^2$ y $A = A_1 + A_2 d + A_3 d^2$) que relacionaran los parámetros cinéticos del modelo de Gompertz (μ , L y A) con la dosis. Luego, se desarrolló un modelo completo (modelo completo de Gompertz modificado, MCGM) introduciendo los modelos secundarios en la ecuación de Gompertz (**Ecuación 3.8**).

Se utilizó el error porcentual promedio relativo (EPr) mediante la **Ecuación 3.7** para comparar el ajuste del modelo polinomial y el ajuste del MCGM a los datos experimentales.

Posteriormente el modelo fue validado utilizando un set de datos independientes, utilizándose los resultados de la irradiación definitiva de anillas de calamar (**Sección 4.2**). Las predicciones de NBVT (mg 100g⁻¹) fueron graficadas contra los datos experimentales para analizar su correlación.

CAPÍTULO 4

**Anillas de calamar preservadas
con irradiación gamma**

.....

**Aspectos microbiológicos,
fisicoquímicos y sensoriales.**

.....

**Modelado matemático de la
cinética de inactivación, el
crecimiento microbiano y la
producción de bases nitrogenadas
volátiles en anillas de calamar
irradiadas.**

En este Capítulo se describen las experiencias de irradiación llevadas a cabo con anillas de calamar *Illex argentinus*, las cuales consistieron en una irradiación preliminar, una irradiación definitiva y una irradiación comercial.

El las experiencias preliminar (**Sección 4.1**) y definitiva (**Sección 4.2**) se llevó a cabo una irradiación con fines de investigación utilizando anillas de calamar frescas y se analizaron diferentes aspectos relacionados con la calidad durante el almacenamiento en refrigeración.

Teniendo en cuenta que las anillas además de comercializarse frescas, son procesadas en la industria con poli-fosfatos, se decidió analizar el efecto de una irradiación comercial (**Sección 4.3**) sobre anillas procesadas industrialmente, para representar de la mejor manera posible la aplicación práctica de esta tecnología.

A partir de los datos de las experiencia mencionadas se desarrolló un modelo de inactivación de la flora psicrótrofa en función de la dosis de irradiación, así como un modelo del comportamiento de la flora psicrótrofa sobreviviente durante el almacenamiento en refrigeración (**Sección 4.4**).

Asimismo, se modeló la producción de las bases nitrogenadas volátiles en función de la dosis de irradiación, durante el almacenamiento (**Sección 4.5**).

IRRADIACIÓN PRELIMINAR DE ANILLAS DE CALAMAR SIN PIEL

4.1 Irradiación preliminar de anillas de calamar sin piel

El objetivo principal de esta experiencia preliminar fue analizar la posibilidad de hallar una *dosis mínima* de irradiación que permitiera eliminar microorganismos deteriorantes y patógenos en anillas de calamar sin piel, sin modificar sus características sensoriales (IAEA, 2000).

Para determinar la misma, se analizó el efecto de diferentes dosis de irradiación gamma sobre aspectos sensoriales, microbiológicos y fisicoquímicos de anillas de calamar *Illex argentinus*, durante su almacenamiento en refrigeración (4-5 °C).

La selección de la dosis para irradiar productos pesqueros depende de varios factores, ya que cada alimento tiene diferentes requerimientos para conseguir una extensión de su vida útil. Existe una amplia compilación de experiencias de irradiación de alimentos a ser considerada como un primer paso en el proceso de selección (Arvanitoyannis et al., 2010; Kilcast, 1995; IAEA, 2000). Con respecto a los productos pesqueros, se han aplicado dosis menores a los 7 kGy con resultados satisfactorios en cuanto a la extensión de la vida útil observándose que dosis de entre 0 y 4 kGy resultan suficientes para conseguir dicho objetivo en los mismos (Arvanitoyannis et al., 2010; Foley, 2006; IAEA, 2000; Lescano et al., 1990). Con respecto al calamar, cuando se comenzó este estudio se conocía que la irradiación gamma había sido aplicada en un producto de calamar *Todarodes pacificus* salado y fermentado a 15 °C (Byun et al., 2000), el cual presenta características muy diferentes a las de las anillas frescas utilizadas en esta experiencia.

Por lo tanto, tomando como base los antecedentes bibliográficos, en esta irradiación preliminar de anillas de *Illex argentinus* se utilizaron dosis de 2, 3 y 4 kGy.

4.1.1 Tratamiento de la materia prima y metodología utilizada

Ejemplares de *Illex argentinus* capturados en el Océano Atlántico Sudoccidental (alrededor de 44 °S), en el mes de Noviembre, fueron desembarcados en el puerto de Mar del Plata. Como se muestra en el diagrama de flujo de la **Sección 3.1.1**, los calamares se descabezaron, evisceraron, pelaron mecánicamente y lavaron en una

planta de procesamiento de la ciudad. Los tubos de calamar pelados fueron transportados al laboratorio en bolsas de polietileno, contenidas en recipientes de polipropileno con hielo en escamas. En el laboratorio se lavaron y cortaron en anillas de $1,5 \pm 0,2$ cm de espesor. El contenido de agua de las mismas fue $80,6 \pm 1,0$ mg/100g. Las anillas (250 ± 3 g, aproximadamente 50 anillas) se envasaron en bolsas termosellables de polietileno de baja densidad (PEBD) y poliamida (PA) de 75 micrómetros de espesor (Cryovac®) utilizando una cerradora Minimax 430M (Servivac, Argentina).

La irradiación gamma se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en el **Capítulo 3**. Las muestras se irradiaron a 0, 2, 3 y 4 kGy, con una velocidad de dosis de 10,9 kGy/h. Para determinar las mínimas dosis absorbidas se utilizaron dosímetros con soluciones acuosas de dicromato de plata. Durante el transporte y la irradiación las muestras no superaron los 4-5 °C. Las anillas fueron almacenadas en refrigeración (4-5 °C), siendo analizadas previo a la irradiación y los días 1, 6, 15 y 21 posteriores a la misma. Se contó con 6 muestras (bolsas de 250 g) para cada fecha de análisis y cada dosis de irradiación, para hacer una réplica del experimento.

Se determinó el pH, el NBVT y el color. Se realizaron recuentos de bacterias aerobias mesófilas y psicrótrofas totales, coliformes totales y fecales, enterobacterias, *Staphylococcus* spp. y Clostridios sulfito reductores (CSR). Se analizó la aceptabilidad sensorial de las anillas según lo descrito en el **Capítulo 3**, utilizando 12 panelistas, por tratarse de una experiencia preliminar.

El análisis estadístico se realizó de acuerdo a lo descrito en el **Capítulo 3**, siendo los factores del ANOVA la dosis (0, 2, 3 y 4 kGy) y los días de almacenamiento (0, 1, 6, 15 y 21).

4.1.2 Resultados y discusión

4.1.2.1 Aspectos microbiológicos

El comportamiento de las bacterias psicrótrofas (BP) y bacterias aerobias mesófilas (BAM) en anillas de calamar irradiadas durante el almacenamiento a 4-5 °C se presenta en las **Figuras 4.1.1**.

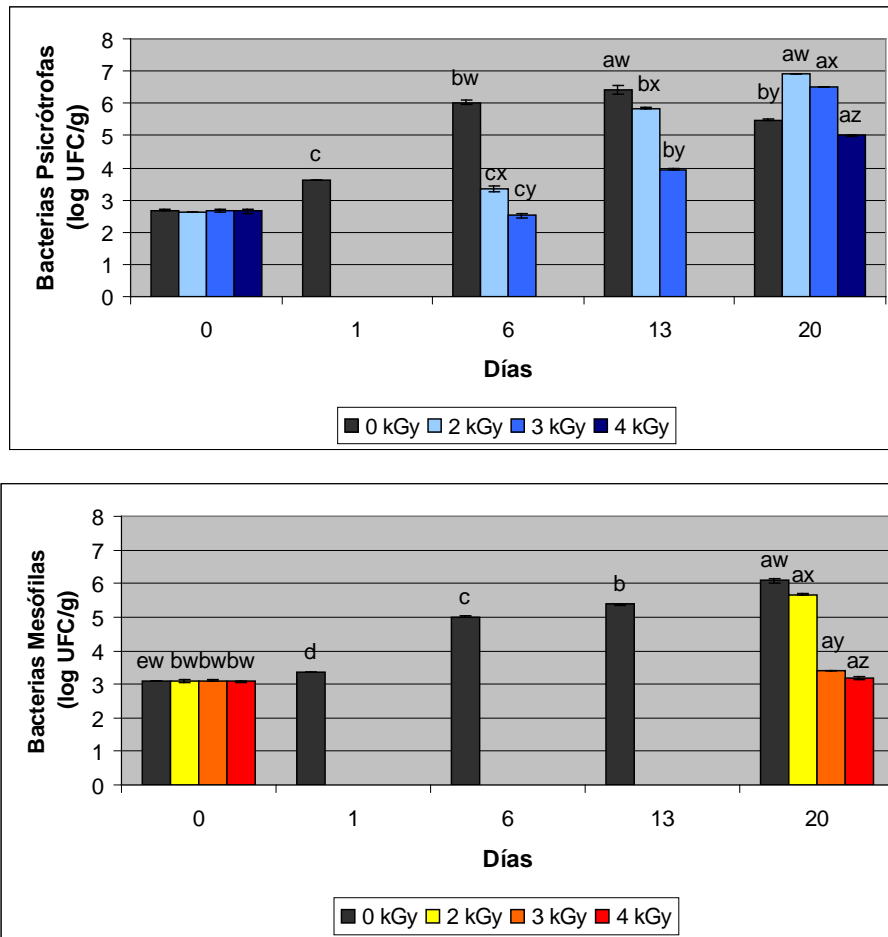


Figura 4.1.1. Evolución de bacterias psicrótrofas y mesófilas durante almacenamiento a 4-5 °C de anillas de calamar irradiadas. Letras (a, b, c, d, e) y (w, x, y, z) diferentes indican diferencias debido al tiempo de almacenamiento y a la dosis, respectivamente ($p < 0,05$).

El recuento inicial de bacterias psicrótrofas fue $4,5 \times 10^2 \pm 2,0 \times 10^1$ UFC/g, que concuerda con lo observado en calamar *Loligo plei* y *Loligo formosana* fresco (Lapa-Guimaraes et al., 2002; Sungsi-in et al., 2011). Los cambios que tuvieron lugar posteriormente sobre esta población estuvieron relacionados con el tiempo de almacenamiento y con el efecto de la irradiación gamma.

En la evaluación microbiológica determinada al día siguiente de la irradiación se observó que la población inicial de BP fue reducida a valores menores al límite de detección (< 10 UFC/g), por todas las dosis aplicadas obteniéndose reducciones de más de dos ciclos logarítmicos en estos recuentos.

En las anillas irradiadas con 2 y 3 kGy se observó desarrollo de BP luego de 6 días de almacenamiento en refrigeración, mientras que en aquellas irradiadas con 4 kGy se detectó a los 20 días.

En las anillas sin irradiar, el recuento de BP aumentó significativamente ($p < 0,05$) durante el almacenamiento en refrigeración, hasta alcanzar un valor de $2,4 \times 10^6$ UFC/g

luego de 13 días. Este resultado es similar al hallado en calamar *Loligo plei* por Lapa-Guimaraes et al, (2005) quienes observaron un incremento de la flora psicrótrófa desde 8×10^2 hasta 5×10^6 UFC/g, luego de 12 días de almacenamiento en hielo.

El recuento de BP fue significativamente mayor en las anillas sin irradiar en comparación con las irradiadas ($p < 0,05$), durante el almacenamiento a 4-5 °C.

Como puede observarse, el recuento de BP durante el almacenamiento en refrigeración dependió de la dosis de irradiación. A mayor intensidad de dosis menores recuentos microbianos. Estos resultados concuerdan con lo que fuera observado en otros productos pesqueros tratados con radiación gamma, como salmón ahumado en frío (Badr, 2012) y besugo (*Dicentrarchus labrax*) entero almacenado a 4 °C (Özden et al., 2007). Sin embargo, no se hallaron resultados sobre la inactivación de bacterias psicrótrofas inducida por la irradiación, en calamar fresco.

Como se mencionó en la **Sección 2.2**, se ha establecido que el límite microbiológico recomendado para pescado y moluscos fresco es un valor de recuento total en placa de bacterias psicrótrofas de 10^6 UFC/g (ICMSF, 1983).

Teniendo en cuenta este valor, se puede decir que la irradiación gamma con 2, 3 y 4 kGy permitió extender la vida útil microbiológica de anillas de calamar en refrigeración en aproximadamente 6, 14 y más de 14 días, respectivamente, comparando con la anillas sin irradiar.

Con respecto a las bacterias aerobias mesófilas (BAM), se observó una población inicial de $1,2 \times 10^3 \pm 2,0 \times 10^1$ UFC/g.

De acuerdo con los análisis microbiológicos correspondientes al día posterior a la irradiación, la población inicial resultó totalmente inactivada por la todas las dosis de irradiación gamma aplicadas, obteniéndose reducciones de esta flora superiores a los 3 ciclos logarítmicos. En esta experiencia se consiguió una reducción de mesófilos similar a aquella observada por Kim et al. (2012) en calamar, en el que los mismos fueron reducidos en 1,7 ciclos por el efecto de 1 kGy de irradiación gamma. Por otra parte, Lescano et al. (1990) hallaron en merluza *Merluccius hubbsi* fresca, que la flora mesófila inicial ($4,4 \times 10^4$ UFC/g) fue reducida en más de dos ciclos logarítmicos por la irradiación gamma a 3,3 kGy.

En las anillas sin irradiar el recuento de las BAM aumentó durante 20 días de almacenamiento refrigerado hasta $1,2 \times 10^6$ UFC/g, siendo significativamente mayor ($p < 0,05$) a los de las anillas irradiadas durante todo este período.

En las anillas irradiadas no se detectó desarrollo de BAM durante los trece días posteriores a la irradiación. Como puede observarse, a los 20 días se detectaron recuentos, siendo mayores ($p < 0,05$) cuanto menor fue la dosis de irradiación.

Los valores de BAM fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) a los de las anillas irradiadas durante todo el período de almacenamiento a 4-5 °C.

Dentro de las bacterias aerobias mesófilas se investigó la presencia de enterobacterias y coliformes totales, siendo sus recuentos iniciales de $4,0 \times 10^2$ y $2,3 \times 10^2$ UFC/g, respectivamente, los que se encuentran dentro del rango de aptitud microbiológica para este tipo de productos (Moragas Encuentra & De Pablo Busto, 2008). Asimismo estos resultados son similares a los hallados por Paarup et al. (2002b) quienes detectaron recuentos del género *Enterobacteriaceae* del orden de 1×10^3 UFC/g en calamar *Todaropsis eblanae* envasado al vacío.

Estos grupos microbianos fueron inactivados por la irradiación gamma a 2, 3 y 4 kGy y no se detectó desarrollo de los mismos durante los 20 de almacenamiento en refrigeración. En el mismo período, se observó en las anillas sin irradiar un aumento significativo ($p < 0,05$) de la población de enterobacterias y de coliformes totales hasta $4,7 \times 10^5$ y $2,2 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente.

La total inactivación de estos grupos microbianos durante 20 días de almacenamiento se explicaría porque las enterobacterias y los coliformes son bacterias Gram negativas cuya resistencia a la irradiación se encontraría entre las más bajas para los distintos grupos de microorganismos (Josephson, 1983; Mañas & Pagán, 2005).

No se detectó desarrollo de *S. aureus*, CSR ni *E. coli* en las muestras control o irradiadas, durante los 20 días de almacenamiento a 4-5 °C, lo que indicaría una calidad higiénica adecuada de estas materias primas.

La irradiación disminuyó los recuentos de BP, BAM, enterobacterias y coliformes totales y controló su desarrollo durante 20 días de almacenamiento en refrigeración, siendo más importante el efecto bactericida a mayor dosis de irradiación.

Estos resultados ponen en evidencia el efecto bactericida de la irradiación gamma sobre los distintos grupos microbianos analizados en las anillas de calamar. La reducción de las poblaciones microbianas por el efecto de irradiación también ha sido observada por otros autores en diversos productos pesqueros (Badr, 2012; Byun et al., 2000;

Chouliara et al., 2004; Jeevanandam et al., 2001; Kim et al., 2012; Kasimoglu et al., 2003; Lakshmanan et al., 1999; Lescano et al., 1990; Mbarki et al., 2009).

La inactivación de los microorganismos se explicaría por que la radiación tiene la capacidad de dañar un elemento crítico de la célula microbiana, que es por lo general el material genético. El daño en el material genético ocurre cuando un rayo gamma colisiona directamente con el mismo o cuando los productos de radiólisis del agua reaccionan con él. Ambos efectos pueden causar la rotura simple o doble de las hebras de la cadena del ADN, siendo más frecuentes las primeras, ya que para que tenga lugar la rotura de doble hebra es necesaria una orientación especial de la molécula de ADN. Las roturas de una sola hebra pueden no ser letales. Sin embargo, una gran cantidad de lesiones de simple hebra puede exceder la capacidad de reparación de las bacterias, lo que resulta en la muerte celular. Las roturas dobles son en general letales de manera irreversible (Dickson, 2001; Josephson, 1983; Moseley, 1989; Golbith, 1971). El efecto secundario de la irradiación sería importante en un producto como las anillas de calamar, el cual tiene un alto contenido de agua, cercano al 80%.

Durante el almacenamiento en refrigeración, los recuentos de bacterias psicrótrofas superaron a los de mesófilos tanto en las anillas irradiadas como en el control, dado que este grupo se encuentra a su temperatura óptima de crecimiento, siendo responsable del deterioro en los productos de la pesca frescos (Connell, 1975; Gram & Dalgaard, 2002; Gram & Huss, 2000; Huss, 1999).

De acuerdo a los resultados de esta experiencia, la irradiación gamma permitió reducir la flora microbiana en una manera dependiente con la dosis, logrando una mejora en la calidad microbiológica de anillas de calamar *Illex argentinus* durante el almacenamiento, lo que se traduciría en una extensión en más de 14 días de la vida útil microbiológica de este producto en refrigeración, al aplicar una dosis de 4 kGy.

4.1.2.2. Resultados de las determinaciones fisicoquímicas

El pH y el NBVT son índices de deterioro internacionalmente utilizados en los productos pesqueros (Connell, 1975; Huss, 1999), por lo que en esta experiencia fueron analizados para determinar el efecto de la dosis de irradiación y del tiempo de almacenamiento en refrigeración sobre los mismos. Los resultados de dichas determinaciones en las anillas de calamar se presentan a continuación.

4.1.2.2.a. Comportamiento del pH

Las variaciones de pH del tejido muscular de productos pesqueros son indicativas de la calidad del mismo (Connell, 1975; Huss, 1995).

Los resultados del pH de las anillas de calamar almacenadas a 4-5 °C se presentan en la **Tabla 4.1.1**.

Tabla 4.1.1. Evolución del pH durante el almacenamiento de anillas de calamar irradiadas

Dosis (kGy)	Días a 4-5 °C después de la irradiación				
	0	1	6	15	20
0	6,64 e A*	6,69 d A	7,87 c A	8,19 b A	8,42 a A
2	6,67 c A	6,69 bc A	6,72 b B	6,72 b B	6,78 a B
3	6,67 a A	6,69 a A	6,70 a BC	6,68 a B	6,70 a C
4	6,69 ab A	6,73 a A	6,65 b C	6,68 b B	6,69 ab C

* Valores medios seguidos por letras minúsculas distintas en una misma fila son significativamente diferentes debido al almacenamiento. Valores medios seguidos por letras mayúsculas distintas en una misma columna son significativamente diferentes debido al tiempo de almacenamiento ($p < 0,05$).

El pH inicial promedio de las anillas previo a la irradiación fue $6,66 \pm 0,02$, similar a los valores normalmente hallados en calamar fresco (Paarup et al., 2002b; Sungsi-in et al., 2011).

La irradiación no produjo modificaciones en el valor inicial de pH ($p > 0,05$). Sin embargo, el efecto de la dosis de irradiación fue significativo ($p < 0,05$) sobre el pH a partir del día 6, hallándose valores superiores en las muestras sin irradiar en comparación con las irradiadas.

En las amillas irradiadas con 2 kGy el pH aumentó hacia el final del almacenamiento, siendo mayor ($p < 0,05$) el día 20 en comparación con los días anteriores; en aquellas irradiadas con 3 y 4 kGy, el pH se mantuvo sin cambios durante 20 días en refrigeración. Mientras tanto, el pH de las anillas control aumentó significativamente ($p < 0,05$) durante 20 días, resultando mayor ($p < 0,05$) que el de las muestras irradiadas a todas las dosis ensayadas. Los resultados hallados en las anillas no irradiadas concuerdan con los de Paarup et al. (2002a, 2002b), quienes observaron que en *Todaropsis eblanae* el valor inicial de pH (6,8) aumentó significativamente hasta 7,3, cuando fue rechazado sensorialmente, a los 7 días de almacenamiento a 4 °C. Sungsi-in et al. (2011) también observaron que el pH inicial en calamar *Loligo formosana*

(6,58) aumentó significativamente durante el almacenamiento a 0-2 °C, asociando dicho aumento a la formación de bases volátiles, evidenciada por los aumentos de NBVT y TMA.

Las dosis de 3 y 4 kGy de irradiación gamma permitieron retardar los cambios de pH relacionados con el deterioro microbiano en las anillas de calamar, durante 20 días en refrigeración.

4.1.2.2.b. Comportamiento del NBVT

El NBVT es utilizado a nivel internacional para analizar la frescura de los productos pesqueros frescos o congelados (Connell, 1995; Huss, 1999; Ólafsson et al., 1997). En este caso se estudió el comportamiento del NBVT durante el almacenamiento refrigerado de anillas de calamar irradiadas para evaluar el efecto del mismo y de la dosis de irradiación sobre dicho índice.

El valor inicial de NBVT fue $26,7 \pm 0,8 \text{ mg100g}^{-1}$ (base húmeda), similar al observado por Melaj et al. (1997) en *Illex argentinus* a 5 °C ($24,43 \text{ mg100g}^{-1}$) y algo superior al observado por Sungsi-in et al. (2011) en *Loligo formosana* ($20,1 \text{ mg100g}^{-1}$). El valor inicial de NBVT depende de varios factores, como ser la cantidad de OTMA presente en el músculo, la cual depende del tamaño del ejemplar, estado de alimentación, de la zona de pesca, la estación del año, entre otras (Huss, 1999) y de la carga microbiana presente, dado que una fracción del NBVT proviene de la degradación bacteriana del OTMA (**Sección 2.2**).

Como se observa en la **Figura 4.1.2**, el NBVT aumentó en las anillas sin irradiar hasta $309,6 \pm 0,7 \text{ mg100g}^{-1}$, siendo durante todo el período significativamente mayor ($p < 0,05$) al de las muestras irradiadas con 2, 3 y 4 kGy cuyos valores fueron $85,4 \pm 0,4$; $34,0 \pm 1,0$ y $33,3 \pm 1,5 \text{ mg100g}^{-1}$, respectivamente, el día 20.

El aumento del NBVT durante el almacenamiento de calamar también fue descrito por otros autores (Lapa-Guimaraes et al., 2005; Sungsi-in et al., 2011). En particular, Byun et al. (2000) hallaron valores de NBVT de $264,31 \text{ mg100g}^{-1}$ en *Todarodes pacificus* salado y fermentado a 15 °C, a los 50 días de almacenamiento.

Se observó una menor producción de NBVT en las anillas irradiadas en comparación con el control. A los 20 días el NBVT de las anillas irradiadas con 2 kGy superó ($p < 0,05$) al de las anillas irradiadas con 3 y 4 kGy, en coincidencia con los

mayores valores de recuentos observados en las anillas irradiadas con 2 kGy. Este comportamiento se debería a la reducción de la población microbiana productora de NBVT debida a la irradiación a ese tiempo, dado que una de las causas del incremento en el valor de NBVT es debida a la actividad bacteriana (**Sección 2.2**). Otros autores obtuvieron resultados similares en productos pesqueros tratados con irradiación gamma (Badr, 2012; Jeevanandam et al., 2001; Lakshmanan et al., 1999; Narvaiz et al., 1989).

La mayor producción de NBVT durante el almacenamiento, en las anillas sin irradiar e irradiadas con 2 kGy resultó coincidente con el incremento en el pH mencionado previamente, ya que la producción de bases volátiles genera el aumento del mismo.

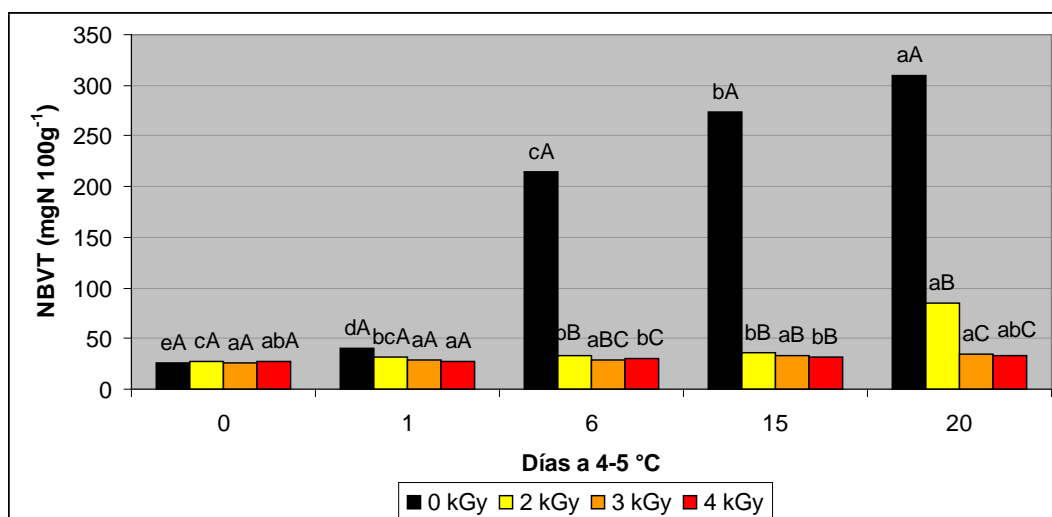


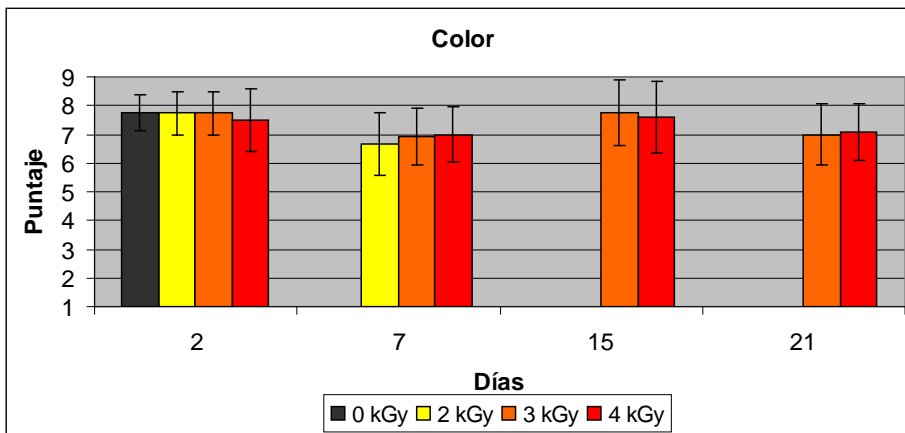
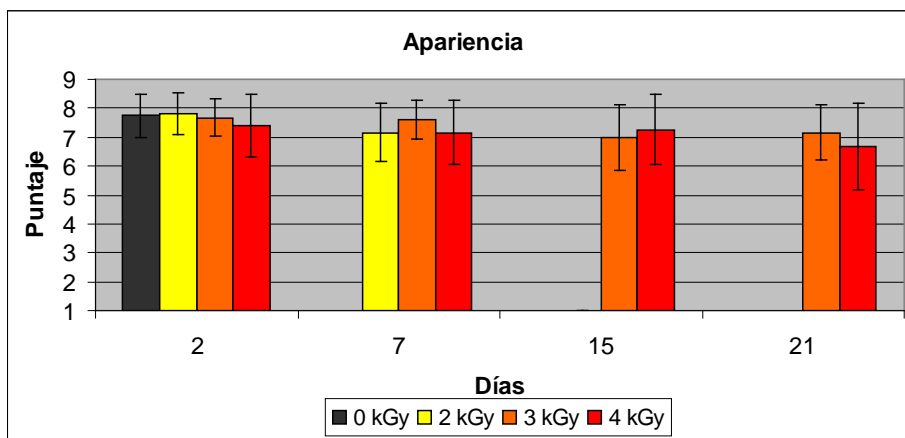
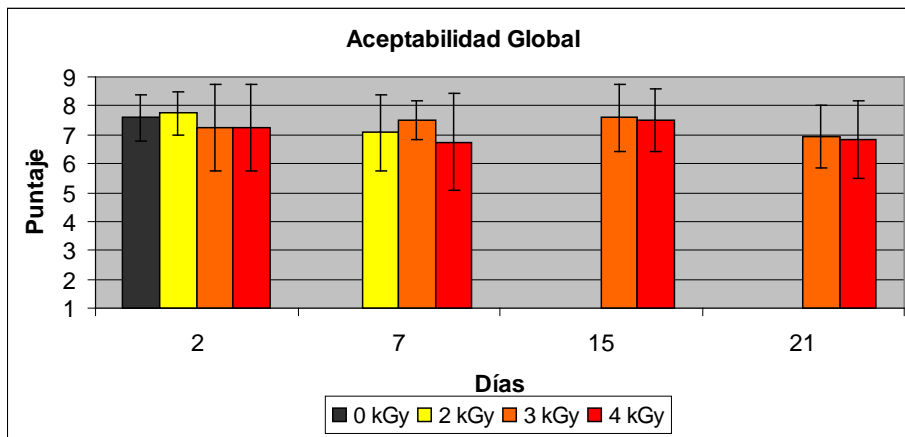
Figura 4.1.2. Evolución del NBVT durante almacenamiento a 4-5 °C de anillas de calamar irradiadas. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas debido al tiempo de almacenamiento. Mayúsculas distintas indican diferencias debido a la dosis de irradiación ($p < 0,05$).

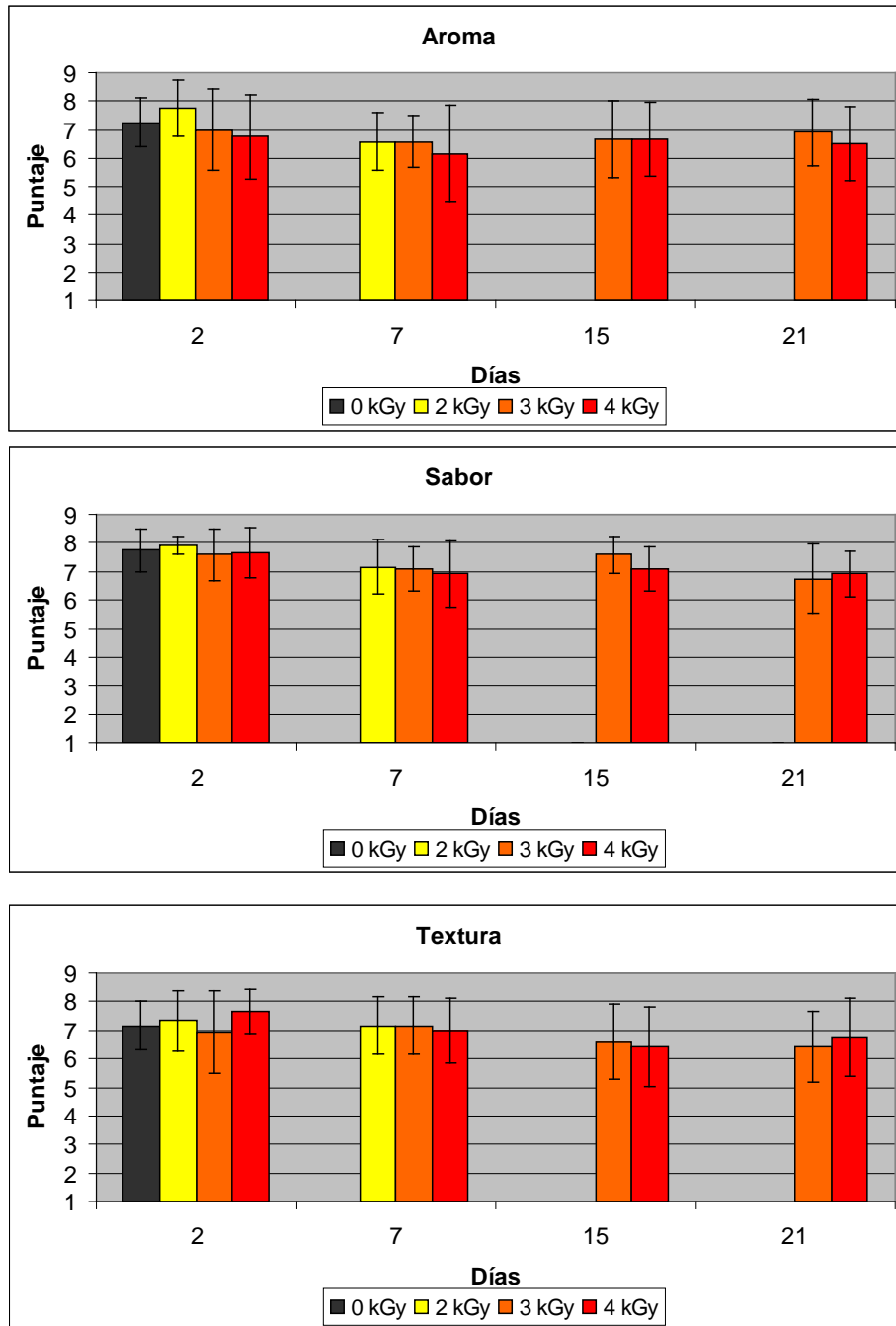
Cabe mencionar que en las anillas irradiadas con 2 kGy se hallaron recuentos de bacterias psicrótrofas elevados a los 13 días, mientras que el NBVT se mantenía cercano a sus valores iniciales, lo que podría atribuirse a que las bacterias reductoras de OTMA a TMA son más radiosensibles por ser Gram negativas, por lo que podrían haber necesitado más tiempo para sobreponerse al daño y desarrollarse en cantidades suficientes para producir las bases volátiles.

Los resultados demuestran que la irradiación gamma permitió retardar la producción de NBVT en las anillas de calamar al reducir las poblaciones microbianas.

4.1.2.3. Aceptabilidad sensorial

En las **Figuras 4.1.3** se muestran los resultados de la aceptabilidad sensorial de las anillas de calamar irradiadas, con respecto a la aceptabilidad global, la apariencia, el color, el aroma, el sabor y la textura de las mismas. Allí se puede ver el puntaje promedio obtenido por dichos atributos en los diferentes días de análisis (2, 7, 15 y 21 posteriores a la irradiación).





Figuras 4.1.3. Resultados de la evaluación sensorial para los atributos aroma, color, aspecto, sabor, textura y aceptabilidad general de anillas de calamar irradiadas. Las barras de error representan el error estándar.

A los dos días de realizada la irradiación se observó que todos los atributos de las anillas irradiadas y sin irradiar fueron puntuados entre 7 y 8 (*me gusta* y *me gusta mucho*, respectivamente), indicando muy buena aceptación de las anillas irradiadas y el control por parte de los panelistas.

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) debido a la dosis de irradiación en ninguno de los atributos evaluados indicando que los panelistas expresaron

similar nivel de agrado por las anillas irradiadas y el control, sin que detectaran diferencias entre las mismas ($p>0,05$).

Asimismo, todos los atributos fueron aceptados por igual, lo que indica que no hubo detrimento de ningún atributo en particular y que ninguno fue preferido sobre otro, lo que habla de un producto que es muy bien aceptado por el conjunto de sus características sensoriales.

Algunos comentarios de los panelistas al respecto de la aceptabilidad global fueron: Riquísimas! No encuentro diferencias entre las muestras, todas me gustaron mucho!. Muy buen sabor y aspecto de todas las muestras.

Los comentarios relativos al sabor, a los dos días de aplicada la irradiación, se muestran en la **Tabla 4.1.2**

Tabla 4.1.2. Comentarios de los panelistas sobre el sabor de las anillas de calamar, a los dos días de ser irradiadas.

Control	2 kGy	3 kGy	4 kGy
Sabor típico	Agradable y suave. (3)	Gusto más fuerte que los anteriores, rico.	Agradable y suave. (2)
Agradable y suave.	Típico (2).		Sabor agradable a calamar.
Ricas, igual a 2 kGy.	No encuentro diferencia entre las distintas muestras. Ricas, a pesar de no tener ningún ingrediente que le de más sabor.	Sabor agradable a calamar. (2)	Ricas. No se siente sabor a calamar, si cierro los ojos y lo pruebo no sabría decir qué es, no es que sea mal sabor, sólo que no se siente.

Estos resultados son similares a los de otros autores, quienes tampoco observaron cambios significativos en la aceptabilidad sensorial de productos pesqueros irradiados como camarones (*Penaeus indicus*) tratados con 2,5 kGy (Kannat et al., 2006), merluza (*Merluccius hubbsi*) descabezada y eviscerada, irradiada con 3,3 kGy (Lescano et al., 1990) y filetes de caballa irradiados (Mbarki et al., 2009).

La muestra control fue descartada a los 6 días debido a la evidencia de signos de deterioro, el cual fue manifestado principalmente por la presencia de aroma amoniacal y pútrido y la aparición de manchas rosas en las anillas. Estos resultados estarían de acuerdo con los de Lapa-Guimaraes et al. (2002), quienes observaron una disminución de la calidad sensorial de *Loligo Plei* luego de 7 días de almacenamiento en hielo, los de Civera et al. (1999) que hallaron que la calidad sensorial de *Illex condetti* disminuía a partir de 7 días de almacenamiento a 1-2 °C y con los de Ke et al. (1984) quienes mencionaron que la vida útil de *Illex illecebrosus* no superaba los 5 días en almacenamiento refrigerado.

A los 7 días de almacenamiento en refrigeración se evaluaron únicamente las anillas irradiadas. Se observó que todos los atributos recibieron un puntaje promedio entre 6 y 7, indicando buena aceptabilidad por los panelistas, sin que se detectaran diferencias significativas entre las anillas irradiadas con 2, 3 y 4 kGy ($p>0,05$).

Las anillas irradiadas con 2 kGy fueron descartadas antes de los 15 días de almacenamiento en refrigeración, debido principalmente al aroma pútrido.

A los 15 y 21 días de almacenamiento en las mismas condiciones se evaluaron las anillas irradiadas con 3 y 4 kGy. En ambas fechas, todos los atributos sensoriales de las anillas irradiadas recibieron puntajes entre 6 y 8, sin que se presentaran diferencias significativas entre las mismas debidas a la dosis de irradiación ni al tiempo de almacenamiento ($p>0,05$).

Se observó que la aceptabilidad de todos los atributos analizados de las anillas irradiadas con 3 y 4 kGy no fue afectada por el tiempo de almacenamiento ($p>0,05$), manteniéndose prácticamente constante durante 20 días. Por ejemplo, algunos comentarios de los panelistas realizados el día 20 para las muestras irradiadas con 3 y 4 kGy fueron, con respecto a la textura y la aceptabilidad global:

No encuentro diferencias entre ambas muestras. Tienen buena textura, firme, pero no dura, agradable al masticar.

Firme, pero tierna, se corta con los dientes fácilmente, no es chiclosa

La textura, el sabor y el color me resultan muy buenos.

Tiene buen sabor y textura

Muy ricas las dos muestras!

Tienen buen aspecto.

En esta experiencia se puso en evidencia que la presencia de manchas color rosa y el aroma amoniacal y pútrido son las principales características sensoriales de las anillas de calamar en descomposición. Estas observaciones concuerdan con las obtenidas por varios autores, quienes mencionaron la presencia de aroma amoniacal como típico del calamar deteriorado (Botta et al., 1979; Ke et al., 1984), el cual se relacionaría con la producción de bases nitrogenadas volátiles generadas por procesos bacterianos y enzimáticos.

Asimismo varios autores analizaron el comportamiento de calamar entero o tubo de calamar en distintas condiciones de almacenamiento. Por ejemplo, Paarup et al. (2002b) observaron el rechazo sensorial de manto de calamar (*Todaropsis eblanae*) envasado al vacío a los 7 días de almacenamiento a 4 °C.

Mediante el uso de la tabla descriptiva estructurada desarrollada por Melaj et al., (1993-1994) para *Illex argentinus* entero, Melaj et al., (1997) determinaron que los ejemplares de esta especie disminuyeron de categoría “comercial” a “marginal”, luego de 8 días de almacenamiento en agua refrigerada a 2-5 °C. Asimismo, Paarup et al. (2002a) detectaron el rechazo sensorial de *Todaropsis eblanae* a los 10 días de almacenamiento, debido principalmente a aromas amoniacales y Yamanaka et al. (1987) describieron la pérdida de calidad sensorial en *Todarodes pacificus* luego de 8 días de almacenamiento a 0 °C, describiendo a partir del décimo día un estado de descomposición avanzado debido al aroma pútrido y la textura muy blanda. Los casos mencionados que corresponden a calamar entero suman el efecto de la descomposición de las vísceras.

Con respecto a las modificaciones del color, Sungrisi-in et al. (2011) también observaron la presencia de manchas rosas en calamar debido al deterioro. Dichos aspectos se discutirán más adelante (4.1.2.4).

En este trabajo se observó que las anillas irradiadas tuvieron un alto puntaje de la aceptabilidad global, la apariencia, el color, el aroma, el sabor y la textura y que todos estos atributos presentaron el mismo grado de aceptación. A su vez, la aceptabilidad sensorial de todos los atributos evaluados se mantuvo constante durante más tiempo en comparación con las anillas sin irradiar.

De acuerdo con estos resultados, Lescano et al. (1990) también observaron una extensión en la aceptabilidad sensorial y de la intención de compra de merluza descabezada y eviscerada, irradiada con 3,3 kGy, durante 58 días de almacenamiento a 0 °C, en comparación con las muestras sin irradiar. Asimismo, Jeevanandam et al. (2001) informaron un incremento del tiempo de aceptabilidad sensorial en besugo (*Nemipterus japonicus*) debido a la irradiación.

Los resultados hallados en esta experiencia indican que la irradiación gamma a 2, 3 y 4 kGy no modificó la aceptabilidad global ni la aceptabilidad de la apariencia, el color, el aroma, el sabor y la textura de las anillas de calamar, en comparación con las anillas sin tratar y que las dosis de 3 y 4 kGy permitieron retardar los cambios sensoriales debidos al deterioro, incrementando en al menos 14 días el tiempo de aceptabilidad sensorial con respecto a las anillas sin irradiar.

4.1.2.4. Color

Uno de los principales cambios sensoriales que tienen lugar durante el deterioro del calamar entero está relacionado con el color, como la pérdida del brillo y del color “marrón chocolate” en la piel hacia colores más rojizos y la formación de manchas rosas en el músculo (Dragonetti Saucero, 2008; Lapa-Guimaraes et al., 2002; Melaj et al., 1994). Es por este motivo que el color es una de las principales características para evaluar la calidad del calamar (Botta et al. 1979; Sugiyama et al., 1989; Sungrisi-in et al., 2011).

En las **Figuras 4.1.4 A, B y C** se muestra la evolución de los parámetros de color L^* , a^* y b^* , respectivamente, de las anillas de calamar durante el almacenamiento en refrigeración.

El parámetro L^* presentó un valor inicial $62,9 \pm 0,5$, el cual no fue afectado ($p > 0,05$) por ninguna de las dosis aplicadas. En el control L^* aumentó significativamente ($p < 0,05$)

durante el almacenamiento, siendo superior ($p < 0,05$) al valor hallado en las muestras irradiadas, a partir del sexto día. Si bien L^* también aumentó durante el almacenamiento en las anillas irradiadas, el incremento fue más paulatino en comparación con el control. A su vez, no hubo diferencias ($p > 0,05$) en el valor de L^* entre las anillas irradiadas con 2, 3 y 4 kGy, durante todo el período de almacenamiento.

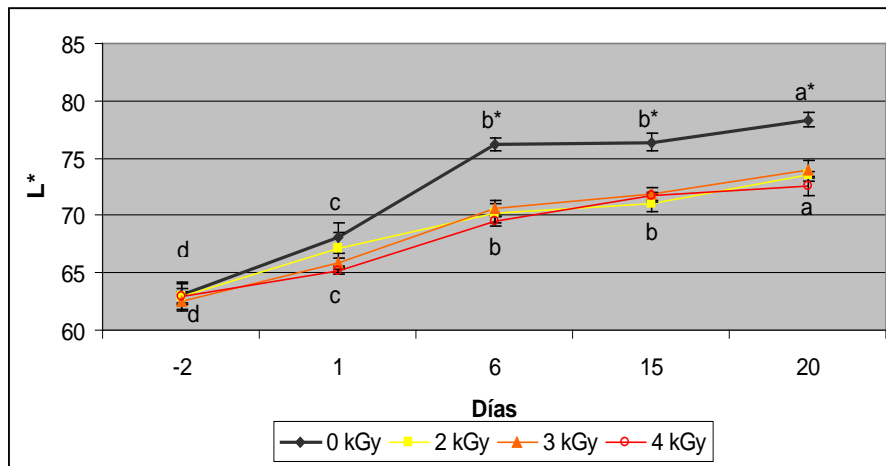


Figura 4.1.4.A. Evolución de L^* en anillas de calamar irradiadas durante almacenamiento a 4-5 °C. Letras distintas indican diferencias significativas debido al tiempo de almacenamiento. * indica que los valores del control fueron significativamente mayores al de las muestras irradiadas ($p < 0,05$).

El valor inicial de a^* ($-4,0 \pm 0,1$) no se vio modificado ($p > 0,05$) por la irradiación. En las anillas sin irradiar, aumentó durante 21 días en refrigeración, siendo significativamente ($p < 0,05$) mayor al de las muestras irradiadas a partir del sexto día de almacenamiento. Las muestras irradiadas alcanzaron un valor de $-3,1 \pm 0,1$ a los 21 días, sin que se detectaran diferencias significativas entre las mismas ($p < 0,05$).

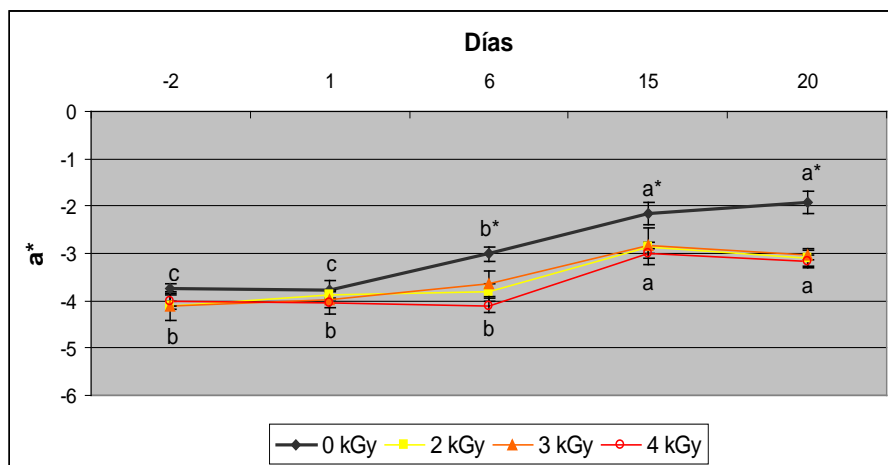


Figura 4.1.4.B. Evolución de a^* en anillas de calamar irradiadas durante almacenamiento a 4-5 °C. Letras distintas indican diferencias significativas debido al tiempo de almacenamiento. * indica que los valores del control fueron significativamente mayores al de las muestras irradiadas ($p < 0,05$).

El parámetro b^* presentó un valor inicial promedio de $2,5 \pm 0,3$ que tampoco fue afectado debido a la irradiación. En la muestra control éste aumentó significativamente hasta $7,2 \pm 0,3$ a los 21 días de almacenamiento ($p < 0,05$) mientras que las muestras irradiadas llegaron a un valor promedio de $5,3 \pm 0,3$, sin que hubiera diferencias significativas entre las mismas. Si bien b^* aumentó en las muestras irradiadas durante el almacenamiento, el incremento fue más lento que en el control, siendo b^* en el mismo mayor al de las muestras irradiadas a partir del día 6 ($p < 0,05$).

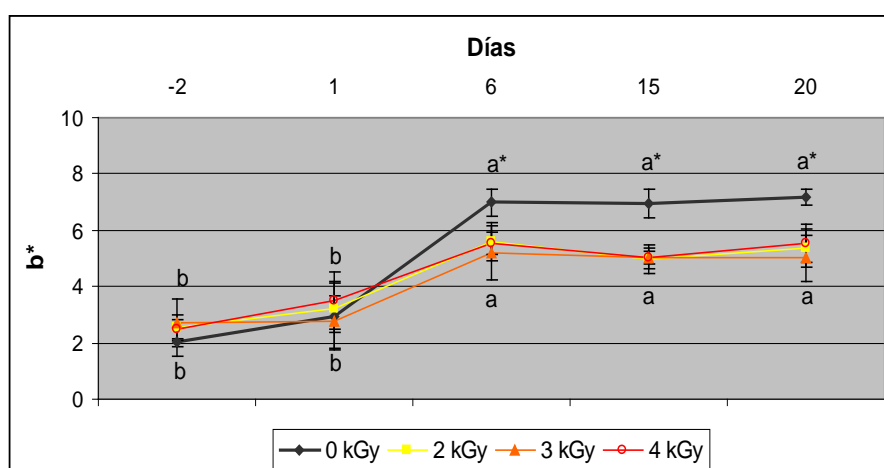


Figura 4.1.4.C. Evolución de b^* en anillas de calamar tratadas con radiación gamma durante almacenamiento a 4-5 °C. Letras distintas indican diferencias significativas debido al tiempo de almacenamiento. * indica que los valores del control fueron significativamente mayores al de las muestras irradiadas ($p < 0,05$).

En los tres gráficos se observa que los valores de los parámetros de color de las anillas de calamar sin irradiar tuvieron un aumento más pronunciado en comparación con las irradiadas, indicando que la irradiación gamma permitió retardar los cambios de color asociados con el deterioro, en todas las dosis aplicadas.

Los resultados obtenidos en las **anillas sin irradiar** concuerdan con lo observado por Lapa-Guimaraes et al. (2002) en calamar *Loligo Plei*, quienes informaron aumentos de los parámetros L^* , a^* y b^* durante el almacenamiento de dicha especie a 0-1 °C.

Como se mencionó anteriormente, los cambios de color que ocurren en el calamar debido al deterioro afectan su apariencia y podrían utilizarse como un índice de calidad para este tipo de producto (Ke et al., 1984; Sungsi-in et al., 2010).

El aumento de L^* ha sido relacionado con la pérdida de transparencia y la aparición de un tinte más blanco en calamar (Sugiyama et al., 1989), como fuera observado en las anillas sin irradiar durante el almacenamiento.

Por otra parte, la aparición de manchas rosas en el manto ha sido mencionada por diversos autores como un signo típico de deterioro en calamar (Ke et al., 1984; Lapa-Guimaraes et al., 2002; Sungsi-in et al., 2010). Este tinte rosado estaría asociado con el aumento de a^* , cuyo valores positivos representan la intensidad del color rojo (Lapa-Guimaraes et al., 2002; Sungsi-in et al., 2010). Las manchas rosas en el manto se han relacionado con la disrupción de los cromatóforos de color violáceo que se encuentran entre la primera y segunda capa de la piel del calamar. Estas células pigmentadas mantienen su color mientras el calamar está fresco, pero al comenzar la alteración las mismas sufrirían plasmólisis liberando el pigmento que luego extiende bajo la epidermis (Bertullo, 1975; Melaj et al., 1994). Sungsi-in et al. (2010) estudiaron el efecto del pelado sobre el color del manto de *Loligo formosana* durante el almacenamiento, observando que, a diferencia del calamar sin pelar, en el calamar pelado el parámetro a^* no se veía modificado.

Si bien en esta experiencia se trabajó con anillas de *Illex argentinus* sin piel, existen factores que influyen sobre las modificaciones de color asociadas al deterioro, como la especie de cefalópodo, el tamaño de los ejemplares (en general, los calamares más grandes son más propensos a la formación de manchas rosadas y de mayor intensidad de color), así como las condiciones de manipulación y almacenamiento post-captura que influyen sobre la calidad del calamar. En esta experiencia, a partir del día 6 de almacenamiento el valor de a^* del control fue significativamente mayor ($p < 0,05$) al de las muestras irradiadas, momento en el que se observaron manchas rosadas en la muestra control, lo que estaría de acuerdo con lo hallado sensorialmente (**Sección 4.1.2.3**).

El incremento del parámetro b^* representa un aumento de la coloración amarilla. Como en este trabajo, otros autores observaron dicho comportamiento durante el almacenamiento de calamar *Loligo peali* (Thanonkaew et al., 2006) y *Loligo plei* (Lapa-Guimaraes et al., 2002), asociándolo con el deterioro y con reacciones de los productos de oxidación lipídica. Sugieren que la formación de pigmentos amarillos en el manto de calamar se debería a reacciones de pardeamiento no enzimático entre los productos aldehídicos de la oxidación de lípidos y las aminas de los fosfolípidos.

Estos procesos describirían los cambios que tuvieron lugar en las anillas sin irradiar y posteriormente y en menor medida, en las anillas irradiadas. Con respecto a estas últimas, se observó que la irradiación no tuvo efecto ($p>0,05$) sobre los parámetros de color iniciales. Otros autores observaron comportamientos diferentes. Lescano et al. (1990) observaron la aparición de una leve coloración roja en merluza (*Merluccius hubbsi*) irradiada a 3,3 kGy, en estado congelado o refrigerado, la cual sin embargo no disminuyó la aceptabilidad sensorial de las muestras. A su vez, Abreu et al. (2010) estudiaron la irradiación de camarón (*Penaeus vannamei*) congelado y hallaron que 6 kGy de irradiación gamma provocaron el aumento de a^* y b^* en comparación con las muestras no irradiadas, pero no dieron una posible justificación a estos cambios y tampoco analizaron el comportamiento del color durante el almacenamiento.

Los resultados hallados en esta experiencia demuestran la posibilidad de irradiar las anillas de *Illex argentinus* sin que se modifique su color característico. La irradiación gamma retardó los cambios de color durante el almacenamiento, con respecto a las anillas sin irradiar. Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, podría inferirse que la reducción de las poblaciones microbianas causada por la irradiación gamma haya provocado una disminución de las reacciones deteriorantes que provocan cambios en el color, posiblemente porque la acción microbiana provoca la lisis de las membranas, lo que produce la liberación de sustancias químicas y facilita su reacción.

En la **Figura 4.1.5** se muestra la evolución de la diferencia de color DE2000 evaluada los días 1, 6, 15 y 20 con respecto al día 0 (previo a la irradiación).

De acuerdo con los resultados obtenidos para los parámetros L^* , a^* y b^* , no hubo diferencias significativas en DE2000 debido a la irradiación al día siguiente de aplicada la misma, indicando que la irradiación no afectó el color característico de las anillas. Durante el almacenamiento, DE2000 aumentó significativamente en las anillas sin irradiar, siendo significativamente mayor ($p<0,05$) que el de las muestras irradiadas a partir del sexto día. Si bien en las anillas irradiadas el valor de DE2000 aumentó durante el almacenamiento, este cambio fue menor al que se tuvo lugar en las muestras control. No hubo diferencias significativas ($p>0,05$) en DE2000 entre las muestras irradiadas con diferentes dosis (2, 3 y 4 kGy).

Los resultados de diferencia de color DE2000 de las muestras sin irradiar fueron mayores a 7 el día 6, cuando las anillas sin irradiar debieron ser descartadas para su evaluación por el evidente deterioro.

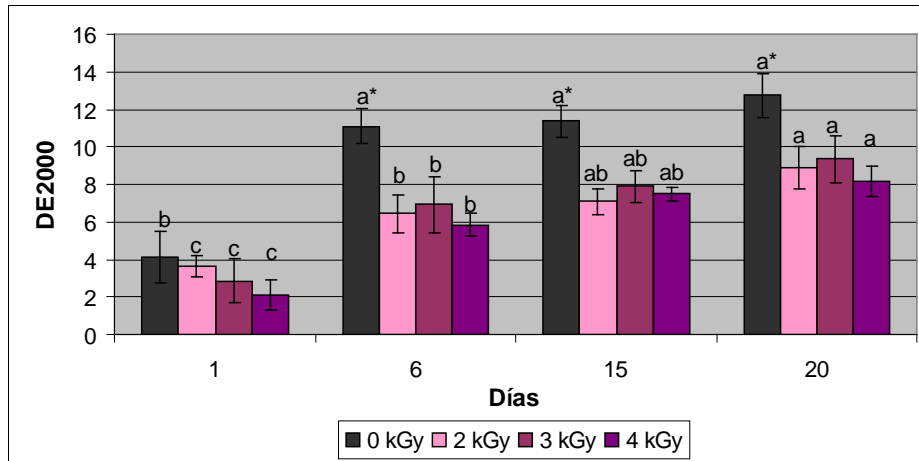


Figura 5.1.5. Evolución de DE2000 en anillas de calamar. Letras diferentes indican diferencias significativas debido al tiempo. * indica diferencias debido a la dosis de irradiación ($p < 0,05$).

Estos resultados indican que la irradiación gamma no provocó cambios significativos en el color característico de las anillas de calamar fresco y disminuyó la velocidad de los cambios de color debidos al deterioro (incremento de L^* , a^* y b^*), que fueron significativos en las anillas sin irradiar durante 20 días de almacenamiento en refrigeración.

Es importante destacar que a partir del sexto día en refrigeración, los parámetros, L^* , a^* , b^* y DE2000 en las anillas control, fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) a los de las anillas irradiadas, lo cual coincidió con lo evidenciado sensorialmente, ya que el día 6 las mencionadas anillas presentaban manchas rosas y cambios en la coloración y aroma que indicaron su deterioro. A su vez, este fecha coincidió con un valor de recuento de bacterias psicrótrofas cercano a 1×10^6 UFC/g, el cual ha sido considerado como un límite de aceptabilidad recomendado en especies marinas (ICMSF, 1983). También se observó a los 6 días un valor de NBVT muy elevado, que estaría de acuerdo con el valor de recuento hallado.

Por estos motivos, existiría la posibilidad que el valor de microorganismos psicrótrofos 1×10^6 UFC/g fuera representativo del límite máximo aceptable para este producto, ya que indicaría el final del tiempo en el que el mismo presenta una calidad global adecuada.

4.1.3 Conclusiones parciales

En esta experiencia se observó que la irradiación gamma redujo los recuentos iniciales de microorganismos deteriorantes en anillas de calamar *Illex argentinus* y disminuyó su desarrollo durante el almacenamiento en refrigeración, siendo más importante el efecto bactericida a mayor intensidad de dosis.

La reducción en la flora microbiana inducida por la irradiación se vio reflejada en la disminución de las alteraciones fisicoquímicas relacionadas con el deterioro (pH, NBVT), durante el almacenamiento en refrigeración.

Las anillas irradiadas tuvieron una muy buena aceptabilidad sensorial de todos los atributos evaluados, sin que hubiera diferencias entre las mismas y el control. A su vez, la irradiación gamma permitió incrementar el tiempo de aceptabilidad sensorial en comparación con las anillas sin irradiar, siendo mayor dicho tiempo a mayor intensidad de dosis. Dosis de 2 kGy permitieron extender el tiempo de aceptabilidad en refrigeración en comparación con el control. Sin embargo, la extensión alcanzada por dosis de 3 y 4 kGy fue superior, de al menos 14 días con respecto al control.

Asimismo, la irradiación gamma a dosis de 2, 3 y 4 kGy no modificó el color característico de las anillas de calamar *Illex argentinus* fresco y retardó los cambios en las mismas durante 20 días de almacenamiento en refrigeración, sin que hubiera diferencias entre las dosis aplicadas.

El conjunto de los resultados microbiológicos, sensoriales y fisicoquímicos parecería indicar que el valor de recuento de bacterias psicrótrofas de 1×10^6 UFC/g podría considerarse como el máximo aceptable para este tipo de producto.

Para seleccionar la dosis mínima se tuvo en cuenta que desde el punto de vista sensorial, ninguna de las dosis de irradiación aplicadas afectó negativamente la aceptabilidad de las anillas ni produjo cambios en el color característico de las mismas. Por lo que, considerando estos factores, dosis de 2, 3 y 4 kGy serían factibles de ser aplicadas en este producto. Sin embargo, las dosis más altas permitieron controlar el desarrollo de los grupos microbianos analizados durante un mayor período de tiempo, mejorando así la estabilidad microbiológica de las anillas, como se vio reflejado en los parámetros fisicoquímicos analizados.

Dosis de 3 y 4 kGy extendieron el tiempo de aceptabilidad sensorial de las anillas de calamar en al menos 14 días con respecto al control. A su vez, la dosis de 4 kGy

permitió obtener anillas que presentaron una mejor calidad microbiológica en comparación con las muestras irradiadas a 2 y 3 kGy.

Por estos motivos, considerando los resultados obtenidos para el rango de dosis estudiado, la dosis 4 kGy fue seleccionada como la dosis mínima a aplicarse en la posterior irradiación definitiva.

IRRADIACIÓN DEFINITIVA DE ANILLAS DE CALAMAR SIN PIEL

4.2 Irradiación definitiva de anillas de calamar sin piel

El objetivo de la irradiación definitiva fue analizar la posibilidad técnica de obtener mediante la irradiación gamma un producto de calamar fresco, sensorialmente aceptable, que presente una adecuada calidad microbiológica durante un mayor período de tiempo en refrigeración, permitiendo de esta manera extender el tiempo de comercialización del mismo.

Para ello se estudió un rango de dosis que puede recibir el producto al ser irradiado, considerando la uniformidad de la dosis. La uniformidad de dosis es la relación que existe entre la dosis máxima y mínima absorbida por el producto en el tratamiento de irradiación.

Por lo tanto se aplicaron 4 kGy como dosis mínima, como fuera definido en base a resultados microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales de la irradiación preliminar y se aplicó también una dosis de 8 kGy, teniendo en cuenta lo establecido por el Código Alimentario Argentino (Capítulo 3, artículo 174), donde se especifica que la uniformidad de dosis debe ser menor o igual a 2, cuando la dosis media sea superior a 1 kGy, como en este caso. La dosis media puede estimarse como la media entre la dosis mínima y la máxima (CAA, 2012).

Se determinaron los mismos parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales que en la experiencia preliminar, analizando los mismos durante 77 días en refrigeración.

4.2.1 Tratamiento de la materia prima y metodología utilizada

Los ejemplares de *Illex argentinus* capturados en el Océano Atlántico Sudoccidental (alrededor del 41 °S) fueron desembarcados en el puerto de Mar del Plata. El tratamiento de la materia prima, la elaboración de las anillas, su envasado y acondicionamiento fue exactamente igual a la realizada en la experiencia preliminar. El contenido de agua de las anillas fue $82,1 \pm 0,4$ mg/100g.

La irradiación gamma se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en el **Capítulo 3**. Las dosis mínimas absorbidas fueron 0, 4,8 y 8,4 kGy, irradiándose a una velocidad de

dosis de 10,9 kGy/h. Las dosis se determinaron con dosímetros de solución acuosa de dicromato de plata.

Durante el transporte y la irradiación las anillas no superaron los 4 °C. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración (4-5 °C) y analizadas los días 0, 1, 5, 8, 13, 16, 19, 22, 26, 33, 40, 47, 54, 62, 68 y 77. Se contó con 10 muestras (bolsas de 250 g) para cada fecha de análisis y cada dosis de irradiación, para realizar el experimento por duplicado.

Según la metodología descrita en el **Capítulo 3**, se determinó el pH, el NBVT, y color (L^* , a^* , b^* y DE2000). Se realizaron recuentos de bacterias psicrótrofas y bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, enterobacterias, *Staphylococcus* spp. y Clostridios sulfito reductores (CSR). Se analizó la aceptabilidad sensorial de las anillas utilizando 50 panelistas no entrenados, pero habituales consumidores del producto.

Los factores del ANOVA fueron dosis (0, 4,8 y 8,4 kGy) y días de almacenamiento (0, 1, 5, 8, 13, 16, 19, 22, 26, 33, 40, 47, 54, 62, 68 y 77 d).

4.2.2 Resultados y discusión

4.2.2.1 Aspectos microbiológicos

La evolución de las bacterias psicrótrofas durante el almacenamiento de las anillas de calamar en refrigeración se presenta en la **Figura 4.2.1**.

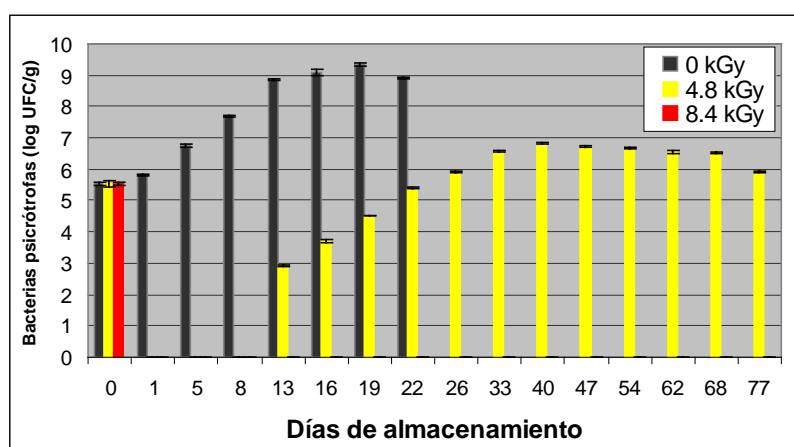


Figura 4.2.1. Recuento de microorganismos psicrótrofos en anillas de calamar irradiadas durante almacenamiento en refrigeración.

Previo al tratamiento de irradiación, el recuento inicial de bacterias psicrótrofas en la materia prima fue $3,5 \times 10^5$ UFC/g, valor superior al hallado en las anillas utilizadas en la irradiación preliminar ($4,5 \times 10^2$ UFC/g) y en las experiencias descritas por Lapa-Guimaraes et al. (2002) y Sungsi-in et al. (2011) en calamar. Sin embargo, la irradiación gamma a 4,8 y 8,4 kGy redujo la población inicial por debajo del límite de detección (10 UFC/g), logrando una reducción de más de 5 ciclos logarítmicos en la población de microorganismos psicrótrofos.

El comportamiento de los microorganismos psicrótrofos durante el almacenamiento en refrigeración estuvo directamente relacionado con la dosis de irradiación aplicada. A mayor intensidad de dosis se observó un menor desarrollo microbiano.

Durante 77 días de almacenamiento a 4-5 °C no se detectó el desarrollo de microorganismos psicrótrofos en las anillas de calamar irradiadas con 8,4 kGy. En las anillas irradiadas con 4,8 kGy se detectó desarrollo de bacterias psicrótrofas a los 13 días de almacenamiento refrigerado, alcanzando un valor máximo de $6,8 \times 10^6$ UFC/g en el día 40, mientras que en las anillas sin irradiar el crecimiento de psicrótrofos fue mayor, alcanzando valores de recuento de $2,2 \times 10^9$ UFC/g el día 19.

Estos resultados concuerdan con los de la irradiación preliminar en cuanto a la inactivación de la flora psicrótrofa inicial y a la desaceleración del crecimiento microbiano durante el almacenamiento, causados por la irradiación gamma.

En esta experiencia, las bacterias psicrótrofas fueron inactivadas por la dosis de irradiación de 4,8 kGy, y luego de 20 días de almacenamiento alcanzaron un valor de recuento de 1×10^5 UFC/g. En la irradiación preliminar se observó un comportamiento similar en cuanto a la inactivación de la flora psicrótrofa con 4 kGy y al posterior desarrollo, alcanzando valores de recuento del mismo orden a los 22 días.

En la **Figura 4.2.2** se muestra el comportamiento de las bacterias mesófilas durante el almacenamiento en refrigeración.

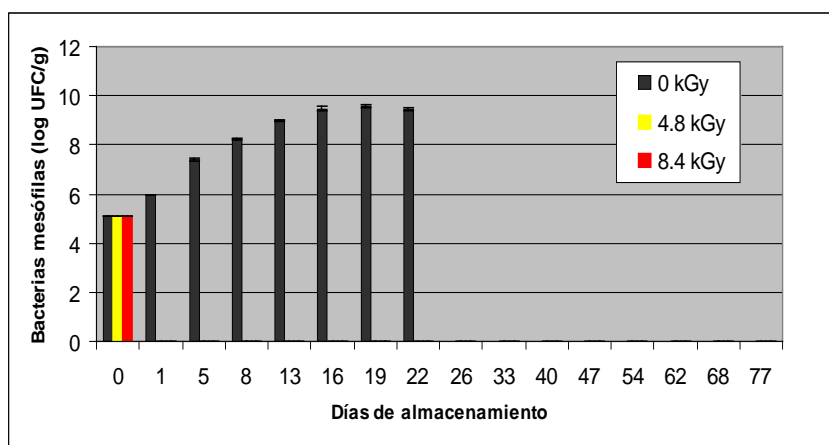


Figura 4.2.2. Recuentos de microorganismos mesófilos en las anillas de calamar durante el almacenamiento en refrigeración.

Los recuentos iniciales de bacterias mesófilas previo al tratamiento de irradiación fueron $1,3 \times 10^5$ UFC/g, mayores a los hallados en la materia prima de la irradiación preliminar.

La irradiación gamma con 4,8 y 8,4 kGy redujo los mismos por debajo del límite de detección de la técnica (<10 UFC/g), coincidiendo con la reducción de la flora mesófila observada por Kim et al. (2012) en calamar.

No se detectó desarrollo de bacterias mesófilas en las muestras irradiadas con 4,8 y 8,4 kGy durante 77 días de almacenamiento a 4-5 °C, mientras que el recuento de las mismas aumentó significativamente ($p < 0,05$) en las muestras sin irradiar hasta un valor de $2,9 \times 10^9$ UFC/g el día 16.

Dentro del grupo de bacterias mesófilas, los recuentos iniciales de enterobacterias y coliformes totales fueron $1,23 \times 10^4$ y $8,12 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente. Estas poblaciones fueron completamente inactivadas por el tratamiento de irradiación. En las muestras irradiadas, no se detectó desarrollo de enterobacterias o coliformes totales durante 77 días de almacenamiento refrigerado, de acuerdo con los resultados de microorganismos mesófilos, mientras que en las anillas sin irradiar los valores iniciales aumentaron significativamente ($p < 0,05$) durante el almacenamiento, tal como se muestra en la Figura 4.2.3.

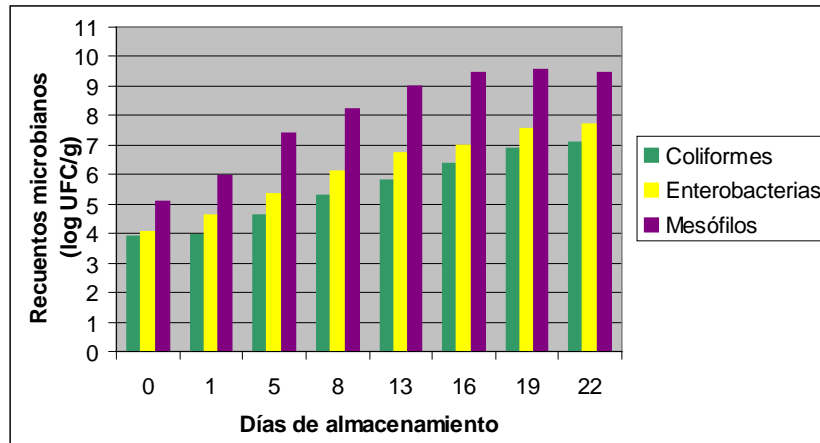


Figura 4.2.3. Recuentos de microorganismos mesófilos, enterobacterias y coliformes totales en las muestras sin irradiar durante almacenamiento en refrigeración.

Estos resultados concuerdan con los hallados en la irradiación preliminar y aquellos observados por Badr (2012) en filetes de salmón ahumado, en los que 2 kGy fueron suficientes para inactivar totalmente las enterobacterias iniciales (5×10^3 UFC/g) durante 50 días de almacenamiento al vacío, a 4 °C.

En este caso se observó que la irradiación a 4,8 kGy, en conjunto con el almacenamiento en refrigeración, tuvo tal efecto biocida sobre las bacterias mesófilas, que las mismas no fueron capaces de reparar el daño y crecer durante 77 días. Cuando existe una gran cantidad de lesiones de simple hebra en la cadena de ADN, se puede exceder la capacidad de reparación de las bacterias, resultando en la muerte de la célula. Además, la radiación podría provocar daños en otros constituyentes celulares, afectando los mecanismos de reparación (Dickson, 2001).

Las bacterias mesófilas, además de tener que reparar el daño causado por la irradiación, deberían sobreponerse a la baja temperatura del almacenamiento para poder desarrollarse. Como se muestra en la **Figura 4.2.3**, a este grupo microbiano pertenecen las enterobacterias y los coliformes, que por tratarse de bacterias Gram negativas, serían las más sensibles al tratamiento de irradiación, debido a su constitución, metabolismo y mecanismos de regulación (Josephson, 1983; Mañas & Pagán, 2005).

Los resultados de esta experiencia verifican los obtenidos en la irradiación preliminar y aquellos hallados en diversos productos de la pesca preservados mediante irradiación, haciéndose extensiva la discusión del **Capítulo 4.1** para los resultados aquí descritos.

En esta experiencia los valores iniciales de mesófilos y psicrótrofos fueron más altos que los detectados en la irradiación preliminar, siendo muy común hallar estas diferencias en los productos pesqueros, ya que la calidad inicial depende tanto de la especie, como de la zona de pesca y de la manipulación y acondicionamiento a bordo luego de la captura (Yeannes, 2012). La manipulación del pescado posterior a la captura es un factor determinante de su calidad como materia prima y por lo tanto, de la calidad del producto final. En calamar fresco se han hallado poblaciones microbianas que varían entre $3,2 \times 10^2$ UFC/g en *Loligo formosana* (Sungsri-in et al., 2011); $8,0 \times 10^2$ UFC/g en manto de *Loligo plei* (Lapa-Guimaraes et al., 2002); $1,8 \times 10^4$ UFC/g en calamar (Kim et al., 2012) y $3,2 \times 10^4$ UFC/g en *Todaropsis eblanae* (Paarup et al., 2002).

Ambas dosis de irradiación permitieron la inactivación de las poblaciones de mesófilos y psicrótrofos, obteniéndose reducciones de más de 5 ciclos logarítmicos en las mismas. A su vez, inhibieron el desarrollo de mesófilos en anillas de calamar durante 77 días. Si bien la dosis de 8,4 kGy permitió inhibir el desarrollo de psicrótrofos durante 77 días en refrigeración, dicha población se desarrolló en las anillas irradiadas con 4,8 kGy. La misma aumentó a partir del día 8 de almacenamiento, hasta recuentos del orden de 1×10^6 UFC/g a los 30 días (aproximadamente), llegando al máximo aceptable en este tipo de productos y permitiendo por lo tanto una extensión de la vida útil microbiológica al menos 6 veces superior a la del control, el cual superó dicho valor antes de los 5 días en refrigeración.

Estos resultados indican que la irradiación gamma a 4,8 y 8,4 kGy permitió extender en más de 25 y 70 días, respectivamente, el tiempo en que las anillas de calamar presentaron una adecuada calidad microbiológica, durante la refrigeración.

4.2.2.2. Resultados de las determinaciones fisicoquímicas

Aquí se presentan los resultados de las determinaciones de pH y NBVT realizadas en la experiencia de irradiación definitiva de anillas de calamar.

4.2.2.2.a. Comportamiento del pH

En la **Figura 4.2.4** se muestra la evolución del pH durante el almacenamiento en refrigeración de las anillas de calamar, las cuales presentaron antes de la irradiación un pH inicial promedio de $6,20 \pm 0,03$. Este valor concuerda con los trabajos de Sungsi-in et al. (2011) sobre calamar *Loligo formosana*.

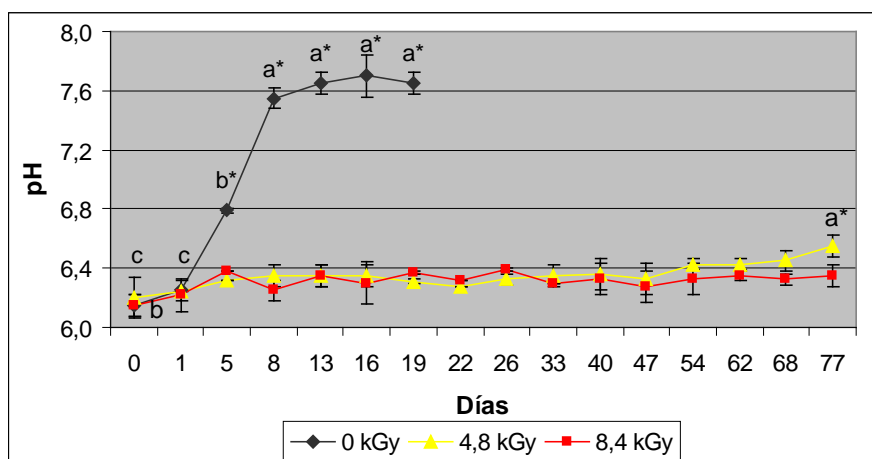


Figura 4.2.4. Valores de pH durante almacenamiento en refrigeración de anillas de calamar irradiadas. Letras diferentes indican diferencias significativas del pH debido al tiempo de almacenamiento. * Indica diferencias significativas debido a la dosis ($p < 0,05$).

El pH de las anillas sin irradiar aumentó significativamente ($p < 0,05$) durante el almacenamiento, alcanzando un valor máximo de 7,7 a los 16 días. Este comportamiento fue similar al observado en la irradiación preliminar, en la que el pH de las anillas sin irradiar alcanzó un valor de 8,4 a los 22 días.

En las muestras irradiadas el pH no sufrió modificaciones significativas hasta los 68 días, cuando alcanzaron un valor medio de $6,40 \pm 0,09$ sin que se manifestaran diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$). Hacia el final del estudio (día 77), se observó que las anillas irradiadas con 4,8 kGy presentaron un valor de pH significativamente mayor ($p < 0,05$) que aquellas irradiadas con 8,4 kGy. El valor de pH en las muestras irradiadas con 4,8 y 8,4 kGy fue $6,55 \pm 0,07$ y $6,35 \pm 0,07$, respectivamente, a los 77 días.

El aumento de pH durante el almacenamiento de este tipo de productos está relacionado con la actividad de las bacterias productoras de bases volátiles (Connell, 1975; Huss, 1999), las cuales son radiosensibles por pertenecer al grupo de las Gram negativas (Josephson, 1983). La aplicación de la irradiación inhibió el desarrollo de la flora microbiana y consecuentemente, el aumento del pH en las muestras irradiadas fue menor en comparación con el control. A su vez, en las anillas irradiadas con 4,8 kGy se evidenció un incremento de pH hacia el final del almacenamiento, por la consecuente acumulación de las bases volátiles producida por la recuperación de la flora microbiana durante el almacenamiento.

4.2.2.2.b. Comportamiento del NBVT

Con respecto a la producción de bases nitrogenadas volátiles, se puede observar en la **Figura 4.2.5** un comportamiento muy similar al de la evolución del pH y a aquel hallado en la irradiación preliminar.

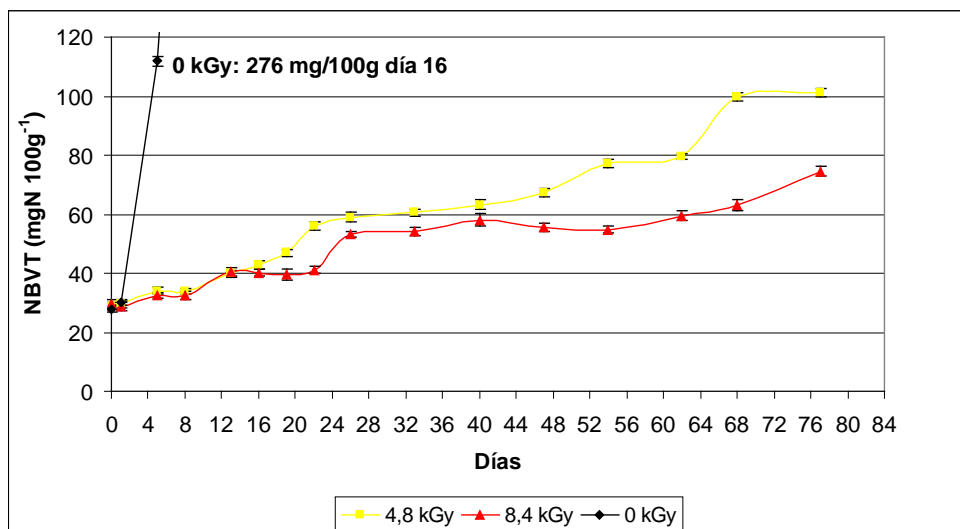


Figura 4.2.5. Valores de NBVT durante almacenamiento en refrigeración de anillas de calamar irradiadas

El valor promedio inicial fue $28,9 \pm 0,9$ mg/100 g, similar al hallado en la irradiación preliminar y algo mayor al descrito por otros autores que trabajaron con distintas especies de calamar (Sungsri-in et al., 2011; Lapa-Guimaraes et al., 2005). Este valor se encuentra en relación con los recuentos microbianos detectados en la materia prima.

El NBVT no fue afectado ($p > 0,05$) por la aplicación de la irradiación gamma el día posterior al tratamiento. En las anillas control el mismo aumentó exponencialmente hasta $276,7 \pm 2,5$ mg/100 g a los 16 días. La fase exponencial de producción de NBVT estaría relacionada con la fase logarítmica del crecimiento microbiano y el inicio del deterioro (Massa et al., 2012; Huss, 1995). En las muestras irradiadas el valor inicial de NBVT se mantuvo sin modificaciones significativas ($p > 0,05$) durante 8 días. A partir de ese momento aumentó ($p < 0,05$) en las anillas irradiadas con 4,8 y 8,4 kGy, siendo este aumento más pronunciado en las muestras irradiadas con 4,8 kGy.

A partir del quinto día el NBVT del control fue significativamente mayor ($p < 0,05$) al de las anillas irradiadas. Desde el día 19, el valor de NBVT fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en las muestras a 4,8 kGy en comparación con 8,4 kGy, hasta el día 77. Este

aumento de NBVT en el control y en las anillas irradiadas con 4,8 kGy podría atribuirse en parte a la alta carga bacteriana inicial de las muestras y, además, al importante desarrollo microbiano en las anillas sin irradiar y al desarrollo de bacterias psicrótrofas observado en las anillas con 4,8 kGy a partir del día 13. Asimismo, este incremento de las bases volátiles explicaría el aumento del pH en los mismos tiempos de almacenamiento. El incremento paulatino de NBVT observado en las muestras irradiadas con 8,4 kGy, en las que no se detectaron bacterias durante 77 días, podría deberse a la producción enzimática de DMA y NH₃ durante el almacenamiento en refrigeración (Ciarlo, 1985; Huss, 1999).

La producción de bases nitrogenadas fue disminuida por el tratamiento de irradiación debido a la reducción de las poblaciones microbianas por el mismo. De las bases volátiles que se cuantifican con el NBVT, se encuentra la trimetilamina que se forma producto de reducción del OTMA debido a la actividad bacteriana (Connell, 1975; Huss, 1999) (**Sección 2.2**).

Se analizó la relación entre los recuentos de psicrótrofas y la producción de bases nitrogenadas volátiles, dado que la flora psicrótrofa Gram negativa es la flora típica deteriorante del pescado fresco, grupo al que pertenecen las bacterias productoras de NBVT. Se encontró una alta correlación entre los mismos ($R^2 = 0,889$, $y = 5,885x^2 - 32,139x + 44,995$) y se observó que la producción de NBVT aumentaba a partir de valores de recuentos de bacterias psicrótrofas de 1×10^5 UFC/g, aproximadamente (**Figura 4.2.6**).

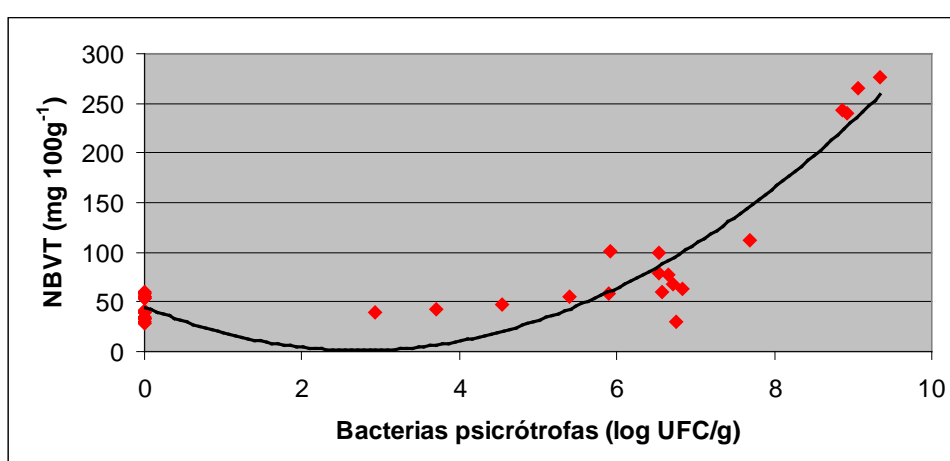


Figura 4.2.6. Correlación entre el recuento de bacteria psicrótrofas y el NBVT durante almacenamiento en refrigeración de anillas de calamar irradiadas.

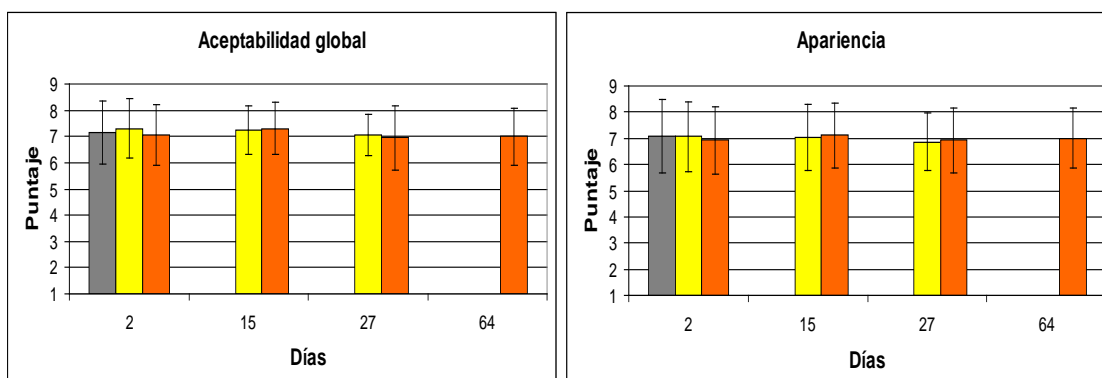
Los resultados hallados en las anillas sin irradiar son coincidentes con resultados presentados por diversos autores durante el almacenamiento del calamar (Lapa-Guimaraes et al., 2005; Sungsi-in et al., 2011). A su vez, el comportamiento del NBVT durante el almacenamiento de las anillas irradiadas fue también observado en calamar salado y fermentado (Byun et al., 2000) y otros productos pesqueros irradiados (Badr, 2012; Jeevanandam et al., 2001; Lakshmanan et al., 1999; Narvaiz et al., 1989).

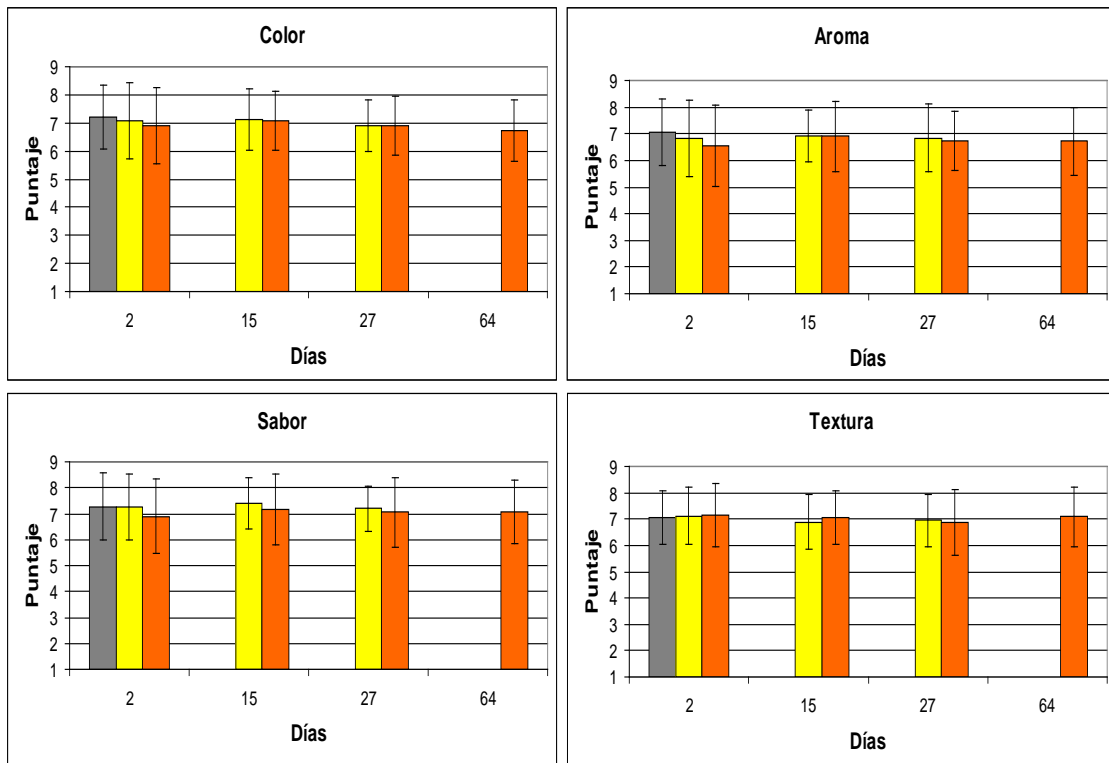
4.2.2.3. Aceptabilidad sensorial

La población utilizada en el test de aceptabilidad sensorial (50 panelistas en cada fecha de evaluación) estuvo compuesta en un 60% de mujeres y un 40% de varones, en un rango etéreo comprendido entre 20 y 60 años.

La primera evaluación fue realizada luego de dos días de aplicada la irradiación (día 2). Los panelistas evaluaron 3 muestras correspondientes a las anillas irradiadas con 0, 4,8 y 8,4 kGy.

Como se muestra en las **Figuras 4.2.7** para el día 2, el promedio para todos los atributos y todas las muestras fue mayor o igual a 7 (excepto para el aroma que fue mayor a 6,5), lo que corresponde a *me gusta* en la escala hedónica utilizada, indicando aceptación de las anillas irradiadas y el control por parte de los panelistas. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Badr (2012) en salmón ahumado, quien menciona que no hubo diferencias en la aceptabilidad sensorial del aroma, sabor y la textura de filetes de salmón irradiados con 2, 3 y 4 kGy. Se observó que en ningún atributo hubo diferencias significativas entre las muestras ($p > 0,05$), lo que indica que los evaluadores no detectaron diferencias en aceptabilidad global, la apariencia, el color, el aroma, el sabor y la textura de las anillas sin irradiar y las tratadas con 4,8 y 8,4 kGy.





Figuras 4.2.7. Resultados de los tests de aceptabilidad sensorial para las muestras 0 (■), 4,8 (■) y 8,4 (■) kGy, durante 64 días de almacenamiento en refrigeración

Luego de 15 y 27 días de almacenamiento en refrigeración se analizaron solamente las anillas irradiadas con 4,8 y 8,4 kGy.

La muestra control no fue presentada a los panelistas para el análisis sensorial dado que antes del día 5 los recuentos de bacterias psicrótrofas ya superaban el valor recomendado de 1×10^6 UFC/g (**Figura 4.2.1**). Además, el deterioro se hizo evidente por la presencia de olor pútrido y la formación de manchas de color rosado en las anillas, por lo que las muestras sin irradiar se descartaron el día 5. Este comportamiento fue similar al observado en la irradiación preliminar, con la diferencia que el deterioro de estas anillas se evidenció más temprano, posiblemente por el mayor nivel de recuentos microbianos hallado.

A los 15 y 27 días, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en la aceptabilidad global, apariencia, color, aroma, sabor y textura debido a la dosis de irradiación, entre las muestras irradiadas con 4,8 y 8,4 kGy. A su vez, el promedio para todos los atributos fue igual o mayor a 7, indicando que la aceptabilidad de estas muestras irradiadas se mantuvo constante luego de 27 días de almacenamiento refrigerado.

El día 64 fueron evaluadas solamente las anillas irradiadas con 8,4 kGy. Las muestras irradiadas con 4,8 kGy fueron descartadas para su análisis dado que luego de 30 días los recuentos de bacterias psicrótrofas superaban el valor 1×10^6 UFC/g y las anillas mostraron signos de deterioro manifestados como cambios en el aroma y el color.

En esta evaluación los atributos aceptabilidad global, apariencia, color, aroma, sabor y textura presentaron un promedio superior a 6,8. Estos resultados indican que se mantuvo el grado de aceptabilidad de la muestra irradiada con 8,4 kGy por parte de los panelistas durante 64 días de almacenamiento refrigerado.

Estos resultados coinciden con lo observado en la irradiación preliminar con respecto a la dosis de 4 kGy y demuestran que las anillas toleraron bien una dosis de 8,4 kGy. Este es un resultado sumamente importante considerando la futura comercialización de este tipo de producto, ya que demuestra que el mismo fue muy bien aceptado, sin que se detectaran diferencias debido a la irradiación en ninguno de los aspectos sensoriales analizados, incluso con la de mayor intensidad de dosis utilizada.

El tiempo de almacenamiento no tuvo un efecto significativo ($p > 0,05$) sobre la aceptabilidad global, la apariencia, el color, el aroma, el sabor y la textura de las anillas irradiadas con 4,8 y 8,4 kGy, durante 27 y 64 días, respectivamente, mientras que las anillas fueron descartadas a los 5 días por el grado de deterioro. Por lo tanto, la irradiación gamma a 4,8 y 8,4 kGy permitió extender el tiempo en que las anillas fueron sensorialmente aceptables durante la refrigeración.

Los resultados obtenidos en las características sensoriales evaluadas indican que la irradiación gamma con 8,4 kGy no produjo efectos indeseables en la aceptabilidad sensorial de las anillas de calamar, permitiendo extender la misma en más de 11 veces en comparación con las anillas sin irradiar, estando sujetas a la temperatura de conservación usual en estos productos.

Esta extensión de la aceptabilidad sensorial debido a la irradiación también se observó en la irradiación preliminar y fue descrita por otros autores en productos pesqueros irradiados (Bard, 2012; Jeevanandam et al., 2001). Además, Mbarki et al. (2009) observaron que filetes de caballa (*Scomber japonicus*) irradiados con 1,5 kGy, ya sea envasados al vacío o no, presentaron una mayor aceptabilidad sensorial con respecto a las muestras análogas sin irradiar. La preferencia por las muestras irradiadas se debería a una menor resistencia a la masticación de las mismas. En esta experiencia, aproximadamente el 50% de los panelistas expresaron en el espacio destinado a

comentarios de la hoja de respuestas, una preferencia por las anillas irradiadas en comparación con el control, la cual fue atribuida una mejor masticabilidad de las anillas irradiadas. Este hecho es muy importante dado que el calamar presenta un tejido tisular muy particular y diferente al de los peces, por lo que la textura del calamar ha sido objetada en ciertos casos por resultar muy dura. A pesar que esta tendencia no se haya visto reflejada en los resultados del test de aceptabilidad, fue tomada en cuenta como un aspecto interesante para continuar con el estudio de los cambios inducidos por la irradiación gamma sobre la textura del calamar. Se planea continuar con este estudio en una instancia posdoctoral (Beca Posdoctoral, CONICET), con el fin de seguir profundizando en el tema, pero sobre la base de los resultados hallados en este trabajo, mediante el cual fue posible obtener un producto fresco de calamar con mayor vida útil y características sensoriales aceptables, por la aplicación de la irradiación gamma.

4.2.2.4. Color

La evolución de los parámetros L^* , a^* y b^* durante el almacenamiento refrigerado de anillas de calamar se presenta en las **Figuras 4.2.8 a 4.2.10**.

Antes de la irradiación, los valores de L^* , a^* y b^* fueron $71,4\pm 1,0$; $-2,2\pm 0,4$ y $6,7\pm 0,6$, respectivamente. Se observa que los tres parámetros fueron mayores a los hallados en la irradiación preliminar ($62,9\pm 0,5$; $-3,9\pm 0,2$ y $2,4\pm 0,3$, respectivamente), lo que se debería posiblemente a la diferencias en la calidad de las materias primas utilizadas, debidas al manipuleo y acondicionamiento de los calamares a bordo, así como del procesamiento en planta. Por ejemplo, se ha comprobado que el pelado del calamar disminuye la formación de manchas de color rosado en el manto (Sungsri-in et al., 2010), por lo que las diferencias en el tiempo que transcurrió entre la captura y el pelado pueden haber influido sobre el parámetro a^* . A su vez, en esta experiencia las anillas presentaron valores iniciales de bacterias psicrótrofas y mesófilas más altos que los de la irradiación preliminar.

Sin embargo, los resultados obtenidos durante el almacenamiento y debido a la irradiación gamma son similares a aquellos de la irradiación preliminar. Se observó también aquí un incremento de los parámetros L^* , a^* y b^* durante la refrigeración, al mismo tiempo que un retraso en estos cambios debido a la irradiación gamma.

El parámetro L^* aumentó en el control significativamente ($p < 0,05$) superando al de las muestras irradiadas a partir del día 5. En las anillas irradiadas con 4,8 kGy, L^* se

mantuvo sin cambios hasta el día 13, cuando aumentó significativamente y fue mayor ($p < 0,05$) al de las anillas irradiadas con 8,4 kGy hasta el final del almacenamiento. Ese momento coincidió con la detección de desarrollo microbiano en dichas muestras (4,8 kGy). Mientras tanto, L^* fue constante en las anillas irradiadas con 8,4 kGy hasta el día 22, en el que comenzó a aumentar.

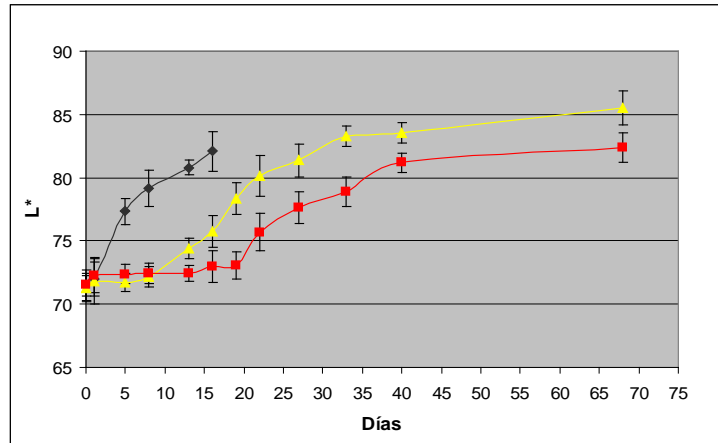


Figura 4.2.8. Evolución de L^* en anillas de calamar irradiadas con 0 (♦), 4,8 (▲) y 8,4 (■) kGy durante el almacenamiento en refrigeración. Error estándar representado por barras.

A partir del quinto día, se evidenció en las anillas sin irradiar un incremento del valor de a^* , este valor se superó en las anillas irradiadas. Hasta el día 19 no hubo cambios en el valor de a^* en las anillas irradiadas con 4,8 kGy, luego de lo cual el mismo aumentó superando los valores de las anillas irradiadas con 8,4 kGy, no presentándose cambios en éstas ($p > 0,05$) hasta el día 68.

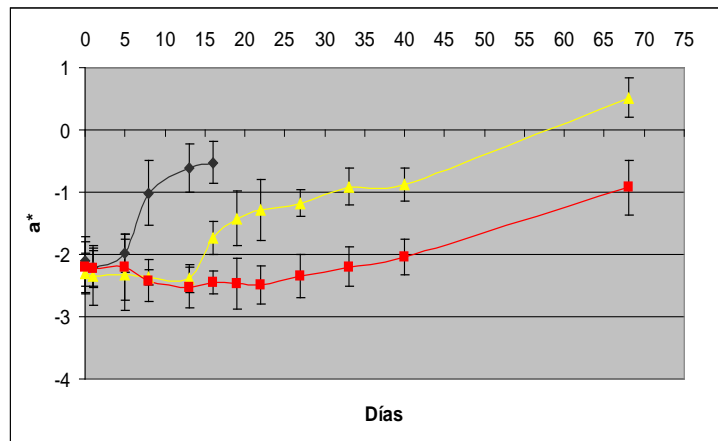


Figura 4.2.9. Evolución de a^* en anillas de calamar irradiadas con 0 (♦), 4,8 (▲) y 8,4 (■) kGy durante el almacenamiento en refrigeración. Error estándar representado por barras.

Con respecto al parámetro b^* , el mismo aumentó significativamente en el control, superando a los valores de las anillas irradiadas a partir del día 1. En las anillas con 4,8 kGy, b^* aumentó a partir del día 22, en el que fue mayor ($p < 0,05$) al valor de las anillas

irradiadas con 8,4 kGy. En estas últimas, b^* se mantuvo sin cambios ($p>0,05$) hasta el día 68.

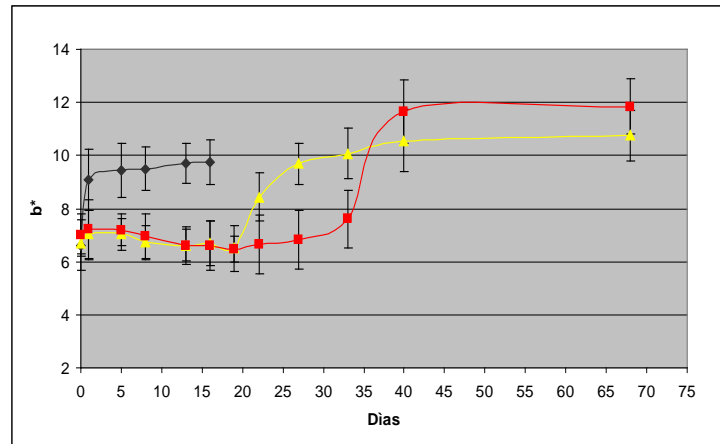


Figura 4.2.10. Evolución de b^* en anillas de calamar irradiadas con 0 (♦), 4,8 (▲) y 8,4 (■) kGy durante el almacenamiento en refrigeración. Error estándar representado por barras.

Los tres parámetros (L^* , a^* y b^*) aumentaron significativamente ($p<0,05$) con el tiempo de almacenamiento indicando la aparición de coloración rosada (aumento de a^*) y de pigmentos amarillos (aumento de b^*). Sin embargo, se observó una aparición más lenta de dichos cambios a mayor dosis de irradiación, como se aprecia en las **Figuras 4.2.7**.

En la **Figura 4.2.11** se observa que la diferencia de color (DE2000) aumentó significativamente ($p<0,05$) en el control siendo mayor que en las anillas irradiadas a partir del día 5. En las anillas irradiadas DE2000 aumentó durante el almacenamiento pero más lentamente que en el control, siendo en las muestras irradiadas con 4,8 kGy mayor al de las irradiadas con 8,4 kGy a partir del día 19. Estos resultados están de acuerdo con la evolución observada en los parámetros L^* , a^* y b^* durante el almacenamiento en refrigeración.

La irradiación gamma permitió retardar la diferencia de color en una manera dependiente con la dosis de irradiación.

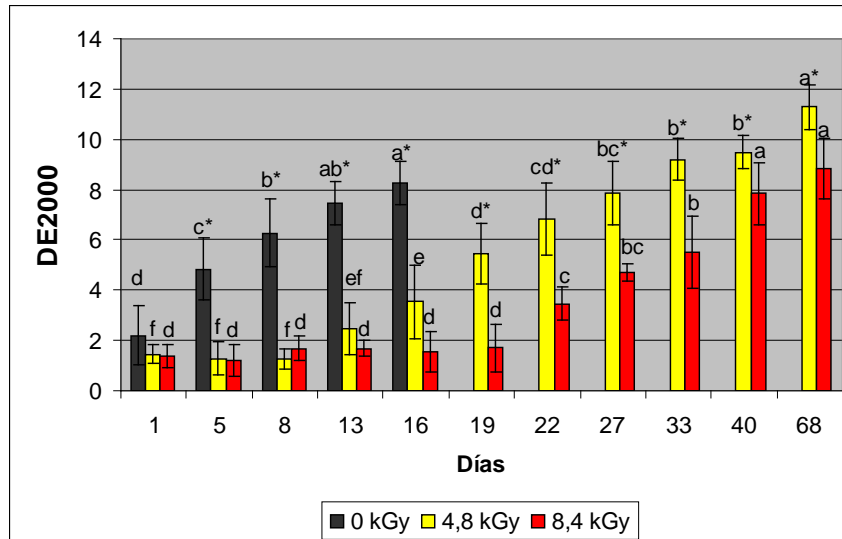


Figura 4.2.11. Evolución de la diferencia de color de las anillas de calamar durante el almacenamiento en refrigeración. Letras distintas son significativamente diferentes debido al tiempo. * indica diferencias debido a la dosis de irradiación ($p < 0,05$). Error estándar representado por barras.

La irradiación a 8,4 kGy permitió mantener una constancia en los parámetros L^* , a^* y b^* durante 22, 68 y 68 días, respectivamente, mientras que en la muestra control los mismos aumentaron abruptamente luego de 5 días de almacenamiento. La inhibición del desarrollo de la flora microbiana por la irradiación, habría interferido con la lisis celular de origen microbiano, reduciendo de esta manera la reactividad química de los compuestos involucrados con los cambios de color.

De acuerdo con los resultados de la experiencia preliminar, la irradiación gamma disminuyó los cambios de color asociados al deterioro, sin inducir modificaciones en el color característico inmediatamente luego de ser aplicada.

En base al límite microbiológico aceptado por la ICMSF (1983) para pescado y moluscos frescos (**Sección 2.2**) y a partir de los resultados de la irradiación preliminar se planteó la posibilidad que el valor de microorganismos psicrótrofos 1×10^6 UFC/g fuera representativo del límite máximo aceptable para la anillas de calamar *Illex argentinus* sin piel almacenadas en refrigeración, ya que indicaría el final del tiempo en el que el mismo presenta una calidad global adecuada.

En esta experiencia se pudo observar nuevamente una relación entre los indicadores del deterioro y dicho valor, ya que los valores de los parámetros de color fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) a los de las muestras irradiadas a los 5 días de almacenamiento, lo que estaría de acuerdo a lo observado microbiológica y

sensorialmente. A los 5 días el recuento de bacterias psicrótrofas de la muestra control superaba el valor de 1×10^6 UFC/g cuando las anillas presentaban signos de deterioro como cambios en el color y el aroma.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados hallados en ambas experiencias, se considera que para este producto almacenado en refrigeración, un valor de recuentos de bacterias psicrótrofas de 1×10^6 UFC/g, sería indicativo del tiempo de vida útil, de acuerdo con los valores máximos aceptables según ICMSF (1983).

Considerando dicho valor, se puede decir que la irradiación con 4,8 y 8,4 kGy permitió extender la vida útil de las anillas de calamar refrigeradas en al menos 6 y 11 veces (comparando con el producto análogo sin irradiar) sin modificar la aceptabilidad de sus características sensoriales.

4.2.3. Conclusiones parciales

Los resultados de esta experiencia confirmaron y convalidaron aquellos hallados en la irradiación preliminar. La irradiación gamma permitió reducir cargas microbianas y disminuir la producción de bases volátiles, los cambios del pH y del color asociados con el deterioro, siendo más pronunciado el efecto cuanto mayor fue la dosis aplicada.

A su vez, se pudo corroborar que el valor de recuento de bacterias psicrótrofas de 1×10^6 UFC/g sería indicativo del tiempo de vida útil para las anillas de calamar almacenadas en refrigeración. Teniendo en cuenta esto, se puede decir que la irradiación gamma a 4,8 y 8,4 kGy permitió extender la vida comercial de las anillas en 35 y 70 días, respectivamente, durante la refrigeración.

Las anillas irradiadas con 4,8 y 8,4 kGy presentaron una buena aceptabilidad sensorial, que fue comparable a la de las anillas sin irradiar y que además se mantuvo constante durante 27 y 64 días en refrigeración, respectivamente, mientras que las anillas sin irradiar fueron descartadas a los 5 días debido al avanzado grado de deterioro.

Desde el punto de vista de la aplicabilidad de la irradiación, y teniendo en cuenta la reglamentación del CAA, se puede decir que es factible tratar anillas de calamar con irradiación gamma a 4 kGy, ya que en el caso que la parte del bulto irradiado que se encuentre más cerca de la fuente de radiación reciba una dosis de 8 kGy (el doble de la

dosis propuesta, como está permitido por el CAA), el producto será sensorialmente aceptable.

Se cumplió con el objetivo planteado, habiéndose comprobado la factibilidad práctica de extender la vida de comercialización de las anillas de calamar refrigeradas en más de 5 veces en comparación con las muestras sin irradiar, mediante la irradiación gamma a 4 kGy, sin modificar su aceptabilidad sensorial, incluso si la dispersión de dosis es tal que las muestras puedan recibir hasta el doble de esta dosis.

Este resultado, además de demostrar la factibilidad de obtener un producto fresco de calamar con una vida útil extendida y aceptable sensorialmente, reviste importancia para la industria, ya que se estaría incrementando en 25 días el tiempo de comercialización de las anillas de calamar, lo cual es significativo tratándose de un producto tan perecedero, cuya vida útil no suele superar los 8-10 días en refrigeración.

Por lo tanto un rango de dosis de irradiación hasta 4,8 kGy podría ser aplicado en este producto, desde el punto de vista sensorial y microbiológico, dependiendo de los objetivos particulares que se persigan con la irradiación en otros casos, como podría ser la modificación de propiedades tecnológicas.

IRRADIACIÓN COMERCIAL EN ANILLAS DE CALAMAR PROCESADAS INDUSTRIALMENTE

4.3 Irradiación comercial de anillas de calamar tratadas con soluciones comerciales con poli-fosfato de sodio y envasadas al vacío.

En la industria pesquera, además de elaborarse anillas de calamar frescas, las mismas también son procesadas con soluciones de poli-fosfatos que permiten disminuir el exudado durante el almacenamiento. Las anillas tratadas de esta manera suelen comercializarse envasadas al vacío y congeladas.

El uso de poli-fosfatos es muy común en productos cárnicos y pesqueros para retener la humedad natural, el flavor y nutrientes, mejorar la textura y reducir las pérdidas de fluidos durante la cocción y el almacenamiento (*drip loss*), así como para retardar la oxidación lipídica y estabilizar el color (Gonçalves & Ribeiro, 2008, 2009; Knipe 2004; Lampila, 1993).

A su vez, la aplicación comercial de la irradiación gamma difiere en algunos aspectos de la irradiación aplicada con fines de investigación, como por ejemplo, en el tamaño de los bultos que se irradian, en la uniformidad de dosis que se obtiene en dicho proceso y en los dosímetros utilizados para determinar la misma.

Por lo tanto, el objetivo de esta experiencia fue analizar el efecto de distintas dosis de irradiación comercial sobre diferentes parámetros de calidad de anillas de calamar *Illex argentinus* elaboradas industrialmente.

Para ello se utilizaron anillas de calamar procesadas que habían sido tratadas con poli-fosfato de sodio y envasadas al vacío para su comercialización. A su vez, se llevó a cabo una irradiación comercial, para obtener resultados que reflejen fielmente los procesos que tendrían lugar en la aplicación industrial de la tecnología de irradiación. De acuerdo a los antecedentes obtenidos en esta tesis con la irradiación preliminar y definitiva se utilizaron dosis comprendidas en el rango de las mencionadas.

No se ha hallado en la bibliografía antecedentes de estudios del efecto de la irradiación sobre un producto de calamar fresco tratado con poli-fosfatos. Asimismo se considera importante el acercamiento a las condiciones que serían utilizadas por la industria en el momento de la adopción de esta tecnología.

4.3.1 Tratamiento de la materia prima y metodología utilizada

Las anillas sin piel de *Illex argentinus* de $1,2 \pm 0,3$ cm de espesor, las cuales estaban pre-tratadas con una solución de poli-fosfatos (Farmesa S.A., Argentina), fueron adquiridas en la zona portuaria de Mar del Plata. Las anillas presentaron un contenido de agua de $85,2 \pm 0,5$ mg/100g. Las mismas fueron envasadas al vacío en bolsas de PEBD/PA. Las muestras fueron transportadas al Centro Atómico Ezeiza donde se irradiaron comercialmente según las descripciones del **Capítulo 3**, con 1,8; 3,3 y 5,8 kGy (dosis mínimas absorbidas). Las dosis fueron determinadas con dosímetros de Amber Perspex.

Tanto las muestras irradiadas como las no irradiadas (control, 0 kGy) fueron almacenadas a 4-5 °C durante 29 días y analizadas antes del tratamiento de irradiación y en los días 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26 y 29 posteriores a dicho tratamiento. Cada muestra consistió en una bolsa cerrada al vacío con 120 ± 2 gr de anillas de calamar (aproximadamente 20 anillas), contándose con 3 muestras para cada día de análisis y cada dosis de irradiación.

Se cuantificaron bacterias psicrótrofas, mesófilas, *Staphylococcus* spp., coliformes totales, *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli* y se determinó el NBVT y el color (L*, a*, b* y DE2000) de acuerdo a lo descrito en el **Capítulo 3**. Los factores del ANOVA fueron dosis (0; 1,8; 3,3 y 5,8 kGy) y días (0, 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26 y 29 d).

4.3.2 Resultados y discusión

4.3.2.1 Aspectos microbiológicos

En la **Figura 4.3.4** se muestra la evolución de la flora psicrótrofa en anillas de *Illex argentinus* envasadas al vacío, durante el almacenamiento en refrigeración. La flora inicial de $2,8 \times 10^4 \pm 4,6 \times 10^2$ UFC/g aumentó significativamente en el control durante todo el período de almacenamiento, mientras que la misma fue reducida en 1, 1,8 y 3,4 ciclos logarítmicos con dosis de irradiación gamma de 1,8; 3,3 y 5,8 kGy, respectivamente.

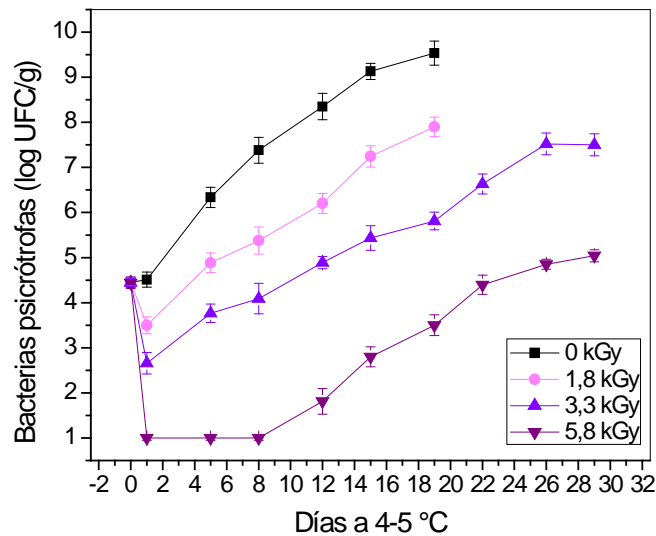


Figura 4.3.4. Evolución de bacterias psicrótrofas (log UFC/g) en anillas de calamar envasadas al vacío durante almacenamiento a 4-5 °C (media \pm error estándar, n=3).

Luego de la reducción inicial inducida por la irradiación, la flora psicrótrofa aumentó significativamente ($p < 0,05$) llegando a valores de $3,9 \times 10^9$, $1,8 \times 10^8$ y $5,1 \times 10^5$ UFC/g en las muestras irradiadas con 0, 1,8 y 3,3 kGy, respectivamente, en el día 19. En las muestras irradiadas a 5,8 kGy no se detectó desarrollo de psicrótrofos durante los primeros 8 días, pero luego de este período, los recuentos aumentaron significativamente hasta $1,4 \times 10^4$ UFC/g el día 19. La población de flora psicrótrofa de las muestras sin irradiar fue significativamente mayor ($p < 0,05$) a la de las muestras irradiadas durante todo el período de almacenamiento, ya que su velocidad de desarrollo fue superior (**Sección 4.4**).

Los resultados estadísticos indicaron que la irradiación gamma redujo significativamente la flora psicrótrofa en una manera dependiente con la dosis de irradiación, es decir, a mayor dosis, menores recuentos microbianos ($p < 0,05$).

La dosis de 1,8 kGy fue suficiente para reducir los recuentos microbianos en comparación con el control, si bien el efecto biocida de la irradiación gamma fue más significativo con 3,3 y 5,8 kGy. Por ejemplo, a los 19 días, la flora psicrótrofa era 1; 3,8 y 5,5 ciclos logarítmicos menor que el control para las muestras irradiadas con 1,8; 3,3 y 5,8 kGy respectivamente, por lo tanto, las dosis más altas analizadas en este trabajo serían más eficientes para extender la vida útil microbiológica de las anillas de calamar, tal cual fue observado en las experiencias anteriores.

Teniendo en cuenta el valor máximo de bacterias psicrótrofas recomendado para especies pesqueras (1×10^6 UFC/g) y definido como tal en las experiencias anteriores (**Secciones 4.1 y 4.2**), se podría decir que la irradiación gamma a 1,8; 3,3 y 5,8 kGy permitió extender la vida útil microbiológica de las anillas envasadas al vacío en 7, 15 y más de 24 días, respectivamente, en comparación con las anillas sin irradiar.

En la **Figura 4.3.5** se presenta el comportamiento de la flora mesófila en las anillas de calamar, durante el almacenamiento en refrigeración.

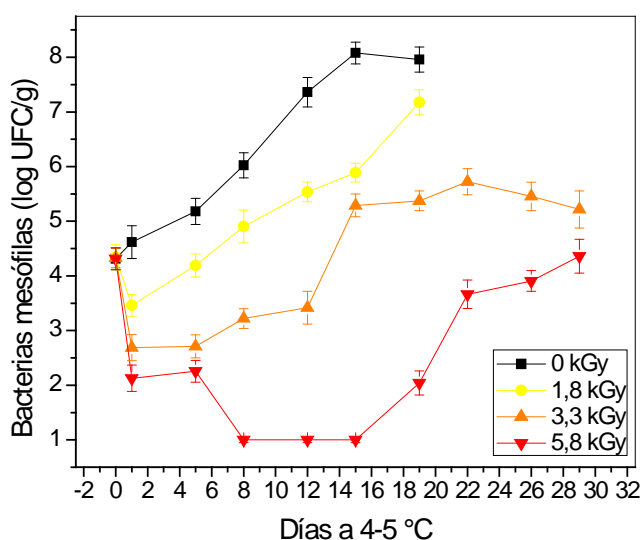


Figura 4.3.5. Recuentos de bacterias mesófilas durante el almacenamiento en refrigeración de anillas de calamar envasadas al vacío.

El recuento inicial de bacterias mesófilas fue $2,1 \times 10^4 \pm 6,5 \times 10^2$ UFC/g. La irradiación gamma a dosis de 1,8; 3,3 y 5,8 kGy produjo reducciones de 0,9; 1,6 y 2,2 ciclos logarítmicos en la flora mesófila, respectivamente. Este hecho muestra el efecto significativo de la irradiación para reducir la flora mesófila en comparación con las muestras sin irradiar.

En las muestras sin irradiar, el recuento de bacterias mesófilas aumentó durante el almacenamiento alcanzando $9,1 \times 10^7$ UFC/g a los 19 días y fue significativamente mayor ($p < 0,05$) al de las muestras irradiadas durante todo el período.

El recuento de mesófilos aumentó significativamente durante 19 días en las muestras irradiadas con 1,8 kGy, pero a una velocidad menor que en el control ($p < 0,05$). La población de mesófilos también aumentó en las muestras irradiadas con 3,3 kGy durante 22 días.

Luego de 19 días de almacenamiento en refrigeración, se logró la reducción de 1, 3 y 6 ciclos logarítmicos en las anillas irradiadas con 1,8; 3,3 y 5,8 kGy, respectivamente, en comparación con el control, indicando que las dosis de irradiación más altas

permitieron obtener menores recuentos microbianos, como fuera observado con la flora psicrótrófa.

Durante el almacenamiento, el comportamiento microbiano en las anillas irradiadas con 1,8 y 3,3 kGy fue similar al del control, con una fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, las anillas irradiadas con 5,8 kGy tuvieron un comportamiento diferente, en las que los recuentos de mesófilos disminuyeron durante el almacenamiento (días 8, 12 y 15) por debajo ($p < 0,05$) de los valores del día posterior a la irradiación. Este hecho también fue comentado por Kodo (1990) quien observó un comportamiento similar en filetes de caballa irradiados.

La flora psicrótrófa fue superior a la mesófila, siendo la flora deteriorante típica de los productos pesqueros almacenados en refrigeración.

De acuerdo con los resultados de bacterias mesófilas, se observó la presencia de coliformes totales el día 5 en las anillas sin irradiar y luego de 12 y 19 en las anillas irradiadas con 1,8 y 3,3 kGy, respectivamente. No se detectó desarrollo de coliformes totales durante 29 días en las anillas irradiadas con 5,8 kGy.

Asimismo, el desarrollo de colonias de *Staphylococcus* spp. se observó a los 8 días en las anillas sin irradiar y luego de 12, 15 y 19 días en las anillas irradiadas con 1,8; 3,3 y 5,8 kGy, respectivamente.

De acuerdo a estos resultados se puede decir que la irradiación gamma redujo el desarrollo de coliformes totales y *Staphylococcus* spp. en anillas de calamar envasadas al vacío.

Como se mencionó en el **Capítulo 3**, la presencia de coliformes y *Staphylococcus* spp. se debería a la contaminación por manipulación del producto. Por este motivo, se justificaría la aplicación de la irradiación tanto desde el aspecto de extensión del tiempo de comercialización así como de la mejora de la calidad sanitaria de este producto de calamar mínimamente procesado.

No se detectó desarrollo de los patógenos investigados (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli*) en ninguna de las muestras irradiadas o sin irradiar, durante todo el período de almacenamiento.

Se pudo observar que la inactivación microbiana tanto de bacterias psicrótrofas como mesófilas, lograda por las diferentes dosis de irradiación gamma en las anillas envasadas al vacío fue menor a la obtenida en las anillas envasadas en atmósfera natural (**Secciones 4.1 y 4.2**). Este fenómeno se explicaría por el efecto radio-protector

del vacío, ya que la ausencia de oxígeno en el envasado al vacío aumentaría la resistencia microbiana a la irradiación (Wills, 1985).

Estos resultados demuestran que la irradiación gamma redujo las poblaciones de bacterias psicrótrofas y mesófilas de anillas de calamar envasadas al vacío y tratadas con poli-fosfatos, con un comportamiento similar a los anteriores dependiente de la dosis, permitiendo extender su vida útil microbiológica y por lo tanto su vida comercial.

Por lo tanto, la aplicación comercial de la irradiación en anillas de calamar elaboradas industrialmente con poli-fosfatos haría factible la extensión del tiempo de comercialización de dicho producto.

4.3.2.2.2. Resultados de las determinaciones fisicoquímicas

En la **Figura 4.3.6** se puede ver el comportamiento del NBVT durante la refrigeración de las anillas de calamar.

El valor inicial de NBVT fue $15,2 \pm 0,2$ mg/100g, siendo menor al hallado en las experiencia preliminar anterior (26,7 mg/100g), lo que se atribuye a la variabilidad de la materia prima, debido a diferencias en el manipuleo y almacenamiento a bordo y manipuleo en planta de elaboración.

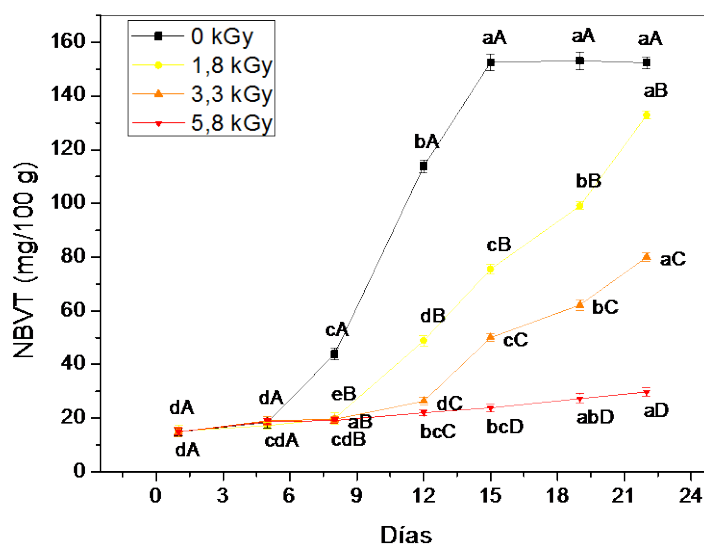


Figura 4.3.6. NBVT en anillas de calamar envasadas al vacío durante almacenamiento a 4-5 °C. Letras distintas (a, b, c, d, e, f) y (A, B, C, D) son diferentes significativamente debido a la dosis y al tiempo, respectivamente ($p < 0,05$).

El NBVT aumentó durante el almacenamiento tanto en el control como en las anillas irradiadas, pero a diferentes velocidades de producción dependiendo de la dosis de irradiación y del tiempo de almacenamiento. La producción de NBVT fue inversa a la intensidad de dosis aplicada (con dosis más altas se alcanzaron valores más bajos de NBVT y se vio considerablemente acelerada luego de 5 días en las anillas sin irradiar, aumentando exponencialmente). Este tipo de comportamiento es usual en productos pesqueros mantenidos en hielo y en refrigeración, donde existe un comportamiento exponencial en la producción de NBVT debido al desarrollo microbiano (Huss, 1995; Massa et al., 2012). Mientras que hicieron falta 8 y 12 días para que se alcanzara la fase de producción acelerada en las anillas irradiadas con 1,8 y 3,3 kGy, respectivamente. En las anillas irradiadas con 5,8 kGy la producción de NBVT sólo aumentó linealmente sin que alcanzara la fase exponencial durante los 22 días en refrigeración. El NBVT fue significativamente mayor ($p < 0,05$) entre las muestras, de acuerdo al siguiente orden: $0 > 1,8 > 3,3 > 5,8$ kGy, desde el día 8 hasta el final del almacenamiento.

Dosis de 1,8; 3,3 y 5,8 kGy permitieron alcanzar reducciones de NBVT del 52%, 69% y 86%, respectivamente, con respecto a las anillas sin irradiar, luego de 15 días de almacenamiento en refrigeración. Esto estaría de acuerdo con lo hallado por Alur et al. (1994) en pescado fresco, en el que las bases volátiles totales fueron reducidas entre un 50 y 60% en las muestras irradiadas en comparación con el control.

La irradiación gamma retardó el deterioro de las anillas al disminuir en mayor medida la producción de NBVT a mayor intensidad de dosis (**Figura 4.3.6**), de acuerdo con los resultados microbiológicos.

Durante la etapa autolítica, el nivel de TMA se mantendría en sus valores iniciales. Una vez que se hace más importante la proliferación bacteriana la producción de TMA a partir de OTMA se acelera (Huss, 1995; Oehlenschläger, 1997). La irradiación gamma tendría poco efecto sobre los sistemas enzimáticos (Ahn & Lee, 2006; Kodo, 1990; Molins, 2001; Urbain, 1986) pero un considerable efecto bactericida lo cual fue observado en esta experiencia y en las anteriores.

La inactivación y reducción de las poblaciones microbianas por la irradiación gamma implicaría una disminución de la TMA, base nitrogenada volátil que se evalúa en conjunto con las otras bases como NBVT, lo que llevaría a una reducción de la velocidad de acumulación del mismo. Esto se pudo comprobar a través de la alta correlación ($R^2 = 0,904$) entre los resultados de NBVT y la población de bacterias psicrótrofas durante el

almacenamiento, la cual se muestra en la **Figura 4.3.7** ($NBVT = 3,25 (\log N)^2 - 18,36 (\log N) + 38,92$). Asimismo, se puede observar que el valor de NBVT comenzó a aumentar significativamente a partir de recuentos de psicrótrofos superiores a 1×10^5 UFC/g, como fuera observado en las experiencias anteriores.

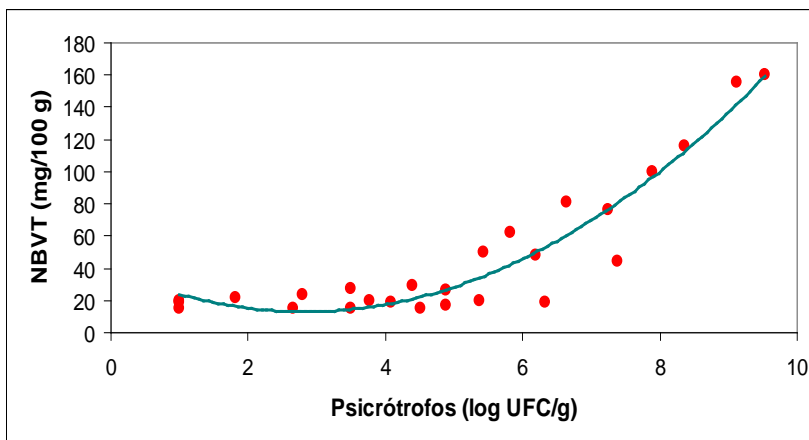


Figura 4.3.7. Correlación entre la población de bacterias psicrótrofas y el NBVT en anillas de calamar irradiadas.

Las anillas irradiadas con 5,8 kGy presentaron mejores valores microbiológicos y químicos, ya que a los 29 días la población de psicrótrofos era menor a $1,0 \times 10^5$ UFC/g y la velocidad de producción de NBVT fue significativamente menor que la de las muestras irradiadas con 1,8 y 3,3 kGy (**Sección 4.5**).

Estos resultados confirman la eficiencia de la irradiación para retrasar el deterioro microbiológico y químico de las anillas de calamar, incrementando por lo tanto su tiempo de comercialización.

4.3.2.2.3. *Color*

Los cambios de color durante el almacenamiento están representados en las **Figuras 4.3.8** a **4.3.11**, donde se muestra la evolución de los parámetros L^* , a^* , b^* y DE2000 en las anillas de calamar.

Cómo fuera observado en las experiencias anteriores, no hubo cambios significativos en los parámetros de color debido a la irradiación el día posterior a aplicarse la misma, es decir, la irradiación gamma no indujo cambios en el color de las anillas de calamar. En la **Figura 4.3.8** se muestran las anillas irradiadas con las 4 dosis, a los dos días de aplicada la irradiación, donde se puede observar dicho resultado.



Figura 4.3.8. Anillas de calamar irradiadas con 0, 1,8; 3,3 y 5,8 kGy, a los dos días de aplicada la irradiación.

Durante el almacenamiento, los valores de L^* aumentaron significativamente ($p < 0,05$) en las anillas sin irradiar desde $52,2 \pm 1,2$ hasta $63,8 \pm 1,6$ a los 22 días, mientras que L^* de las anillas irradiadas no cambió durante el mismo período (**Figura 4.3.9**). A partir del quinto día, el valor de L^* en las anillas control fue significativamente ($p < 0,05$) superior al de las muestras irradiadas, sin que hubiera diferencias entre las muestras irradiadas con 1,8, 3,3 y 5,8 kGy.

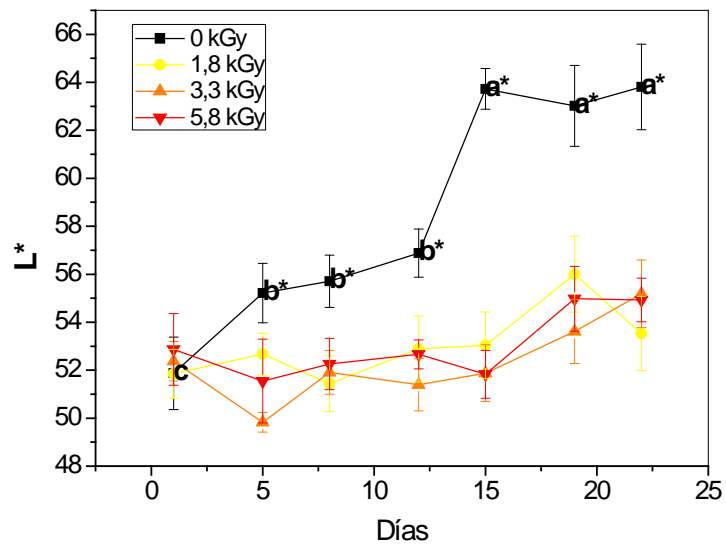


Figura 4.3.9. Evolución de L^* en anillas de calamar durante almacenamiento a 4-5 °C. Error estándar representado por barras. Letras distintas son significativamente diferentes debido al tiempo de almacenamiento. Valores con * indican diferencias debido a la dosis.

El valor de b^* aumentó desde $-6,6 \pm 1,0$ hacia la gama de amarillos en las anillas sin irradiar hasta $-3,3 \pm 1,4$, siendo significativamente mayor ($p < 0,05$) que el de las anillas irradiadas a partir del día 12 (**Figura 4.3.10**). En las anillas irradiadas b^* se mantuvo sin cambios durante 22 días, variando entre -7 y -6 ($p > 0,05$). No hubo diferencias entre las muestras irradiadas con 1,8; 3,3 y 5,8 kGy, indicando que el valor de b^* fue independiente de la intensidad de dosis en las anillas irradiadas durante 22 días.

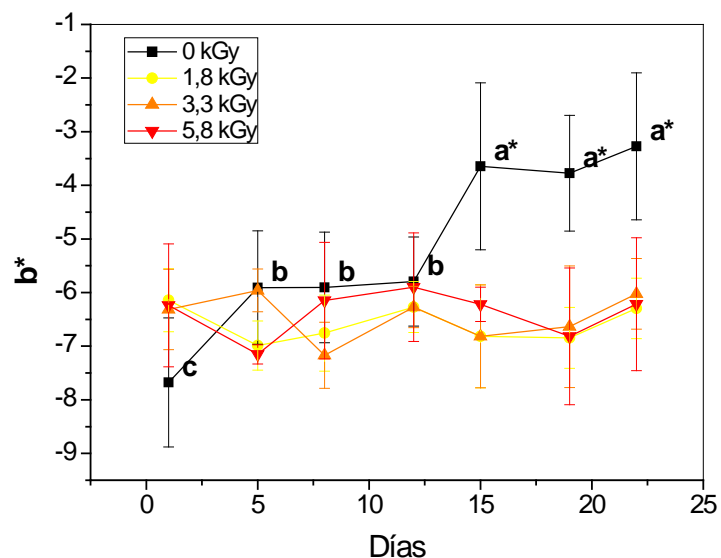


Figura 4.3.10. Evolución de b^* en anillas de calamar durante almacenamiento a 4-5 °C. Error estándar representado por barras. Letras distintas son significativamente diferentes debido al tiempo de almacenamiento. Valores con * indican diferencias debido a la dosis.

Con respecto al parámetro a^* , no hubo cambios significativos en las anillas irradiadas ($p>0,05$) mientras que en el control se observó una leve disminución ($p<0,05$) desde $-2,6\pm 1,2$ hasta $-4,8\pm 0,8$ durante el almacenamiento (**Figura 4.3.11**).

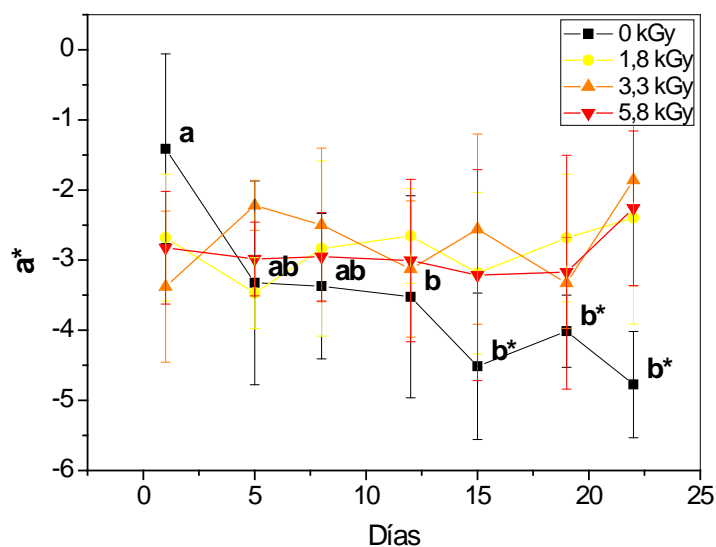


Figura 4.3.11. Evolución de a^* en anillas de calamar durante almacenamiento a 4-5 °C. Error estándar representado por barras. Letras distintas son significativamente diferentes debido al tiempo de almacenamiento. Valores con * indican diferencias debido a la dosis.

Los valores iniciales de L^* , a^* y b^* de las anillas de calamar utilizadas en esta experiencia fueron menores a los hallados en las experiencias descritas en las **Secciones 4.1** y **4.2**. Esto se podría atribuir al tratamiento con poli-fosfatos, ya que las soluciones utilizadas a nivel industrial para tubo y anillas de calamar suelen contener también sustancias blanqueadoras.

El valor inicial de DE2000 (3,1) aumentó significativamente ($p<0,05$) en las anillas sin irradiar durante el almacenamiento, alcanzando un valor 12,3 el día 22. A partir del octavo día de almacenamiento fue significativamente superior al de las anillas irradiadas. De acuerdo con el comportamiento de los parámetros L^* , a^* y b^* , no hubo diferencias de DE2000 entre las muestras irradiadas debido al tiempo de almacenamiento ($p>0,05$) (**Figura 4.3.12**).

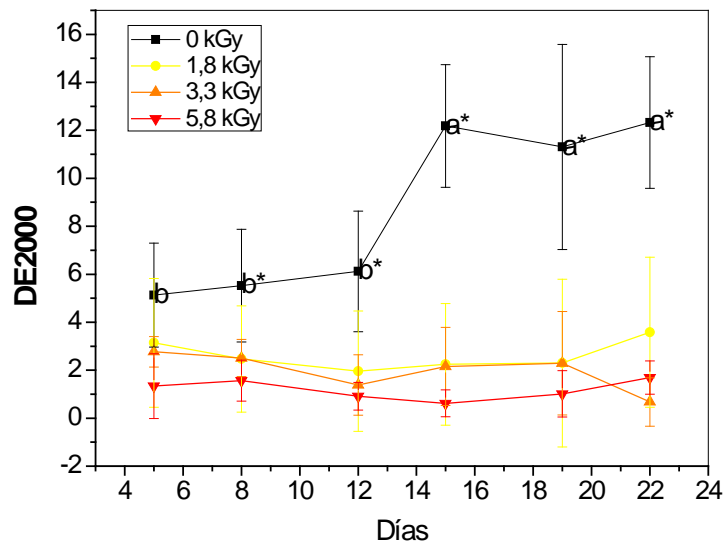


Figura 4.3.12. Evolución de DE2000 en anillas de calamar durante almacenamiento a 4-5 °C. Error estándar representado por barras. Letras distintas son significativamente diferentes debido al tiempo de almacenamiento. Valores con * indican diferencias debido a la dosis.

La irradiación gamma permitió mantener las características iniciales de color de anillas de calamar durante 22 días a 4-5 °C, mientras que los parámetros de color cambiaron significativamente en las anillas sin irradiar, con aumentos en los valores L^* y b^* , y una leve disminución en a^* .

Los resultados hallados en las anillas sin irradiar están de acuerdo con lo observado en las experiencias anteriores y con lo informado por Lapa- Guimaraes et al. (2001) en cuanto al aumento de L^* y de b^* . Sin embargo el comportamiento de a^* fue algo diferente, ya que el mismo mostró una tendencia decreciente con el tiempo de almacenamiento mientras que en las experiencias anteriores aumentó. El valor de a^* está relacionado con la formación de manchas rosas en calamar y se ha observado el incremento de a^* durante el deterioro del mismo, como fuera discutido en la **Sección 4.1**. En esta experiencia no se detectó la formación de manchas rosas en las anillas irradiadas ni en el control, lo que se podría explicar por la mejora y estabilización del color debida al pre-tratamiento con poli-fosfato de sodio (Gonçalves & Ribeiro, 2008, 2009; Knipe 2004; Lampila, 1993).

Con respecto a las anillas irradiadas, el comportamiento de los parámetros de color durante el almacenamiento fue diferente al observado en la experiencia detallada en la **Sección 4.1** que trata sobre la irradiación preliminar, en la que se encontró que L^* , a^* y b^* aumentaban significativamente durante el almacenamiento a 4-5 °C, aunque en menor

medida y más tarde que en la muestra control. En esta experiencia, L^* , a^* y b^* se mantuvieron sin cambios en las anillas irradiadas, durante 22 días de almacenamiento a 4-5 °C, posiblemente debido al tratamiento previo con poli-fosfato de sodio.

Las condiciones de esta experiencia (envasado al vacío junto con la irradiación gamma) redujeron los cambios en el parámetro b^* , el cual estaría también relacionado con la oxidación de lípidos. Asimismo, el tratamiento con poli-fosfato de sodio habría sido efectivo para estabilizar el color al quelar iones metálicos que actúan como co-factores enzimáticos, inhibiendo la oxidación de las grasas y los consecuentes cambios en b^* . El aumento de b^* en las anillas sin irradiar se explicaría por la pérdida de frescura relacionada con reacciones de deterioro bacterianas, como fuera observado en las experiencias anteriores. La efectividad de la irradiación gamma para mantener los parámetros de color inalterados durante el almacenamiento tendría que ver con la reducción de la flora microbiana inducida por la irradiación (**Sección 4.3.2.1**).

La irradiación gamma en conjunto con el tratamiento previo con poli-fosfato de sodio y el envasado al vacío evitó los cambios de color asociados con el deterioro sin inducir modificaciones en el color característico de las anillas de calamar durante 22 días de almacenamiento a 4-5 °C.

Asimismo, fue útil para reducir la formación de pigmentos amarillos, de manchas rosas y de tintes blancos, disminuyendo las reacciones deteriorantes asociadas al color.

La irradiación gamma aplicada comercialmente mejoró la calidad de un producto de calamar mínimamente procesado, demostrando que la vida útil de este producto podría extender sin modificaciones en el color característico.

Asimismo, de la experiencia descrita en la **Sección 4.2**, que trata sobre la irradiación definitiva, se desprende que la aceptabilidad sensorial de estas anillas no se vería comprometida por la irradiación a la intensidad de dosis aplicadas (1,8; 3,3 y 5,8 kGy), ya que se observó que la irradiación a 8,4 kGy no produjo modificaciones en las características sensoriales de las anillas de calamar. Además, el envasado al vacío disminuiría los cambios sensoriales causados por la irradiación, en comparación con el envasado en atmósfera natural (Badr, 2012).

4.3.3 Conclusiones parciales

La aplicación comercial de la irradiación gamma mejoró la calidad microbiológica de anillas de calamar tratadas por inmersión con poli-fosfatos y envasadas al vacío, al disminuir las poblaciones de bacterias psicrótrofas y mesófilas y retardar el crecimiento de coliformes totales y *Staphylococcus* spp. Se observó una reducción dependiente con la dosis, que permitió alcanzar menores recuentos microbianos a mayor intensidad de dosis de irradiación.

La producción de NBVT durante el almacenamiento fue menor cuanto mayor fuera la intensidad de la dosis aplicada, indicando un retardo en el deterioro, en concordancia con los resultados microbiológicos. Dosis más altas permitieron retrasar la fase exponencial de producción, relacionada con el deterioro de origen bacteriano.

La irradiación gamma a dosis de 1,8; 3,3 y 5,8 kGy junto con la aplicación de poli-fosfato y el envasado al vacío permitieron mantener los parámetros de color de las anillas sin cambios durante 22 días de almacenamiento a 4-5 °C.

La irradiación comercial colaboró con la disminución de la velocidad de las reacciones del deterioro que llevan a la pérdida de calidad de estas anillas de calamar *Illex argentinus* mínimamente procesadas, permitiendo extender la vida útil de las mismas.

De acuerdo a lo presentado se puede concluir que la irradiación comercial de anillas de calamar elaboradas industrialmente mediante un tratamiento con poli-fosfatos y envasadas al vacío permitió obtener un producto de buena calidad microbiológica y estable durante un mayor período de tiempo en comparación con las muestras sin irradiar, cuyas características de color se mantuvieron inalterables durante 22 días de almacenamiento en refrigeración. La dosis más alta aplicada (5,8 kGy) permitió extender el tiempo de estabilidad microbiológica (bacterias psicrótrofas $< 1 \times 10^6$ UFC/g) en más de 24 días en refrigeración, comparando con el producto no irradiado.

MODELADO DE LA INACTIVACIÓN Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS PSICRÓTROFAS EN ANILLAS DE CALAMAR

4.4 Modelado de la inactivación y crecimiento de bacterias psicrótrofas en anillas de calamar

El objetivo de esta experiencia fue hallar modelos matemáticos que describan la inactivación de la flora psicrótrofa producto de la irradiación gamma en anillas de calamar, así como el comportamiento de la flora sobreviviente durante el almacenamiento en refrigeración. Asimismo, desarrollar una expresión que permita predecir la vida útil alcanzada por el producto en función de la dosis de irradiación.

Para cumplir con tales objetivos, se analizó el efecto de la irradiación gamma a dosis de 0; 1,8; 3,3 y 5,8 kGy sobre la flora psicrótrofa en anillas de calamar (*Illex argentinus*) envasadas al vacío, durante el almacenamiento a 4-5 °C.

Mediante una ecuación cinética de primer orden se describió satisfactoriamente la inactivación de la flora psicrótrófica inducida por la irradiación gamma para dosis entre 0 y 5,8 kGy.

El crecimiento de la flora sobreviviente durante el almacenamiento fue ajustado a dos modelos matemáticos empíricos: el modelo de crecimiento de Gompertz modificado (Zwietering et al., 1990) y una expresión polinomial dependiente de la dosis de irradiación y del tiempo de almacenamiento. Además, se describió la influencia de la dosis de irradiación sobre los parámetros cinéticos del modelo de Gompertz mediante polinomios de segundo orden.

4.5.1 Tratamiento de la materia prima y metodología utilizada

Se trabajó con los resultados del desarrollo de bacterias psicrótrofas descritos en el Capítulo anterior (**Sección 4.3**).

Se modeló la inactivación de la flora psicrótrofa inducida por la irradiación gamma y se determinó el valor D_{10} para dicho grupo microbiano, según la metodología descrita en el **Capítulo 3**.

Se modeló el crecimiento de la flora psicrótrofa durante el almacenamiento en refrigeración en función de la dosis de irradiación y del tiempo de almacenamiento mediante dos enfoques distintos, tal cual lo descrito en el **Capítulo 3**.

Se desarrollaron expresiones que permitieran hacer predicciones de la vida útil de las anillas según la dosis de irradiación. El modelo que presentó el mejor ajuste fue validado utilizando datos independientes de otra experiencia de irradiación.

4.5.2. Resultados y discusión

4.5.2.1. Modelado de la inactivación de la flora psicrótrofa

Como fue descrito con detalle en la **Sección 4.3**, la irradiación gamma a 1,8; 3,3 y 5,8 kGy redujo significativamente ($p < 0,05$) el recuento inicial de flora psicrótrofa (4,45 log UFC/g) a 3,50, 2,66 y < 1 log UFC/g, respectivamente. Mientras tanto, la flora psicrótrofa en las muestras sin irradiar fue de 4,51 log UFC/g el día posterior a la irradiación.

El recuento de psicrótrofos de las muestras sin irradiar aumentó significativamente ($p < 0,05$) durante el almacenamiento en refrigeración mientras que el crecimiento de la flora sobreviviente en las muestras irradiadas fue retardado por la irradiación en una manera dependiente con la dosis.

En la **Figura 4.4.1** se muestra la curva de supervivencia de la flora psicrótrofa, producto de la inactivación microbiana provocada por la irradiación gamma. Allí se puede ver que la relación entre los logaritmos de las bacterias psicrótrofas luego de la irradiación y las bacterias iniciales depende linealmente de la dosis de irradiación.

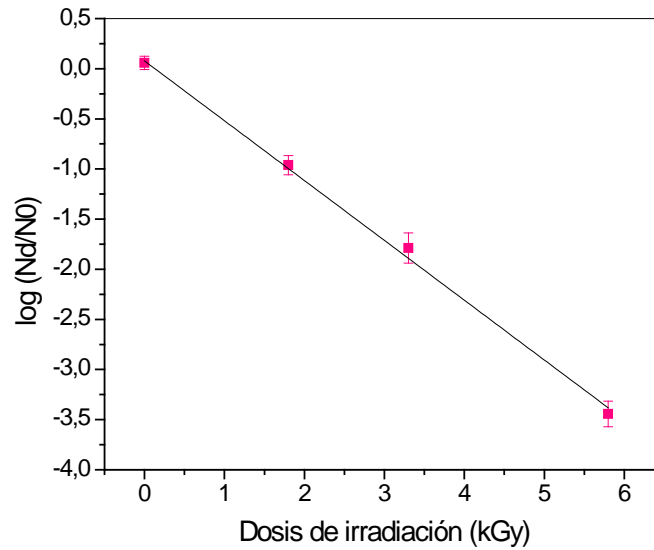


Figura 4.4.1. Curva de supervivencia de la flora psicrotrófica en anillas de calamar irradiadas (media \pm error estándar, n=3).

A partir del análisis de regresión lineal de los resultados experimentales se derivó la **Ecuación 4.4.1**:

$$\text{Log } N(d) = - 0,606 \cdot d + 4,572$$

Ecuación 4.4.1

Esta ecuación permitió describir satisfactoriamente ($R^2=0,998$) la inactivación de las bacterias psicrotróficas, indicando que una cinética de primer orden representa apropiadamente la respuesta de la flora psicrotrófica frente a la irradiación gamma. Cuando la dosis de irradiación se aumenta en 1 kGy, se produce una reducción logarítmica de 0,606 en el valor de recuento de psicrotrófos. A partir de esta relación, se obtuvo el valor de D_{10} para la flora psicrotrófica como la inversa de la pendiente, de acuerdo a varios autores (Aguirre et al., 2011; Bassen et al., 1989; Wang et al., 2010), indicando que 1,65 kGy provocan una reducción de 1 ciclo logarítmico en la flora psicrotrófica de anillas de calamar envasadas al vacío.

Como se mencionó en la introducción, son diversos los factores que influyen sobre la resistencia microbiana a la inactivación radio-inducida, como la composición de la matriz alimentaria, la temperatura y la atmósfera del envase. Es por este motivo que existen diferentes valores de D_{10} para el mismo microorganismo en las referencias bibliográficas. Si bien no se hallaron referencias de datos del valor de D_{10} para bacterias psicrotróficas en anillas de calamar, Prachasitthisakdi et al. (1984) estudiaron la irradiación

de camarones congelados y a partir de los resultados de inactivación de la flora psicrótrófa se estimó un valor de D_{10} de 1,176.

Algunos autores han mencionado la presencia de “hombros” en las curvas típicas de supervivencia para la inactivación bacteriana por irradiación, los que son atribuidos al daño celular reparable cuando se aplican dosis bajas de irradiación (Moseley, 1989; van Gerwen et al., 1999). En este trabajo no se observó dicho comportamiento (**Figura 4.4.1**).

La **Ecuación 4.4.1** es útil para predecir la inactivación microbiana causada por la irradiación gama a dosis entre 0 y 5,8 kGy, conociéndose el recuento inicial de bacterias.

4.4.2.2. Modelado del crecimiento de bacterias psicrótrofas durante almacenamiento en refrigeración de anillas de calamar irradiadas.

4.4.2.2.1 Modelo empírico de crecimiento

La ecuación de Gompertz modificada es un modelo empírico que ha sido ampliamente utilizado para modelar el crecimiento microbiano (Gibson & Roberts, 1989). Diversos trabajos indican que los resultados experimentales fueron modelados con mayor precisión utilizando dicha ecuación en comparación con otros modelos.

En la **Figura 4.4.2** se muestran las poblaciones de psicrótofos determinadas experimentalmente (puntos) en anillas de calamar irradiadas con 0, 1,8, 3,3 y 5,8 kGy y su ajuste al modelo de Gompertz modificado (línea continua). Allí se puede ver que los resultados experimentales presentaron un comportamiento sigmoideal.

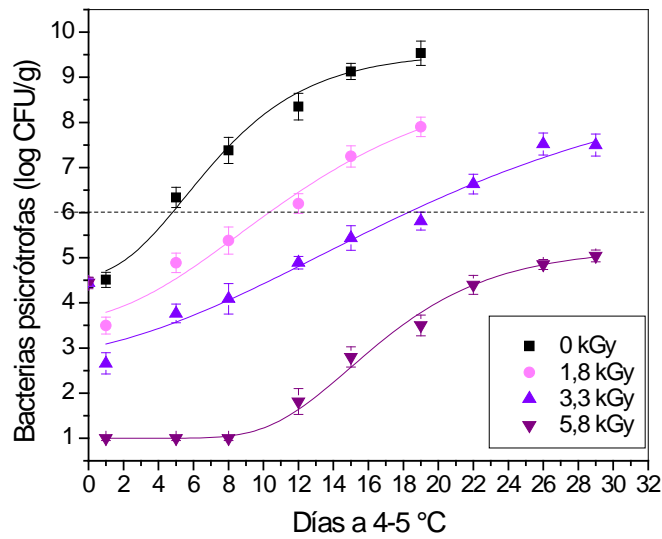


Figura 4.4.2. Evolución de bacterias psicrótrofas (log UFC/g) durante el almacenamiento en refrigeración de anillas de calamar tratadas con irradiación gamma. Las líneas continuas representan el ajuste del modelo de Gompertz modificado.

En la **Tabla 4.4.1** se muestran los parámetros del modelo de Gompertz (μ , L, A), el coeficiente de determinación (R^2), la raíz del error cuadrático medio (RMSE) y la significancia (valor p) del modelo de Gompertz modificado ajustado a las curvas de crecimiento experimental de bacterias psicrótrofas en anillas de calamar irradiadas con las distintas dosis. Los cuatro sets de datos experimentales (0; 1,8; 3,3 y 5,8 kGy) se modelaron correctamente con el modelo de Gompertz, como lo indican la alta significancia de los modelos ajustados ($p < 0,0001$), el bajo RMSE ($< 0,23$) y los altos valores de R^2 (0,964 - 0,994).

Tabla 4.4.1. Parámetros del modelo de Gompertz (μ , L, A) ajustado a las curvas de crecimiento experimental de bacterias psicrótrofas en anillas de calamar irradiadas.

Dosis (kGy)	μ (log UFC/g días ⁻¹)	L (días)	A (log UFC/g)	R^2 *	RMSE	Valor p
0	0,429 ± 0,066	1,251 ± 0,865	5,181 ± 0,361	0,982	0,184	<0,0001
1,8	0,278 ± 0,044	1,206 ± 1,265	5,653 ± 1,391	0,964	0,220	<0,0001
3,3	0,200 ± 0,020	1,341 ± 1,250	6,398 ± 1,061	0,975	0,222	<0,0001
5,8	0,290 ± 0,024	9,342 ± 0,561	4,385 ± 0,215	0,994	0,109	<0,0001

* Coeficiente de determinación (R^2), raíz del error cuadrático medio (RMSE) y significancia (valor p).

Otros autores han modelado satisfactoriamente los resultados experimentales de crecimiento microbiano en alimentos utilizando el modelo de Gompertz (Castro, 2008;

Giannuzzi et al., 1998; Huang, 2010; Lebert et al., 2000). En particular, Wang et al. (2006) modelaron la cinética de crecimiento microbiano en lechuga irradiada utilizando la ecuación de Gompertz modificada.

El ajuste de la ecuación de Gompertz modificada a los datos experimentales indicó que la velocidad de crecimiento específica (μ) tendió a disminuir con mayores dosis de irradiación con respecto a las muestras sin irradiar. Sin embargo, $\mu_{5,8 \text{ kGy}}$ fue más alta que $\mu_{3,3 \text{ kGy}}$. Este fenómeno se podría explicar por la selección de la flora inducida por la irradiación a una dosis más alta (5,8 kGy). La inactivación inicial de la flora predominante causada por la irradiación gamma habría permitido el posterior desarrollo de microflora más radio-resistente, inicialmente inhibida por las especies predominantes. Este comportamiento también fue explicado por Kodo (1990), basándose en los resultados hallados en filetes de caballa irradiados.

El efecto de la dosis de irradiación sobre la fase lag (L) fue evidente en las anillas irradiadas con la dosis más alta aplicada, dado que la irradiación con 5,8 kGy provocó un aumento significativo de la fase lag de aproximadamente 8 unidades, mientras que dosis de 1,8 y 3,3 kGy no causaron una extensión considerable de la misma. La duración de la fase lag depende de una variedad de factores que incluyen la carga microbiana inicial y el tiempo necesario para que los microorganismos se sobrepongan al daño físico inducido por la irradiación. El efecto de la irradiación sobre los mismos es proporcional a la intensidad de dosis aplicada, indicando que mayores intensidades de dosis causarían la muerte microbiana y daño celular en un mayor grado, por lo que la reducción de la población bacteriana sería mayor, como fuera observado anteriormente. Las anillas irradiadas con dosis más altas tendrán por lo tanto menores recuentos microbianos y además, esta población estará seriamente dañada. Las células injuriadas necesitarían más tiempo para sintetizar las macromoléculas y reparar el daño antes de poder llegar a la división celular. Durante la fase lag no se observa un incremento en el número de células, sin embargo, tienen lugar una cantidad significativa de actividades metabólicas dentro de la célula, así como mecanismos de reparación. Estas razones explicarían el hecho que se haya observado una fase lag más extensa en las anillas irradiadas con la mayor intensidad de dosis, dado que la flora se vio reducida y la población sobreviviente inactivada, pero no muerta, estaría reparando el daño causado por la irradiación hasta ser capaz de desarrollarse.

La relación entre los parámetros μ , L y A y la dosis de irradiación fue determinada mediante el ajuste de ecuaciones polinomiales de segundo orden (**Figuras 4.4.3**). Galati et al. (2011) pudieron describir satisfactoriamente la influencia de la temperatura sobre los parámetros del modelo de Gompertz (μ , L y A) mediante polinomios de segundo

orden al modelar el efecto de la temperatura y la actividad de agua sobre el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* en maíz.

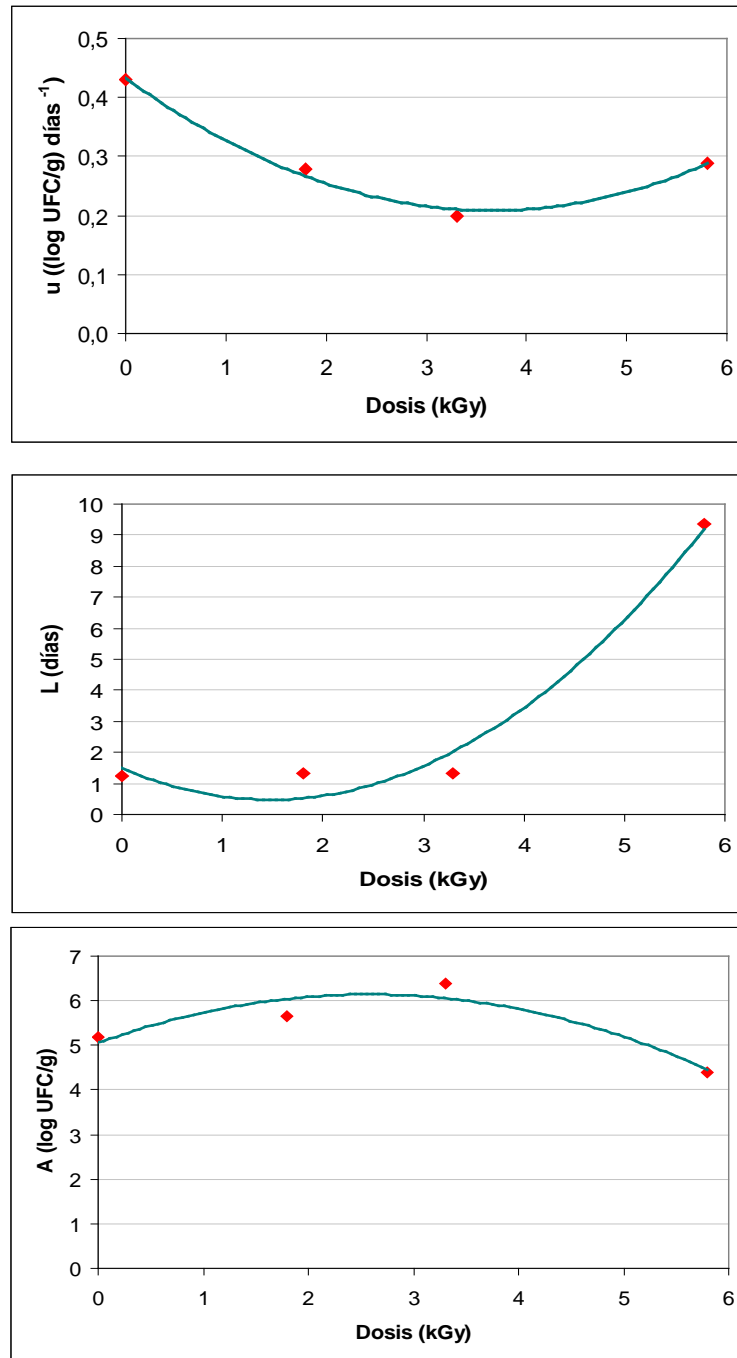
De las **Figuras 4.4.3** se desprenden las expresiones polinomiales que presentaron el mejor ajuste para cada parámetro:

$$\mu = 0,4329 - 0,1232d + 0,0169d^2 \quad (R^2=0,990)$$

$$L = 1,4963 - 1,3812d + 0,4670d^2 \quad (R^2=0,976)$$

$$A = 5,0590 + 0,8392d - 0,1626d^2 \quad (R^2=0,865)$$

Ecuaciones 4.4.2



Figuras 4.4.3. Ajustes polinomiales de los parámetros μ , L y A en función de la dosis de irradiación.

Al introducir los modelos polinomiales secundarios (**Ecuaciones 4.4.2**) en la ecuación de Gompertz (**Ecuación 3.4**), así como el modelo de inactivación derivado de los resultados experimentales (**Ecuación 4.4.1**), se desarrolló el modelo completo de Gompertz modificado (**MCGM**):

$$\log N = -0.606d + 4,572 + (5.059 + 0.839d - 0.163d^2) \exp E \quad \text{Ecuación 4.4.3}$$

Donde

$$E = \left[-\exp \left(\frac{(0.433 - 0.123d + 0.017d^2)}{(5.059 + 0.839d - 0.163d^2)} e (1.496 - 1.381d + 0.467d^2 - t) \right) + 1 \right]$$

d es la dosis de irradiación (kGy), N es el recuento de bacterias psicrótrofas para una dosis dada (log UFC/g), e es el número de Euler y t es el tiempo de almacenamiento en días. Este modelo completo es útil para predecir la población de psicrótrofos cuando se aplica dosis de irradiación entre 0 y 5,8 kGy, si se conoce la población microbiana inicial.

Las predicciones de las poblaciones microbianas hechas con este modelo completo presentaron un EPr de 4,5%.

4.4.2.2.2. Modelo polinomial

Se propuso un modelo polinomial de orden 2 para analizar el ajuste de los datos a una expresión matemática de mayor simplicidad que describiera la relación entre el crecimiento de las bacterias psicrótrofas en función de la dosis de irradiación y del tiempo de almacenamiento.

El análisis estadístico del modelo completo (**Ecuación 3.6**) indicó que el término cuadrático de la variable dosis (β_3) no fue significativo para el modelo ($p > 0,05$). Asimismo, el modelo que mejor describió los datos experimentales ($R^2 = 0,981$) fue: $y = 4,9330 - 0,8169 \chi_1 + 0,2772 \chi_2 - 0,0018 \chi_2^2 - 0,0140 \chi_1 \chi_2$ (**Ecuación 4.4.4**)

siendo "y" el recuento de psicrótrofos en log (UFC/g) y χ_1 y χ_2 las variables independientes dosis y tiempo, respectivamente.

En la **Tabla 4.4.2** se detallan los resultados del análisis de varianza para el modelo significativo ($p < 0,0001$).

Tabla 4.4.2. Resultados del ANOVA para el modelo polinomial.

Coeficientes	Estimados	Error estándar	Valor p
β_0	4,9330	0,1541	<0,00001
β_1	-0,8169	0,0402	<0,00001
β_2	0,2772	0,0189	<0,00001
β_4	-0,0018	0,0007	<0,1
β_5	-0,0140	0,0029	<0,00001

En la **Figura 4.4.4** se muestra la superficie predictiva producida por este modelo, la cual presenta las diferentes velocidades de desarrollo de flora psicrótrófa durante el almacenamiento y las mayores reducciones de la flora inicial alcanzada por dosis de irradiación más altas, tal cual lo descrito por el modelo de inactivación.

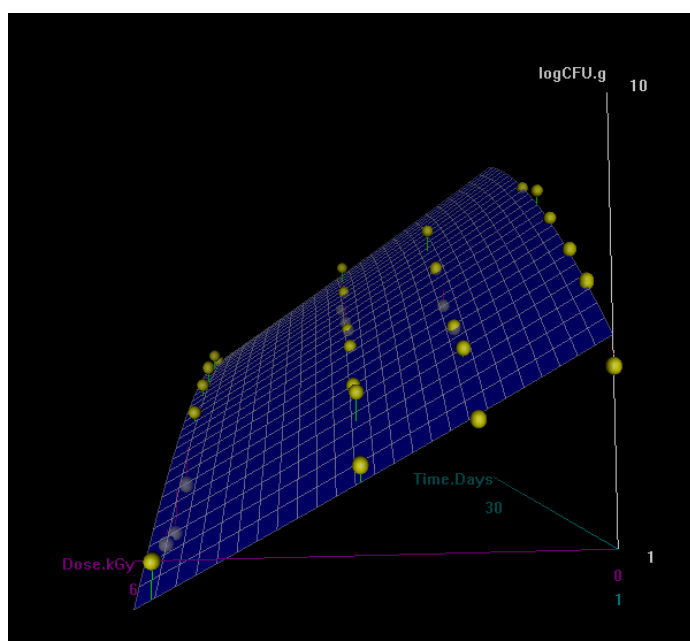


Figura 4.4.4. Superficie predictiva de la flora psicrótrófa en anillas de calamar irradiadas durante almacenamiento a 4-5 °C en condiciones de vacío.

Este modelo permite la estimación de los recuentos de bacterias psicrótrofas para una dosis dada con un 11,9% de EPr.

Los dos modelos permiten predecir con precisión el comportamiento de la población de bacterias psicrótrofas en anillas de calamar envasadas al vacío tratadas con irradiación gamma, para un rango de dosis de 0 a 5,8 kGy.

4.4.2.2.3. Predicciones de la vida útil

La utilidad de los modelos aquí desarrollados se centra en la posibilidad de predecir la vida útil de un producto de calamar mínimamente procesado, cuando el mismo se preserva mediante irradiación gamma.

Con tal motivo, la vida útil fue definida como la cantidad de días en que la flora psicrotrofica alcanzara un valor de 1×10^6 UFC/g (línea punteada en la **Figura 4.4.2**), el cual es considerado como el máximo recomendado para pescado y molusco fresco (ICMSF, 1983) y coincidente con la presencia de signos de deterioro (olor pútrido, manchas rosadas) en anillas de *Illex argentinus* (**Secciones 4.1 y 4.2**).

A fin de hallar las expresiones que permitieran predecir la vida útil mediante ambos modelos, la variable tiempo (t) fue expresada como función de la dosis de irradiación en el **MCGM (Ecuación 4.4.3)** así como en el modelo polinomial (**Ecuación 4.4.4**). A su vez, log N fue reemplazado por log (1×10^6 UFC/g) y se calcularon distintos tiempos de almacenamiento para dosis de irradiación variando entre 0 y 5,8 kGy.

Las predicciones de ambos modelos junto con los resultados experimentales se muestran en la **Figura 4.4.5**, donde se graficó la predicción de la vida útil, como días a 4-5 °C, en función de la dosis de irradiación. En esta figura se pone en evidencia que ambos modelos pueden predecir la vida útil para dosis de 0, 1,8 y 3,3 kGy. Las predicciones de la vida útil calculadas utilizando el **MCGM** y el modelo polinomial presentaron un EPr de 5,0% y 6,5%, respectivamente.

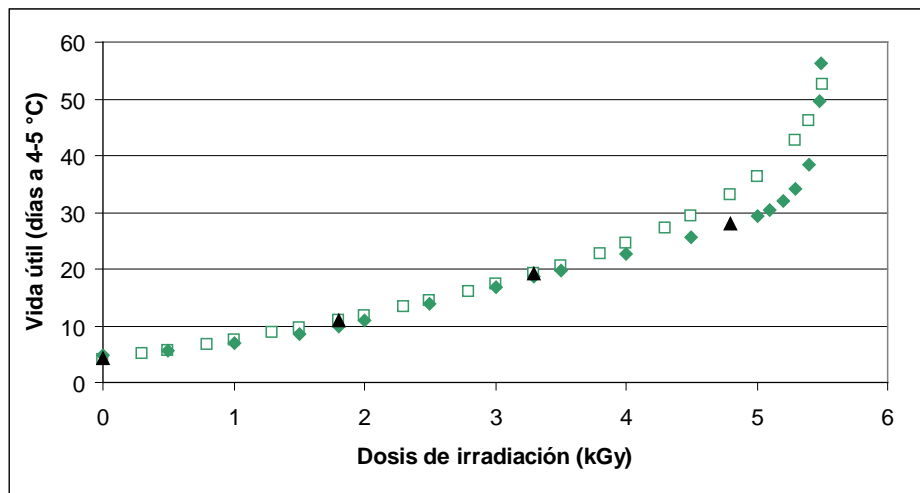


Figura 4.4.5. Predicciones de la vida útil de anillas de calamar irradiadas. Datos experimentales (▲), ajuste del modelo completo de Gompertz modificado (◆) y del modelo polinomial (□).

Dado que la curva en la **Figura 4.4.5** se vuelve asintótica al eje “y” para dosis de irradiación mayores a 5,5 kGy, los modelos propuestos no permitieron predicciones precisas de la vida útil superando dosis de 5,3 kGy.

Este hecho concuerda con los resultados experimentales, ya que la curva de crecimiento de psicrótrofos para 5,8 kGy tiende a mostrar una constancia en los recuentos hacia el final de período de almacenamiento, indicando que los mismos no alcanzarían el valor de 1×10^6 UFC/g (**Figura 4.4.2**).

Este comportamiento también fue observado para dosis de 4,8 kGy en las que las bacterias psicrótrofas no superaron el valor de 1×10^7 UFC/g durante 77 días de almacenamiento en refrigeración (**Sección 4.2**). Esto indicaría que cuando se aplican dosis de 5,8 kGy las bacterias psicrótrofas son injuriadas de tal manera que incluso si fuesen capaces de reparar el daño y crecer, la población bacteriana no sería capaz de superar el valor de 1×10^6 UFC/g.

Ambos modelos propuestos predijeron con precisión el comportamiento de la flora psicrótrofa y la vida útil de anillas de calamar envasadas al vacío tratadas con irradiación gamma. Si se tiene en cuenta la simplicidad matemática de las expresiones, podría considerarse que el modelo polinomial fuese una mejor opción. Sin embargo, el EPr del modelo polinomial para las predicciones de los recuentos microbianos (11,9%) y de la vida útil (6,5%) fue en ambos casos superior al del MCGM (4,5% y 5,0%, respectivamente). Asimismo, si se considera disponibilidad del elevado poder de cálculo

de los procesadores, la simplicidad matemática del modelo polinomial parecería perder relevancia en la actualidad.

Además, el MCGM tiene una base teórica y presentó menor error porcentual en sus predicciones, por lo tanto, se procedió con la validación del mismo.

4.4.2.2.4 Validación del modelo completo de Gompertz modificado

El **MCGM** fue validado utilizando un set de datos independientes, que fue obtenido a partir de la irradiación de anillas de calamar con una dosis diferente (4,8 kGy) a las utilizadas para ajustar el modelo (1,8, 3,3 y 5,8 kGy).

En la **Figura 4.4.6** se muestra que las predicciones de recuentos de psicrótrofos (log N) en anillas de calamar irradiadas con 4,8 kGy hechas por el **MCGM** y los valores experimentales presentaron una alta correlación ($R^2=0,980$), lo que indicaría una buena performance del **MCGM** al utilizar un set de datos independiente. Además, la vida útil (tiempo en alcanzar 1×10^6 UFC/g) que fue determinada experimentalmente en 28 días, fue estimada en 27,5 días por el modelo propuesto.

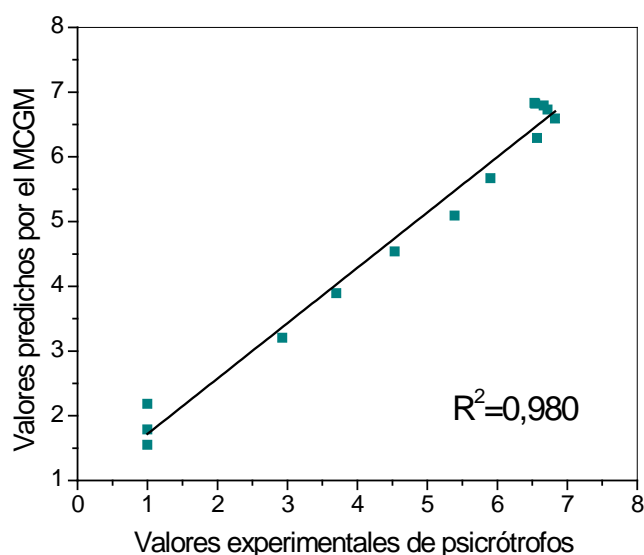


Figura 4.4.6. Correlación entre valores de bacterias psicrótrofas (log UFC/g) predichos por el MCGM y los hallados experimentalmente para anillas de calamar irradiadas con 4, 8 kGy.

Se debe mencionar que el modelo propuesto fue ajustado a partir de datos de anillas envasadas al vacío mientras que la validación del mismo se realizó con resultados de anillas envasadas en atmósfera de aire. La ausencia de oxígeno en el envase

causada por el envasado al vacío aumentaría la resistencia microbiana a la irradiación, en comparación con envases en atmósferas con oxígeno (Wills, 1985). Sin embargo, el efecto radio-protector del vacío podría haber sido contrarrestado por la menor población inicial de bacterias psicrótrofas hallada en las anillas envasadas al vacío ($2,8 \times 10^4$ UFC/g) en comparación con las envasadas en aire ($3,5 \times 10^5$ UFC/g), ya que a menor cantidad inicial de bacterias serían necesarias dosis menores para inactivar totalmente la población. El efecto inverso de estos dos fenómenos sobre la flora microbiana del producto irradiado habría sido tal que permitió al modelo predecir satisfactoriamente los recuentos de psicrótrofos en las anillas de calamar envasadas con aire.

El **MCGM** propuesto en este trabajo es útil para predecir la vida útil de anillas de calamar cuando se aplica la irradiación gamma hasta 5,3 kGy para extender la vida útil de un producto de calamar fresco.

4.4.3. Conclusiones

La inactivación de la flora psicrótrofa causada por la irradiación gamma para dosis entre 0 y 5,8 kGy, fue descrita satisfactoriamente por una cinética de primer orden, que a su vez permitió estimar el valor D_{10} para estos microorganismos.

Las curvas de crecimiento de bacterias psicrótrofas en anillas de calamar irradiadas durante almacenamiento a 4-5 °C fueron ajustadas a dos modelos empíricos: un modelo polinomial y el modelo de Gompertz modificado, reemplazando sus parámetros por ecuaciones polinómicas dependientes de la dosis.

Ambos modelos propuestos predijeron con precisión el comportamiento de la flora psicrótrofa en anillas de calamar envasadas al vacío tratadas con irradiación gamma, para un rango de dosis de 0 a 5,8 kGy. Asimismo, los dos modelos permitieron la predicción de la vida útil para dosis de hasta 5,3 kGy. Sin embargo, el error porcentual promedio relativo del modelo polinomial fue en ambos casos mayor que el del modelo completo de Gompertz.

Por lo tanto, el **MCGM** fue preferido por la mayor precisión de sus predicciones, y fue validado utilizando datos independientes de anillas de calamar irradiadas con 4,8 kGy.

En este contexto, el modelo completo de Gompertz modificado propuesto podría ser recomendado como una herramienta útil para predecir la extensión de la vida útil alcanzada por dosis de irradiación gamma de hasta 5,3 kGy en anillas de calamar envasadas al vacío, durante el almacenamiento en refrigeración.

Cabe mencionar que el uso del modelo propuesto permitiría reducir los costos y el tiempo involucrados en los estudios preliminares de irradiación de productos del calamar. Este hecho reviste gran importancia para la industria pesquera, a la hora de estimar la dosis necesaria según el objetivo específico que se persiga en el desarrollo de este tipo de productos.

MODELADO DE LA PRODUCCIÓN DE BASES NITROGENADAS VOLÁTILES DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE ANILLAS DE CALAMAR EN FUNCIÓN DE LA DOSIS DE IRRADIACIÓN.

4.5 Modelado de la producción de bases nitrogenadas volátiles durante el almacenamiento de anillas de calamar en función de la dosis de irradiación.

Como fuera mencionado en la **Sección 2.2**, el NBVT es utilizado como un indicador químico de la pérdida de frescura en productos pesqueros frescos y congelados, debido a lo simple y rápido de su determinación, que permite realizarlo en la mayoría de los laboratorios de las empresas e instituciones de control (Gökoglu et al., 2004; Huss, 1995; LeBlanc & Gill, 1984; Shakila et al., 2003; Yeannes & Casales, 2008).

Dado que las curvas experimentales de NBVT en función del tiempo de almacenamiento (4-5 °C) de anillas de calamar tratadas con distintas dosis de irradiación gamma presentaron cierto patrón sigmoideal, se planteó la posibilidad de hallar un modelo matemático que permitiera describir la generación del NBVT en esas condiciones y analizar su comportamiento en función de la intensidad de la dosis.

Para ello se decidió ajustar los datos experimentales de NBVT de anillas de calamar *Illex argentinus* irradiadas con 0; 1,8; 3,3 y 5,8 kGy (**Sección 4.3**) al modelo de crecimiento microbiano de Gompertz modificado de acuerdo a Zwietering et al., (1990).

Asimismo, se buscó describir matemáticamente la dependencia de los parámetros del modelo ajustado con la dosis de irradiación a fin de hallar una expresión para predecir la extensión de la vida útil inducida por la irradiación gamma, a través de la utilización de este índice químico.

4.5.1 Tratamiento de la materia prima y metodología utilizada

A fin de modelar la producción de NBVT en anillas de calamar durante el almacenamiento a 4-5 °C, se trabajó con los resultados de NBVT de la experiencia de irradiación detallada en la **Sección 4.3**, en la que se utilizaron anillas de calamar *Illex argentinus* sin piel, pre-tratadas con poli-fostato de sodio, envasadas al vacío y tratadas con irradiación gamma a 0; 1,8; 3,3 y 5,8 kGy.

Para ello, la producción de NBVT en anillas de calamar durante el almacenamiento a 4-5 °C fue ajustada al modelo empírico de crecimiento de Gompertz modificado (Zwietering et al., 1990), en el que fue reemplazado el logaritmo de los recuentos microbianos por el NBVT (**Capítulo 3**). También se describió la influencia de la dosis de irradiación sobre los parámetros cinéticos del modelo mediante polinomios de segundo orden para hacer un modelo completo (**MC**) que describiera el comportamiento del NBVT en función de la dosis.

La validación del modelo propuesto se llevó a cabo utilizando un set de datos independientes, de anillas irradiadas a 4,8 kGy (**Sección 4.2**).

4.5.2. Resultados y discusión

4.5.2.1. Modelado de la producción de NBVT durante el almacenamiento de anillas de calamar irradiadas mediante el modelo de Gompertz modificado.

En la **Figura 4.5.1** se muestran los resultados de la evolución de NBVT en anillas de calamar irradiadas con 0; 1,8; 3,3 y 5,8 kGy.

El valor de NBVT (valor inicial $15,2 \pm 0,2$ mg/100g) aumentó durante el almacenamiento tanto en el control como en las anillas irradiadas, pero a diferentes velocidades de producción dependiendo de la dosis de irradiación. El efecto de la dosis fue significativo ($p < 0,05$) sobre la producción de NBVT, hallándose menores valores de NBVT a mayores dosis, para un mismo tiempo de almacenamiento. Luego de un período de constancia, el NBVT fue significativamente mayor ($p < 0,05$) entre las muestras con diferente nivel de irradiación, siguiendo el siguiente orden decreciente: $0 > 1,8 > 3,3 > 5,8$ kGy, desde el día 8 hasta el final del almacenamiento.

De acuerdo a lo mencionado previamente y de la observación de la **Figura 4.5.1** se puede apreciar que los resultados experimentales de NBVT para las anillas sin irradiar y las irradiadas con 1,8 kGy presentan un patrón de comportamiento sigmoideal, lo que permitió inferir que dichas curvas podrían ajustarse a un modelo de crecimiento microbiano, como el de Gompertz modificado por Zwietering et al. (1990).

El ajuste de los 4 sets de datos experimentales (anillas irradiadas con 0; 1,8; 3,3 y 5,8 kGy) a la ecuación de Gompertz modificada está representado por las líneas continuas en la **Figura 4.5.1**.

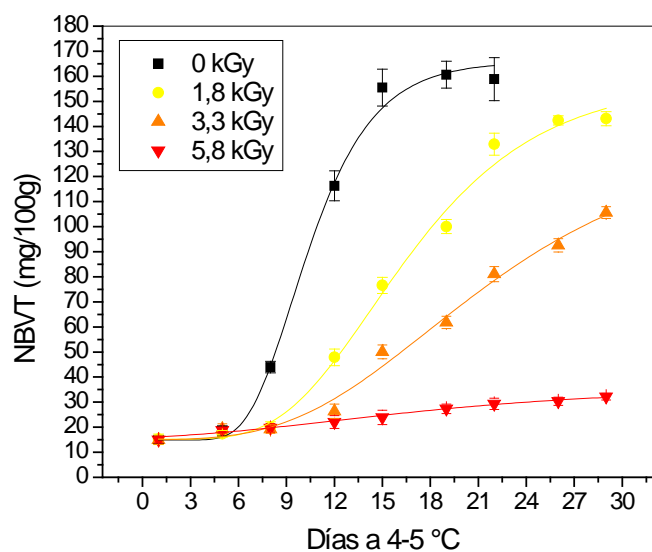


Figura 4.5.1. Evolución del NBVT ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$) durante el almacenamiento en refrigeración de anillas de calamar tratadas con irradiación gamma (media \pm error estándar, $n=3$). Las líneas continuas representan el ajuste del modelo de Gompertz modificado.

En la **Tabla 4.5.1** se muestran las estimaciones de los parámetros del modelo de Gompertz (μ , L , A), el coeficiente de determinación (R^2) del ajuste y la significancia (valor p) del modelo de Gompertz modificado ajustado a las curvas experimentales de producción de NBVT en anillas de calamar irradiadas.

Los cuatro sets de datos experimentales, es decir, los resultados de NBVT en las anillas irradiadas con 0; 1,8; 3,3 y 5,8 kGy, se modelaron correctamente con el modelo de Gompertz, como lo indican la alta significancia de los modelos ajustados ($p < 0,0001$), el bajo RMSE (<4) y el elevado R^2 (0,98 - 0,99).

Tabla 4.5.1. Parámetros del modelo de Gompertz (μ , L , A), coeficiente de determinación (R^2) y significancia (valor p) del modelo de Gompertz modificado ajustado a las curvas experimentales de producción de NBVT en anillas de calamar irradiadas.

Dosis (kGy)	μ ($\text{mg } 100\text{g}^{-1} \text{ días}^{-1}$)	L (días)	A ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$)	R^2	RMSE	Valor p
0	$20,01 \pm 1,72$	$6,58 \pm 0,18$	$150,99 \pm 3,95$	0,997	3,87	$< 0,0001$
1,8	$9,19 \pm 0,76$	$8,66 \pm 0,56$	$142,54 \pm 6,49$	0,996	3,94	$< 0,0001$
3,3	$5,04 \pm 0,36$	$9,22 \pm 0,69$	$118,02 \pm 14,73$	0,991	3,21	$< 0,0001$
5,8	$0,73 \pm 0,07$	$1,53 \pm 0,96$	$20,54 \pm 2,55$	0,983	0,64	$< 0,0001$

La velocidad de producción de NBVT (μ) disminuyó significativamente con mayores intensidades de dosis de irradiación. Dosis de 5,8; 3,3 y 1,8 kGy redujeron μ en 19, 15 y 11 unidades, respectivamente, en comparación con la velocidad observada en las anillas sin irradiar.

Asimismo, el valor de NBVT más alto alcanzado durante el almacenamiento (A) también fue menor a mayor intensidad de dosis aplicada, siendo 120 unidades menor en las anillas irradiadas con 5,8 kGy, en comparación con las anillas sin irradiar.

El parámetro L (tiempo en que no hubo cambios en el valor de NBVT) presentó una tendencia a aumentar con la mayor intensidad de dosis, salvo en las anillas irradiadas con 5,8 kGy. En ese caso, se observó una disminución de más de 4 días en L en comparación con las anillas sin irradiar. Si bien se observó producción de NBVT algunos días antes en las muestras 5,8 kGy, la velocidad de la misma fue muy baja ($0,73 \text{ mg } 100\text{g}^{-1} \text{ días}^{-1}$) en comparación con la de las anillas sin irradiar.

Con respecto al modelado del comportamiento del NBVT en productos pesqueros se ha encontrado que se utilizaron ecuaciones de primer orden durante el almacenamiento a 0, 5, 10 y 15 °C de filetes de besugo deshidratados osmóticamente (Tsironi et al., 2009), observándose una disminución de la velocidad de producción de NBVT a mayores concentraciones de maltodextrina en la solución, pero no fueron hallados otros modelos en relación al NBVT en productos pesqueros irradiados.

Los parámetros de la ecuación de Gompertz fueron ajustados a ecuaciones polinómicas de segundo orden, para hallar modelos secundarios dependientes de la dosis de irradiación.

En las **Figuras 4.5.2** se muestra dicho ajuste para los parámetros A, μ y L, cuyas expresiones polinómicas y coeficiente de determinación fueron:

$$\mu = 19,794 - 6,449d + 0,558d^2 \quad (R^2 = 0,995)$$

$$A = 150,33 + 5,449d - 4,786d^2 \quad (R^2 = 0,999)$$

$$L = 6,391 + 2,691d - 0,605d^2 \quad (R^2 = 0,981)$$

(Ecuaciones 4.5.1)

Introduciendo las **Ecuaciones 4.5.1** en la **Ecuación 3.7 (Capítulo 3, NBVT = NBVT₀ + Aexp [-exp($\mu e/A(L - t)$) + 1])**, se desarrolló el modelo completo de Gompertz (**MC**), cuya expresión está definida por la **Ecuación 4.5.2**, la cual se presenta a continuación:

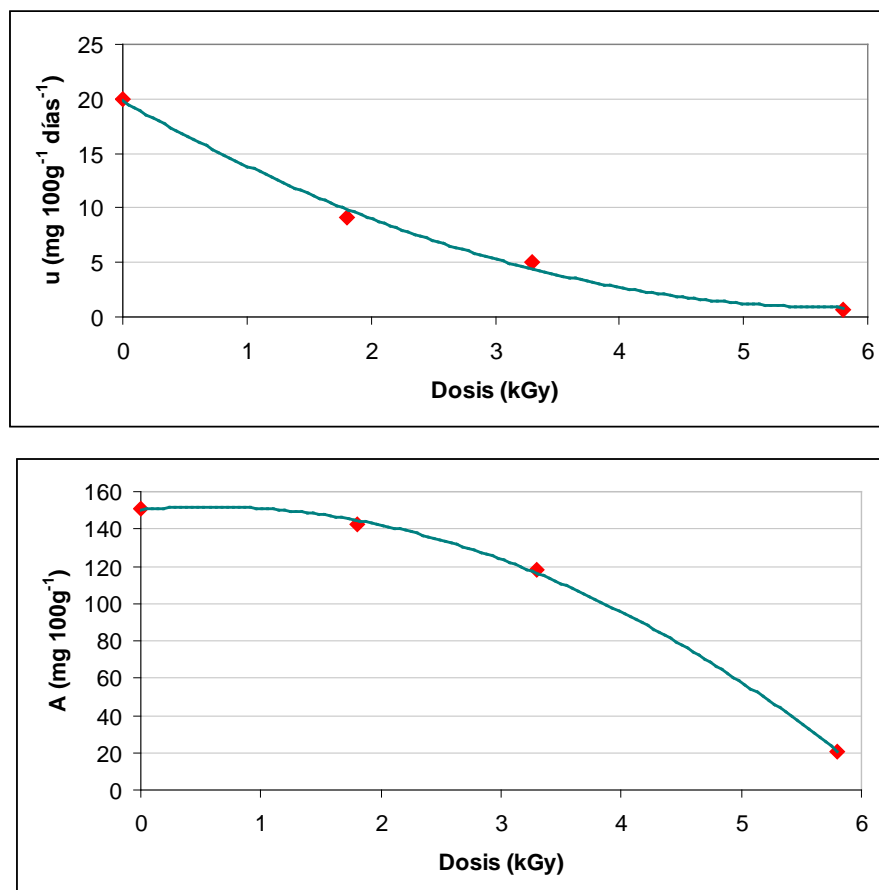
$$NBVT = NBVT_0 + (150,330 + 5,449d - 4,786d^2) \exp E \quad (\text{Ecuación 4.5.2})$$

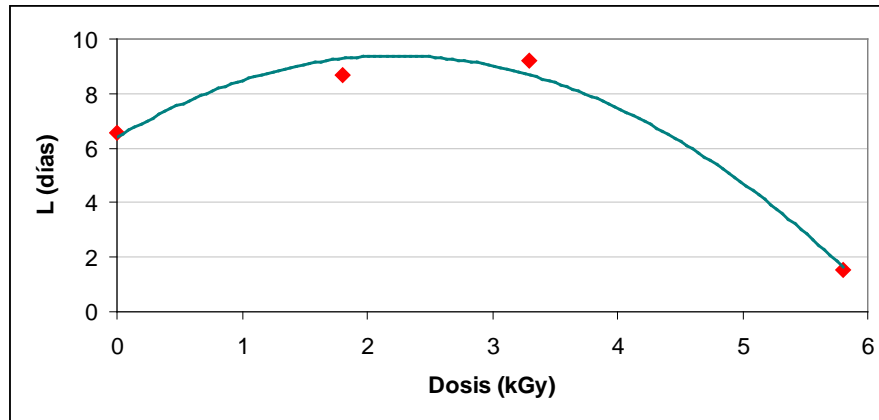
donde

$$E = \left[-\exp \left(\frac{(19,794 - 6,499d + 0,558 d^2)}{(150,330 + 5,449d - 4,786d^2)} \right) e^{(6,391 + 2,691d - 0,605d^2 - t)} + 1 \right]$$

Este modelo propuesto permitió hacer predicciones precisas, con un EPr del 6,2%, de los valores de NBVT en anillas de calamar tratadas con irradiación gamma entre 0 y 5,8 kGy.

En la **Figura 4.5.3** se presenta el gráfico de los valores experimentales y los predichos por el modelo, los cuales presentaron una alta correlación, indicada por el alto coeficiente de determinación ($R^2 = 0,993$).





Figuras 4.5.2. Ajustes polinomiales de los parámetros μ , L y A en función de la dosis de irradiación.

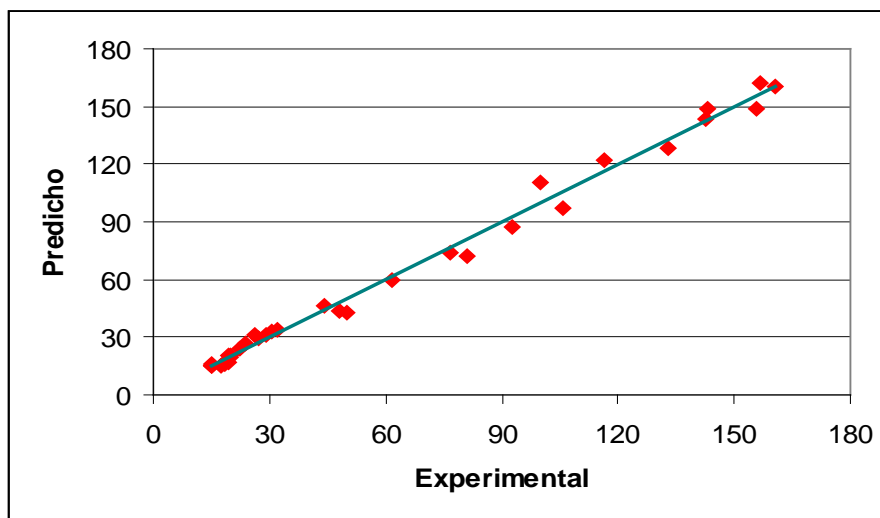


Figura 4.5.3. Correlación entre valores experimentales de NBVT y los predichos por el modelo propuesto.

4.5.2.2. Validación del modelo completo

A fin de validar el modelo propuesto, se utilizaron datos independientes de una experiencia diferente en la que anillas de calamar fueron irradiadas con 4,8 kGy y analizadas durante el almacenamiento en refrigeración los días 0, 1, 5, 8, 13, 16, 19, 22, 26, 33, 40, 47, 54, 62, 68 y 77 (**Sección 4.2**).

Se utilizó el modelo completo propuesto para estimar los valores del NBVT durante el almacenamiento de las anillas irradiadas con 4,8 kGy, hallándose que el mismo estimó los valores de NBVT con un 6,7% de EPr. Asimismo, se pudo comprobar una alta correlación entre los valores predichos y experimentales (**Figura 4.5.4**, $R^2 =$

0,928), lo que indicaría la utilidad del modelo propuesto para predecir con precisión el comportamiento del NBVT en anillas de calamar irradiadas, durante el almacenamiento en refrigeración.

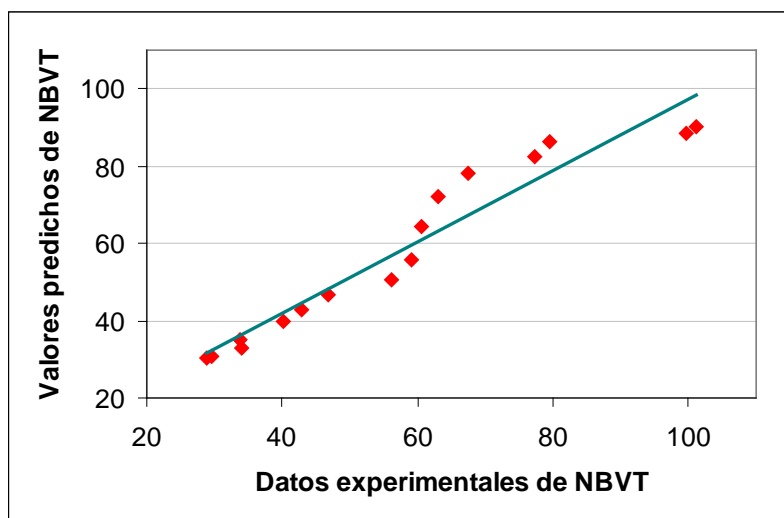


Figura 4.5.4. Correlación entre valores de NBVT predichos por el MC y los hallados experimentalmente para anillas de calamar irradiadas con 4,8 kGy.

Estos resultados indican que el modelo propuesto permite estimar el comportamiento de un indicador químico del deterioro, como el NBVT, cuando se aplica irradiación gamma en anillas de calamar con el propósito de extender el tiempo de comercialización.

4.5.3. Conclusiones

Fue factible hallar un modelo para describir la producción de NBVT durante el almacenamiento en refrigeración de anillas de calamar tratadas con irradiación gamma, mediante una ecuación utilizada para crecimiento microbiano, cuyos parámetros fueron modelados en función de la dosis de irradiación utilizando polinomios de segundo orden. De esta manera se desarrolló un modelo completo que permitió estimar con un 6,2 % de error relativo promedio porcentual el valor de NBVT durante el almacenamiento en anillas de calamar irradiadas con dosis de irradiación gamma entre 0 y 5,8 kGy.

Se pudo observar una fuerte dependencia de velocidad de producción de NBVT con la dosis de irradiación. A mayor intensidad de dosis, más significativa fue la disminución de la velocidad de producción de NBVT

Asimismo, se llevó a cabo satisfactoriamente la validación del modelo completo utilizando los resultados de una experiencia independiente en la que se aplicaron 4,8 kGy de irradiación gamma en anillas de calamar *Illex argentinus*.

El modelo desarrollado es útil para predecir el efecto de distintas dosis de irradiación gamma en anillas de calamar sobre un parámetro de frescura relacionado con el tiempo de comercialización (NBVT) mediante una determinación química cuya técnica resulta simple y rápida.

4.6 Conclusiones generales del Capítulo 4

Sobre la base de los resultados de las experiencias anteriores se puede concluir que:

- ▲ La irradiación gamma inactivó microorganismos deteriorantes y retardó reacciones de deterioro sin modificar las características de color y la aceptabilidad sensorial de anillas de calamar *Illex argentinus*, con dosis de hasta 8,4 kGy.
- ▲ Las anillas irradiadas fueron muy bien aceptadas entre los panelistas, y su aceptabilidad con una dosis de 8,4 kGy se mantuvo constante hasta 68 días en refrigeración, 10 veces más que el control.
- ▲ Fue posible, dentro del rango de dosis estudiado, determinar una dosis mínima (4 kGy) de irradiación que permite mejorar la calidad microbiológica y extender el tiempo de almacenamiento de anillas de calamar *Illex argentinus*, sin afectar sus características sensoriales.
- ▲ Se comprobó la factibilidad práctica de aplicar a anillas de calamar una dosis de 4 kGy, teniendo en cuenta la disposición del CAA, que permite una uniformidad de dosis sea tal que la dosis máxima sea menor o igual al doble de la mínima, logrando obtener un producto sensorialmente aceptable con dosis de hasta 8,4 kGy.
- ▲ De esta manera, es factible mediante la aplicación de la irradiación gamma a 4 kGy, obtener un producto fresco de calamar, con una muy buena aceptabilidad sensorial y un tiempo de almacenamiento que supera en al menos 5 veces el del producto que existe en la actualidad.
- ▲ También fue factible extender el tiempo de comercialización de anillas de calamar tratadas con poli-fosfatos y envasadas al vacío, tal como son procesadas industrialmente, observándose una mejora de los parámetros de color durante el almacenamiento, así como un efecto protector del envasado al vacío sobre la inactivación microbiana.
- ▲ Las diferentes experiencias de irradiación realizadas con anillas de calamar permitieron demostrar que la irradiación gamma es efectiva para extender el tiempo de almacenamiento de anillas de calamar frescas, con o sin tratamiento

previo con soluciones comerciales de poli-fosfato de sodio, sin que disminuya su aceptabilidad sensorial.

- ⤴ Estos resultados son de suma relevancia para la industria pesquera argentina, y de Mar del Plata (por su cercanía al CNEA), ya que le otorga la posibilidad de aplicar una tecnología de preservación que quintuplica el tiempo de comercialización de este tipo de productos, lo que le permite abarcar nuevos mercados.
- ⤴ Se modeló la inactivación microbiana causada por la irradiación y se obtuvo un modelo matemático del comportamiento microbiano en función de la dosis de irradiación durante el almacenamiento refrigerado de las anillas de calamar. Este modelo permitió predecir la vida útil microbiológica de las anillas de calamar cuando son tratadas con dosis hasta 5,3 kGy, con un error relativo porcentual menor al 6%.
- ⤴ Se logró modelar la producción de bases nitrogenadas volátiles (índice químico del deterioro) en función de la dosis de irradiación, durante el almacenamiento de las anillas.
- ⤴ A su vez, los resultados de esta tesis se consideran un importante aporte para el conocimiento de la tecnología de irradiación, que si bien se está estudiando hace más de 6 décadas y actualmente es aplicada en más de 57 países, su aplicación a nivel industrial continúa siendo incipiente, debido entre otras cosas, al temor que genera la palabra irradiación, como a la falta de armonización en las legislaciones.

CAPÍTULO 5

**Marinados de anchoíta
tratados con irradiación
gamma.**

**Aspectos microbiológicos,
fisicoquímicos y sensoriales.**

En este Capítulo se describen las experiencias de irradiación llevadas a cabo con filetes marinados de anchoíta (*Engraulis anchoita*) envasados al vacío y almacenados a 4-5 °C. En las mismas se utilizaron marinados elaborados con soluciones acuosas con diferentes concentraciones de ácido acético (7% y 3% p/v).

Las dosis de irradiación utilizadas fueron seleccionadas en base a investigaciones previas de otros autores sobre la irradiación de productos pesqueros. Se han hallado resultados que indican que dosis aplicando dosis de hasta 7 kGy se han logrado extensiones importantes de la vida comercial de estos productos (Arvanitoyannis et al, 2010; Foley, 2006; IAEA, 2000; Lescano et al., 1990).

Además, se consideró que las otras barreras utilizadas para preservar el producto (marinación, envasado al vacío y refrigeración) permitirían la aplicación de dosis bajas de irradiación para extender la vida útil del producto.

Actualmente en el país, el ente regulador SENASA establece una vida útil de 6 meses en refrigeración para los marinados de anchoíta. Dado que este es un producto relativamente nuevo en la industria nacional, no existe una gran experiencia sobre el mismo, ni amplios antecedentes que permitan fijar un límite científico. Este tiempo ha sido determinado generalizando los resultados definidos por las mismas empresas, algunos trabajos de investigación y teniendo en cuenta la experiencia española. Sin embargo, no se ha considerado que cada empresa elabora los mismos de acuerdo a su propio proceso, lo que suele involucrar el uso de distintas concentraciones de ácido y sal en la solución de marinación, con las consecuentes diferencias en la intensidad del efecto preservativo. La base fundamental para el tiempo de vida útil definido ha sido la inocuidad del producto, la que se encuentra cubierta con los procesos normalmente utilizados y el tiempo mencionado. Lo que no ha sido adecuadamente considerado es la calidad y aceptabilidad del producto y las modificaciones de estas características durante el almacenamiento cuando sufren modificaciones las variables de proceso.

IRRADIACIÓN DE MARINADOS DE ANCHOÍTA ELABORADOS EN SOLUCIÓN DE MARINACIÓN CON 7 % DE ÁCIDO ACÉTICO

5.1 Irradiación de marinados de anchoíta elaborados con 7 % de ácido acético

Se analizó el efecto de la irradiación gamma a 0, 1,8 y 3,3 kGy sobre parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y el color de marinados de filetes de anchoíta (*E. anchoíta*) envasados al vacío durante 20 meses de almacenamiento en refrigeración, a fin de determinar el efecto de la misma sobre el tiempo de comercialización de este producto.

Los marinados fueron elaborados con una solución acuosa de marinación que contenía un 7% de ácido acético (**M7**), a los cuales se les determinó la acidez, el pH, la actividad de agua (a_w), el NBVT, la cuantificación y oxidación de lípidos, el perfil de ácidos grasos y el color. Asimismo, se cuantificaron bacterias psicrótrofas y mesófilas totales, coliformes totales, *Staphylococcus* spp., CSR y mohos y levaduras.

5.1.1 Tratamiento de la materia prima y metodología utilizada

Ejemplares de *Engraulis anchoíta* capturados en el mes de julio, de $14,0 \pm 1,1$ cm de longitud y $19,4 \pm 2,3$ g de peso, fueron congelados y almacenados a -18 °C durante 4 meses. Luego fueron descongelados, lavados, descabezados, eviscerados, se les efectuó el corte de la cola y se obtuvieron 2 filetes de cada uno. Todas estas operaciones fueron llevadas a cabo en una planta de procesamiento (Mar del Plata), como se indica en el diagrama de flujo del **Capítulo 3**. Esta planta elabora este producto en las condiciones mencionadas, para mercado interno y para exportación.



Imagen 5.1.1. Filetes de anchoíta obtenidos en una empresa marplatense previo a la etapa de marinación.

Allí, los filetes se marinaron con una solución acuosa que contenía ácido acético (7% p/v), NaCl (10% p/v) y ácido cítrico (0,2% p/v) en una relación filete:solución 1:1, durante 2 días a 16 °C seguidos por 3 días a 5 °C.

Posteriormente los filetes fueron retirados del baño de marinación y acondicionados mediante paños de liencillo formando packs para permitir su centrifugación, la que se realizó en un equipo industrial, durante 1 minuto a 2800 rpm.

Las muestras fueron transportadas (mantenidas a 4-5 °C) al laboratorio, donde más de 100 muestras de 140 ± 2 g de filetes (aproximadamente 28 filetes) se envasaron al vacío en una máquina Minimax 430M (Servivac, Argentina) en bolsas de PEBD/PA selladas con calor (Cryovac®, espesor = 125 μ m, velocidad de transferencia de oxígeno = 35 cc/m²/24h; velocidad de transferencia de vapor de agua = 9 g/ m²/24h).



Imagen 5.1.2. Filetes de anchoíta marinados con una solución con 7% de ácido acético, envasados al vacío.

Posteriormente éstas fueron transportadas (mantenidas a 4 ± 1 °C) al Centro Atómico Ezeiza donde se irradiaron con 1,8 y 3,3 kGy (dosis mínimas absorbidas) con una uniformidad de dosis $D_{max}/D_{min} = 1,15$, de acuerdo a lo descrito en el **Capítulo 3**. Se utilizaron dosímetros Amber Perspex.

Las muestras irradiadas y las no irradiadas (control, 0 kGy) fueron almacenadas a 4-5 °C durante 20 meses y analizadas previo a la irradiación y en los días 1, 90, 175, 425 y 602 posteriores a la misma. Se contó con 6 muestras para cada dosis y cada fecha de análisis a fin de realizar el experimento por duplicado.

Los resultados se analizaron mediante ANOVA de dos factores: dosis (0, 1,8 y 3,3 kGy) y tiempo de almacenamiento (00 -previo a la irradiación-, 15 días y 3, 6, 14 y 20 meses) (**Capítulo 3**).

5.1.2 Resultados y discusión

5.1.2.1. Actividad de agua (a_w), acidez (% de ácido acético) y pH

La a_w de los filetes de anchoita marinados antes de ser aplicada la irradiación fue $0,967 \pm 0,04$. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por Cabrer et al. (2002) en filetes marinados de *E. anchoita*. La menor actividad de agua en comparación con la de la anchoíta sin marinar ($0,989 \pm 0,03$) se explica por la sal agregada (NaCl) que tiende a difundir dentro del músculo en un flujo inverso al del agua hasta alcanzar la concentración de equilibrio, provocando el descenso en la a_w (Cabrer et al., 2002; Capaccioni et al., 2011; Meyer, 1965).

La aplicación de 1,8 y 3,3 kGy no tuvo un efecto significativo ($p>0,05$) sobre la a_w de los marinados. Resultados similares fueron hallados en calamar salado fermentado tratado con irradiación gamma (Byun et al., 2000) y en músculo de *Cololabis saira* semi-seco, en el que la a_w se mantuvo en 0,94 luego de la irradiación con 5 y 7 kGy (Woon Lee et al., 2002).

Antes del tratamiento de irradiación, la acidez de los filetes marinados fue $2,52 \pm 0,08$ g de ácido acético/100g de filete. Valores similares fueron hallados en diversos productos pesqueros marinados como *Sardina pilchardus*, elaborada con 7% de ácido acético (Kilinc & Cakli, 2004). Este aumento de la acidez en comparación con la anchoita sin marinar (0 g ácido acético/100g) se explica por el fenómeno de difusión del ácido acético hacia el interior del músculo de pescado hasta alcanzar el equilibrio, similar al comportamiento del NaCl (Cabrer et al., 2002; Cappaccioni et al., 2011; Meyer, 1965). Luego de la irradiación, la acidez fue $2,65 \pm 0,07$ g de ácido acético/100g, indicando que no tuvo efecto significativo ($p>0,05$) sobre ésta.

El valor promedio inicial de pH de los marinados sin irradiar y los irradiados con 1,8 y 3,3 kGy fue de $3,97 \pm 0,03$, no observándose un efecto significativo ($p>0,05$) de la irradiación gamma sobre el mismo. En la anchoíta fresca sin marinar se determinó un pH de 6,41, similar a los valores hallados por Cabrer et al. (2002) y Capaccioni et al. (2011). La disminución del pH en comparación con el del filete sin marinar se explica por el aumento de la acidez debido a la difusión del ácido acético hacia el interior del músculo. El pH de todos los marinados irradiados y sin irradiar se mantuvo sin modificaciones significativas durante 20 meses de almacenamiento en refrigeración. Los resultados

hallados en los marinados sin irradiar (control) coinciden con lo observado por Gökoglu et al. (2004) quienes no encontraron cambios significativos en el pH de marinados de sardina durante 5 meses de almacenamiento en refrigeración.

5.1.2.2 Aspectos microbiológicos

El recuento inicial de bacterias mesófilas y psicrótrofas en las anchoítas enteras descongeladas previo a la marinación fue $7,5 \times 10^3$ y $5,0 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente. Valores similares han sido observados por Fuselli et al. (1994) en *Engraulis anchoita* congelada y por Günsen et al. (2011) en *Engraulis encrasicolus*. No se detectó la presencia de *Staphylococcus aureus* ni clostridios sulfito-reductores.

Luego del procesamiento de las muestras (ver diagrama de flujo de la **Sección 3.1.2**), en los filetes marinados la población de bacterias aerobias mesófilas se redujo a $3,8 \times 10^2$ UFC/g y no se detectaron bacterias psicrótrofas (<10 UFC/g). Esto fue debido a los principios preservativos de la marinación, como fuera observado por diversos autores en productos pesqueros marinados (Fuselli et al., 1994; Kilinc & Cakli, 2004; Sallam et al., 2007). En particular, Günsen et al. (2011) observaron un efecto similar al de este trabajo en *E. encrasicolus*, donde los recuentos iniciales de bacterias aerobias mesófilas (48×10^3 UFC/g) y bacterias psicrótrofas (19×10^2 UFC/g) fueron reducidos a 57×10^2 UFC/g y <10 UFC/g, respectivamente, como resultado de la marinación. El ácido acético es un ácido débil que, de acuerdo a su concentración, puede provocar la disminución del pH por debajo del rango de crecimiento de distintos grupos bacterianos (Jay, 2000; Lück, 1990). La proporción de ácido no disociado aumenta al disminuir el pH, por lo que se vuelve más activo cuanto menor es el valor del pH pudiendo atravesar la membrana celular de los microorganismos, donde acidifica el citoplasma y provoca la desnaturalización de las proteínas (Baird-Parker, 1980; Lück, 1990). Considerando este comportamiento y teniendo en cuenta las características sensoriales agradables que le confiere al producto final, es que este ácido es utilizado casi con exclusividad en la marinación de *Engraulis anchoita* (Yeannes, 2006). La mayoría de los productos pesqueros comercializados, son elaborados en base a vinagre o ácido acético (Borgstrom, 1968; Yeannes & Casales, 1995).

La sal (NaCl) inhibe el crecimiento microbiano al restringir la cantidad de agua disponible por efecto de la disminución de la actividad de agua (Kilinc & Cakli, 2004; Sallam et al., 2007). Por lo que el principio de conservación de los marinados estaría dado por la acción combinada de la disminución del a_w (utilización de ClNa), la

disminución del pH y el efecto de la parte no dissociada de los ácidos orgánicos (Yeannes, 2006).

La evolución de las bacterias mesófilas durante el almacenamiento de filetes marinados de anchoíta envasados al vacío e irradiados se muestra en la **Figura 5.1.1**.

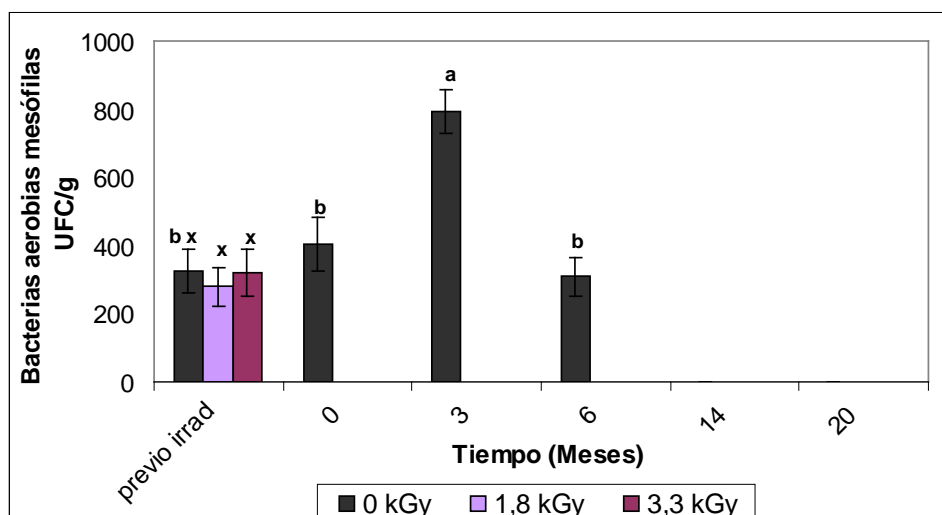


Figura 5.1.1. Evolución del recuento de bacterias mesófilas en marinados de anchoíta envasados al vacío e irradiados, durante el almacenamiento a 4-5 °C (media \pm error estándar, n=2). Letras iguales (x) indican diferencias no significativas debido a la dosis. Letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas en el BAM debido al tiempo ($p < 0,05$).

El recuento inicial de bacterias aerobias mesófilas (BAM) de los filetes marinados de anchoíta fue $3,8 \times 10^2$ UFC/g. Este valor es similar al observado por Fuselli et al. (1994) en anchoíta (*E. anchoíta*) marinada. La irradiación gamma a 1,8 y 3,3 kGy redujo significativamente ($p < 0,05$) este valor por debajo del límite de detección (< 10 UFC/g).

En los marinados sin irradiar el recuento de BAM aumentó significativamente ($p < 0,05$) durante el almacenamiento a 4-5 °C, alcanzando un valor de $7,95 \times 10^2$ UFC/g, a los 3 meses. De acuerdo a Fuselli et al. (1998), esto correspondería a la flora típica del producto marinado. La población bacteriana que no fue completamente inactivada por la marinación podría desarrollarse durante el almacenamiento de acuerdo con su capacidad de adaptación al medio ácido (Fuselli et al., 1998). Este comportamiento también fue mencionado por Kilinc & Cakli (2005) quienes en sardina marinada elaborada con 7% de ácido acético y almacenada a 4 °C reportaron valores de 23×10^5 y 45×10^4 UFC/g de bacterias mesófilas y psicrótrofas, respectivamente.

Para productos pesqueros preservados con vinagre se recomienda un valor máximo aceptable de recuento total de bacterias de 10^3 UFC/g (Moragas Encuentra & De Pablo Busto, 2008), valor que no fue alcanzado en ninguna de las muestras (irradiadas o sin irradiar), durante 20 meses en refrigeración.

En el presente trabajo, en las muestras control (sin irradiar) las BAM mostraron una tendencia a decrecer a partir de los 6 meses y no fueron detectadas posteriormente (20 meses en refrigeración). Esto se explicaría por el efecto de las distintas barreras utilizadas para preservar el producto, como la adición de sal y de ácido orgánico, el envasado al vacío y la refrigeración, sobre la homeostasis de los microorganismos. De acuerdo con Leistner (2000), los microorganismos utilizan su energía para reparar los mecanismos a fin que su homeostasis se sobreponga al ambiente hostil, pudiendo usar completamente su energía hasta quedar exhaustos y morir.

El desarrollo de BAM fue inhibido en las muestras tratadas con irradiación gamma (1,8 y 3,3 kGy) durante 20 meses de almacenamiento a 4-5 °C, sin que se observaran diferencias entre las dosis aplicadas. El recuento de este grupo en los marinados control fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que el de las muestras irradiadas inmediatamente luego de aplicada la irradiación y durante 6 meses de almacenamiento (4-5 °C).

Estos resultados muestran que la aplicación de 1,8 kGy de irradiación gamma fue suficiente para inhibir el desarrollo de la flora mesófila durante 20 meses de almacenamiento en refrigeración, mejorando la calidad microbiológica de los marinados de anchoíta envasados al vacío.

No se detectaron (< 10 UFC/g) bacterias psicrótrofas, ni hongos y levaduras, clostridios sulfito-reductores, coliformes totales ni fecales, ni *Staphylococcus* spp. en los marinados irradiados o sin irradiar, envasados al vacío, durante 20 meses de almacenamiento en refrigeración.

Si bien no se han encontrado antecedentes de experiencias de irradiación realizadas a productos pesqueros marinados, los resultados obtenidos en esta tesis son coincidentes con los comportamientos obtenidos en trabajos realizados en otros productos pesqueros irradiados que fueron mencionados con anterioridad (**Capítulo 4**). Por ejemplo, Chouliara et al. (2004) hallaron reducciones de más de 3 ciclos logarítmicos en *Sparus aurata* salado e irradiado con 3 kGy. A su vez, Narvaiz et al. (1989) observaron que 3,3 kGy de irradiación gamma permitieron extender la vida comercial de filetes de merluza *Merluccius hubbsi* al reducir las poblaciones de bacterias psicrótrofas y mesófilas.

De estos resultados se desprende que los bajos recuentos de bacterias mesófilas hallados en los marinados y la ausencia de bacterias psicrótrofas y de mohos y levaduras

muestran una importante estabilidad del producto sin irradiar que sería consecuencia de la acción preservativa de la marinación con 7% p/v de ácido acético. La marinación en solución de ácido acético provocó descenso del pH del músculo a un valor de $3,97\pm 0,03$, valor que afecta e inhibe el desarrollo de diversos grupos microbianos. Efectos similares fueron descritos por Kilinc & Cakli (2004), quienes determinaron que los recuentos de microorganismos viables totales, las bacterias psicrótrofas y hongos y levaduras fueron inhibidos en sardinas crudas por el tratamiento con una solución de marinación con 7% de ácido acético y 14% de NaCl. Asimismo, Fuselli et al. (1994) encontraron que la marinación de *E. anchoita* congelada inhibió el crecimiento de bacterias mesófilas y psicrótrofas en estos productos.

Además, el envasado al vacío pudo colaborar con el efecto preservativo de la marinación. Dado que el envasado al vacío implica la eliminación del aire (y del oxígeno que éste contiene) de la atmósfera del alimento, esta reducción del oxígeno circundante disminuye la velocidad de desarrollo microbiano y las reacciones de oxidación de lípidos, favoreciendo el incremento de la vida útil (Parry, 1993; Phillips, 1996). El envasado al vacío ha probado ser efectivo para extender la vida útil de diversos productos pesqueros como sardina (*Sardina pilchardus*) (Özogul et al., 2004) y caballa (*Scomber colias japonicus*) (Stamatis & Arkoudelos, 2007). Asimismo, Mbarki et al. (2009) observaron una extensión de la vida útil de caballa (*Scomber japonicus*) causada por el efecto combinado del envasado al vacío y la irradiación gamma.

Además de la estabilidad de producto sin irradiar, se observó que la dosis 1,8 kGy de irradiación gamma inactivó la flora mesófila de los marinados, inhibiendo su desarrollo durante 20 meses en refrigeración.

5.1.2.3. Nitrógeno básico volátil total (NBVT)

La evolución del NBVT en los filetes marinados durante el almacenamiento en refrigeración se muestra en la **Figura 5.1.2**.

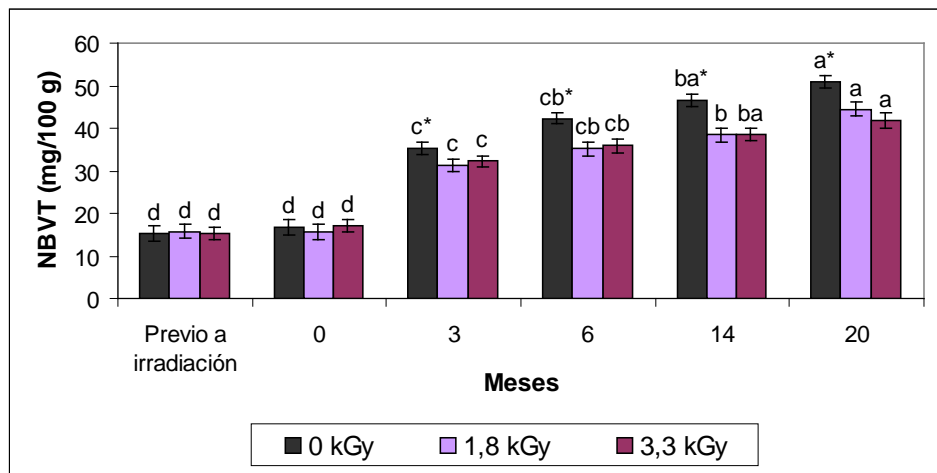


Figura 5.1.2. Evolución de NBVT en los marinados de anchoíta durante almacenamiento a 4-5 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas debido al tiempo de almacenamiento. * indica valores de NBVT superiores debido al efecto de la dosis de irradiación (media ± error estándar, n=2, p<0,05).

Antes de la irradiación, el NBVT inicial promedio fue $15,4 \pm 0,3$ mg/100 g de marinados procesados (base húmeda). Este valor no fue modificado ($p > 0,05$) por la aplicación de la irradiación gamma a 1,8 y 3,3 kGy, como se observara también en las anillas de calamar (**Capítulo 4**).

En los marinados sin irradiar se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el NBVT, el cual alcanzó valor de $50,9 \pm 1,6$ mg/100g a los 20 meses en refrigeración. Resultados similares relacionados con el aumento de NBVT en pescado marinado han sido observados por Gökoglu et al. (2004), Sallam et al. (2007) y Günsen et al. (2011) con diferencias en los valores iniciales de NBVT, lo que se atribuiría a las variaciones de las materias primas y de las variables de proceso de la marinación. A este respecto, Günsen et al., (2011) observaron en marinados de *E. encrasicholus* envasados al vacío que el NBVT alcanzó un valor de $15,78 \pm 0,02$ mg/100 g luego de 7 meses en refrigeración, mientras que el NBVT de besugo salado y envasado al vacío aumentó de 25,3 hasta 60,5 mg/100 g en 42 días de almacenamiento refrigerado (Chouliara et al., 2004).

Luego del tratamiento de irradiación, en los marinados irradiados con 1,8 y 3,3 kGy también se observó un aumento del NBVT durante el almacenamiento hasta $44,5 \pm 1,7$ y $41,8 \pm 1,7$ mg/100g, respectivamente. Sin embargo, la producción de NBVT fue superior en los marinados sin irradiar, siendo significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación con las muestras irradiadas, desde los 3 meses de almacenamiento hasta el final del período de análisis.

Este comportamiento es similar al descrito para las anillas de calamar en el **Capítulo 4**. El hecho se explicaría en parte por el mayor recuento de bacterias de las muestras sin irradiar en comparación con las irradiadas, ya que una de las causas del aumento del NBVT es la producción de trimetilamina por la actividad microbiana. La reducción bacteriana inducida por la irradiación habría desacelerado la producción de NBVT. El incremento de NBVT en los marinados irradiados (así como en el control) sería generado por reacciones enzimáticas durante el almacenamiento en refrigeración, considerando que el efecto de la irradiación sobre la actividad enzimática no suele ser considerable (Hwang & Hau, 1995; Milons, 2001; Urbain, 1986).

De acuerdo con estos resultados y con los hallados en anillas de calamar (**Capítulo 4**), otros autores observaron una menor producción de NBVT en productos pesqueros tratados con irradiación en comparación con las muestras no irradiadas, relacionada con una reducción microbiana inducida por la irradiación (Lakshmanan et al., 1999; Jeevanandam et al., 2001; Mbarki et al., 2009).

Se han establecido valores críticos de NBVT como límites de aceptabilidad en pescado, entre 25 y 35 mg/100 g (CE, 1995; Huss, 1995), sin embargo, podrían existir variaciones en este límite de acuerdo a las especies y también debido al procesamiento. Si se considerara en este caso el valor de 35 mg/100 g como valor máximo aceptable, se podría decir que la irradiación permitió extender el tiempo en que los marinados alcanzan dicho valor en aproximadamente 3 meses. Sin embargo, los valores de recuentos microbianos no alcanzaron el valor máximo recomendado durante 20 meses en refrigeración, por lo que sería posible que el valor de 35 mg/100 g no fuera representativo del valor de NBVT máximo aceptable para este tipo de producto.

Resulta de importancia mencionar que en realidad el límite de NBVT que figura en el CAA, Decreto 4238 (Ley Federal de Carnes), CODEX y demás Reglamentaciones fundamentalmente se refieren a los productos frescos y congelados de las distintas especies de teleosteos. Esto hace que para otro tipo de productos y especie estos límites sean meramente orientativos y deben ser utilizados muy criteriosamente. Hay experiencia en nuestro país, con productos como aquellos salados, ahumados, en conserva, que por razones de proceso generan un nivel mayor de bases nitrogenadas volátiles y no se encuentran comprendidos dentro de este límite (Yeannes et al., 1983). El caso de los marinados, sería otro producto que requiere de un número substancial de investigaciones previo a determinar un límite adecuado o aceptar el límite general. Los resultados provenientes de este trabajo de tesis efectúan un aporte al conocimiento en esta temática.

De los resultados hallados se desprende que la irradiación gamma permitió disminuir la producción de NBVT en los marinados envasados al vacío y refrigerados, sin que se observaran diferencias entre las muestras irradiadas con 1,8 y 3,3 kGy.

5.1.2.4. Contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos

Las determinaciones del contenido y la calidad de los lípidos de las especies pesqueras revisten importancia al momento de estimar a priori la susceptibilidad a la oxidación de los mismos y la extensión de los cambios que ésta podría producir en los mismos.

El contenido de lípidos en los marinados fue $6,32 \pm 0,81$ g/100 g de muestra procesada (base húmeda), valor que se encuentra entre los límites normales hallados para la especie en la estación del año (Moreno et al., 1976; Yeannes & Casales, 1995).

En la **Tabla 5.1.1** se presentan los resultados del perfil de ácidos grasos que se realizó a fin de caracterizar el producto a ser irradiado.

Se observa que del total de los lípidos, el 33,25% fueron ácidos grasos (AG) saturados. Los ácidos grasos monoinsaturados constituyeron el 39,69% y los AG poliinsaturados (AGPI) representaron el 26,39% del total de AG.

Como puede observarse en la tabla, el contenido de ácidos grasos de la serie n-3 y n-6 fue 25,07% y 1,32% de los AG totales, respectivamente. Entre los AG n-3, se encontraron mayoritariamente ácidos docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3) y eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3), alcanzando el contenido de ambos un porcentaje de 21,36%. Los resultados presentados están en relación con los hallados por otros autores en la misma especie pesquera fresca (Massa et al., 2012).

Tabla 5.1.1. Perfil de ácidos grasos de marinados de anchoíta. Los valores totales incluyen trazas de otros ácidos grasos que no fueron incluidos en esta tabla (media \pm error estándar, n=2).

Ácido graso (AG)	g / 100 g lípidos
C14:0 Ácido Mirístico	7,61 \pm 0,86
C16:0 Ácido Palmítico	21,57 \pm 0,13
C17:0 Ácido Margárico	1,91 \pm 0,09
C18:0 Ácido Esteárico	1,66 \pm 0,07
Total AG Saturados	33,25 \pm 0,86 *
C16:1 Ácido Palmitoleico	12,27 \pm 0,69
C18:1 n9 Ácido Oleico	13,87 \pm 0,13
C20:1 n9 Ácido Eicosenoico	3,93 \pm 0,38
C22:1 n11 Ácido Cetoleico	8,44 \pm 0,21
Total AG monoinsaturados	39,69 \pm 0,13*
C18:2 n6 Ácido Linoleico	1,24 \pm 0,09
C18:3 n3 Ácido Linolénico	0,64 \pm 0,06
C18:4 n3 Ácido Decaotatetraenoico	1,97 \pm 0,13
C20:5 n3 Ácido Eicosapentaenoico	6,86 \pm 0,23
C22:6 n3 Ácido Docosahexaenoico	14,5 \pm 0,80
Total AG poliinsaturados	26,39 \pm 0,92*
AG omega 3	25,07 \pm 0,83
AG omega 6	1,32 \pm 0,08
EPA + DHA	21,36

Como puede observarse, los marinados presentan lípidos de un importante valor nutricional al tener un alto porcentaje de AGPI, con considerables cantidades de ácidos grasos esenciales de la serie n-3. Entre ellos, el DHA y el EPA son reconocidos por aportar diversos beneficios para la salud humana, como colaborar con la prevención de distintas patologías tales como enfermedades cardiovasculares, el mal de Alzheimer, el cáncer. Además, intervienen en la formación del sistema visual y el DHA en especial constituye más del 26% del total de ácidos grasos de la retina y el cerebro (Carrero et al., 2005; Sidhu, 2003).

Por otra parte, el alto contenido de AGPI hace también que los lípidos de la *Engraulis anchoita* sean más susceptibles a la oxidación.

5.1.2.5- Oxidación de lípidos. TBARS

En las **Figuras 5.1.3** se muestra la evolución de TBARS₅₃₂ y TBARS₄₅₅ en los marinados de anchoita almacenados a 4-5 °C.

Los valores medios de TBARS₅₃₂ y TBARS₄₅₅ de todas las muestras de marinados previo a la irradiación fueron $1,4 \pm 0,1$ mg MDA/kg y $2,0 \pm 0,1$ mg ALs/kg, respectivamente.

No se apreciaron cambios significativos ($p > 0,05$) en TBARS₅₃₂ y TBARS₄₅₅ debido a la irradiación gamma, inmediatamente luego de su aplicación. Ambos permanecieron sin cambios durante 3 meses de almacenamiento refrigerado. Luego de este período, TBARS₅₃₂ aumentó significativamente ($p < 0,05$) en todas las muestras (irradiadas y no irradiadas). Este aumento fue leve pero significativamente superior ($p < 0,05$) en los marinados control en comparación con los irradiados. Luego y hasta el final del almacenamiento, el valor de TBARS₅₃₂ tendió a disminuir debido posiblemente a reacciones posteriores de los productos de oxidación lipídica, como fuera observado en pescado irradiado como besugo (Chouliara et al., 2004), róbalo (Özden et al., 2007) y anchoas (Lakshmanan et al., 1999).

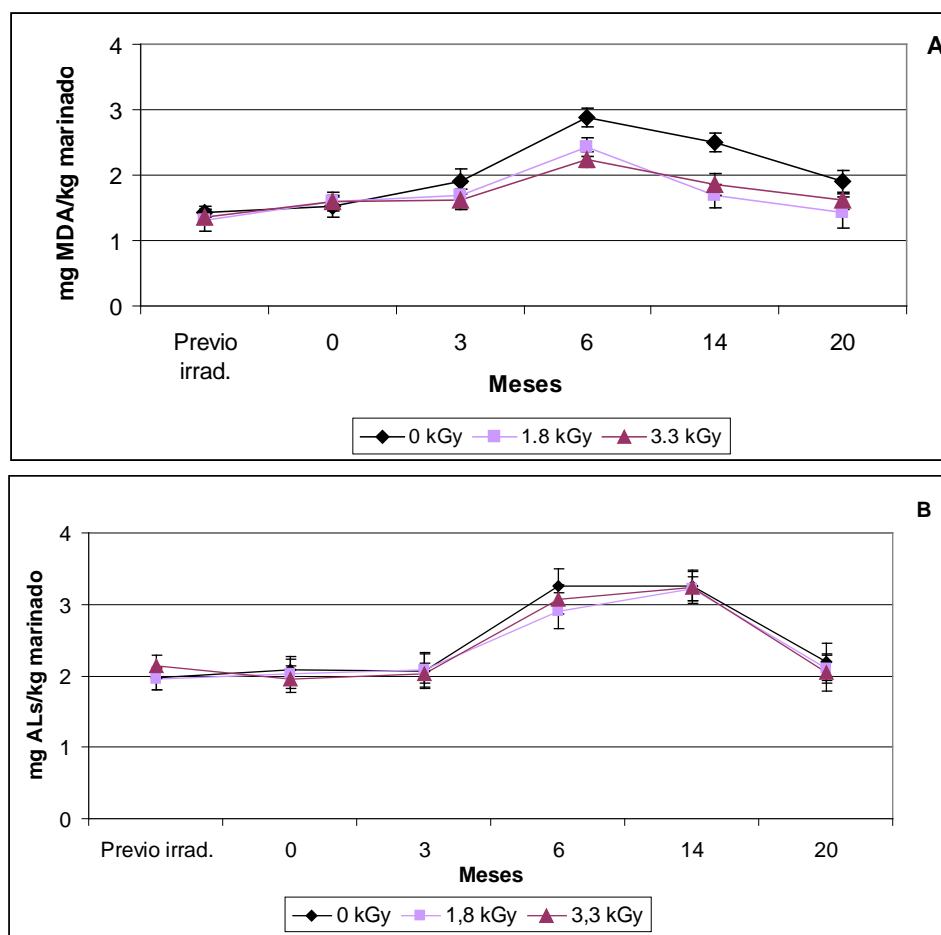


Figura 5.1.3. Evolución de TBARS₅₃₂ (A) y TBARS₄₅₅ (B) en los marinados irradiados durante almacenamiento a 4-5 °C. Error estándar representado por barras (n=2).

El valor de TBARS₄₅₅ se mantuvo sin cambios hasta el mes 6, cuando aumentó en todas las muestras hasta un valor medio de $3,1 \pm 0,2$ mg ALs/kg, mostrando una tendencia decreciente hacia el final de los 20 meses. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el valor de TBARS₄₅₅ entre las muestras irradiadas y el control, durante 20 meses de almacenamiento.

De acuerdo a lo mencionado previamente, el análisis de los ácidos grasos del perfil de lípidos indicó que el 26,39% de los lípidos totales correspondía a AGPI, los cuales son muy sensibles a la oxidación por el alto grado de insaturación de sus cadenas. De acuerdo a la información hallada en la bibliografía, los AGPI también resultan más sensibles frente a la irradiación, debido tanto al mayor número de sitios de ataque radiolítico como a la mayor estabilidad energética de la molécula por la deslocalización y resonancia electrónicas (Dickson, 2001; Josephson, 1983). A su vez, la radiación ionizante genera radicales libres que podrían aumentar la oxidación de los lípidos al intervenir en el proceso de autooxidación de los AGPI.

Sin embargo, la aplicación de irradiación gamma en los marinados envasados al vacío no provocó un aumento tan importante de los productos de oxidación de lípidos en comparación con las muestras sin irradiar, debido posiblemente a que la exclusión de oxígeno del ambiente del alimento haya reducido la oxidación de lípidos al evitar la generación de aldehídos (Brewer, 2009; Urbain, 1986). Resultados similares en cuanto a la observación de menores valores de TBARS en productos pesqueros irradiados envasados al vacío fueron hallados en sardina (Kasimoglu et al., 2003) y caballa (Mbarki et al., 2009), mientras que se observó un aumento de la oxidación en *Nemipterus japonicus* irradiado pero no envasado al vacío (Jeevanandam et al., 2001).

A su vez, se puede inferir que la mayor oxidación en las muestras sin irradiar podría atribuirse a la actividad de las enzimas microbianas provocando hidrólisis de lípidos, dando como resultado el aumento de ácidos grasos libres que son más susceptibles a la oxidación comparando con los mismos ácidos grasos que forman el triglicérido (Huss, 1999; Nawar, 1966). Este efecto no se observó en los productos irradiados, donde la flora microbiana fue inactivada.

Con respecto a productos marinados sin irradiar, Günsen et al. (2011) observaron que el TBARS junto con la evaluación sensorial fueron los factores determinantes de la vida útil de anchoítas marinadas (4% ácido acético) envasadas al vacío. Hallaron un incremento del TBARS desde $1,04 \pm 0,02$ hasta $6,74 \pm 0,03$ mg MDA/kg en 7 meses de almacenamiento a 2 ± 2 °C. Sallam et al. (2007) observaron que el TBARS aumentaba luego de 70 días a 4 °C desde 0,63 hasta 2,13 mgMDA/kg en *Cololabis saira* marinada (3% ácido acético y 12% NaCl) y envasada al vacío, descendiendo hacia el final del estudio (día 90).

En los marinados sin irradiar, el valor de TBARS máximo hallado fue 3,25 mg ALs/kg, lo que podría indicar que el envasado al vacío en conjunto con la marinación le otorgaron al producto estabilidad frente a la oxidación de lípidos.

Asimismo, se observó que los marinados irradiados presentaron un menor valor de TBARS en comparación con las muestras sin irradiar, lo que podría estar que la inactivación microbiana causada por la irradiación habría retardado en cierto grado los cambios oxidativos.

5.1.2.6. Color

Durante el almacenamiento del pescado tienen lugar reacciones oxidativas y deteriorantes, entre otras, que provocan cambios en el color del mismo, los cuales pueden ser medidos a través de los parámetros del sistema espacial de color CIELAB.

Como se mencionó anteriormente, los marinados de anchoíta frescos tienen un color grisáceo/blanquecino producto del desangrado previo a la marinación en un baño de salmuera (**Imagen 5.1.2**) (Yeannes & Casales, 1995; Yeannes & Casales, 2008) y del tratamiento con ácidos orgánicos durante la misma. Durante el almacenamiento de los marinados tienen lugar modificaciones de las características sensoriales producto del deterioro, entre las cuales el color y la textura han sido consideradas como unos de los más importantes indicadores de la pérdida de frescura (Yeannes et al., 2007).

En las **Figuras 5.1.4 A, B y C** se presenta la evolución de los parámetros a^* , b^* y de la diferencia de color (DE2000) en los marinados de anchoíta, respectivamente.

Valores positivos de a^* representan la intensidad de color rojo. El comportamiento de a^* fue similar en el control y en las muestras irradiadas durante los 20 meses de almacenamiento refrigerado, sin que el mismo fuera modificado ($p > 0,05$) por las distintas dosis de irradiación aplicadas (**Figura 5.1.4 A**).

Con respecto al tiempo de almacenamiento, a^* no se vio modificado durante los primeros 6 meses de almacenamiento, a partir de los cuales y hasta el final del estudio (20 meses) se observó una muy leve disminución ($p < 0,05$) desde $1,0 \pm 0,5$ hasta $0,2 \pm 0,3$ (valor medio de las muestras control e irradiadas). Otros autores han observado un cambio de color hacia los amarillos-marrones durante el almacenamiento de marinados de *E. anchoíta* (Yeannes et al., 2007) y de *E. encrasicholus*, a los 7 meses de almacenamiento en refrigeración (Günsen et al., 2011).

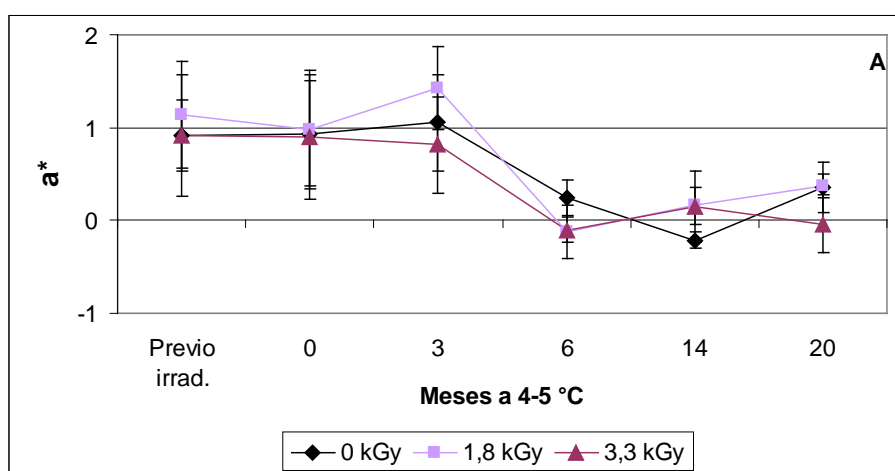


Figura 5.1.4. A. Evolución de a^* en marinados de anchoíta sin irradiar (●) e irradiados con 1,8 (■) y 3,3 (▲) kGy, durante su almacenamiento a 4-5 °C (media \pm error estándar, $n=2$).

El valor de b^* se relaciona con la pigmentación amarilla. Previo a la irradiación, b^* presentó un valor de $13,1 \pm 1,3$. El mismo no se vio afectado por la irradiación gamma a los niveles de dosis aplicados ($p > 0,05$), indicando que la irradiación no produjo cambios en el color de los marinados (Figura 5.1.4 B).

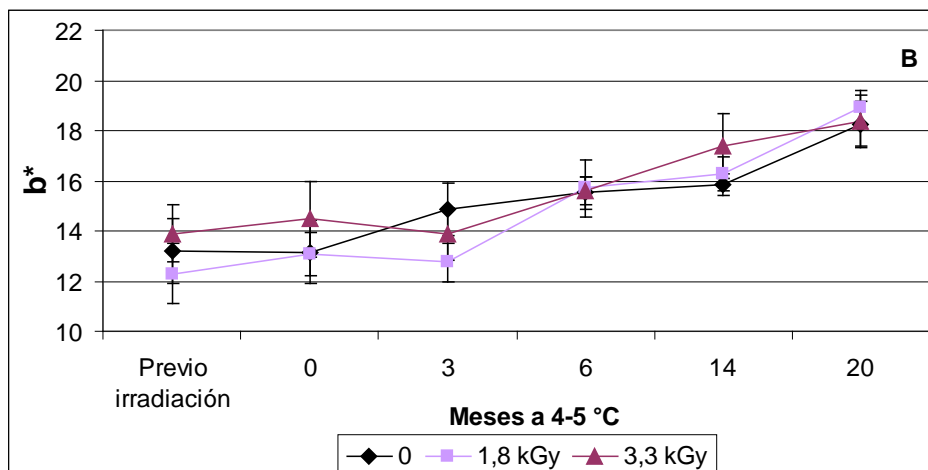


Figura 5.1.4. B. Evolución de b^* en marinados de anchoíta sin irradiar (\blacklozenge) e irradiados con 1,8 (\blacksquare) y 3,3 (\blacktriangle) kGy, durante su almacenamiento a 4-5 °C (media \pm error estándar, $n=2$).

Durante el almacenamiento, b^* aumentó significativamente ($p < 0,05$) en todas las muestras hasta $18,1 \pm 0,9$, sin que se observaran diferencias significativas entre las mismas. Este aumento en b^* podría estar relacionado con el incremento en los valores de oxidación de lípidos observados tanto en el control como en las muestras irradiadas. Los incrementos en el valor b^* han sido asociados con los procesos oxidativos en lípidos de productos pesqueros (Corso et al., 2006; Thanokaew et al., 2006).

La luminosidad (L^*), no se vio afectada ($p > 0,05$) por dosis de 1,8 y 3,3 kGy de irradiación gamma ni por el tiempo de almacenamiento, permaneciendo constante entre $70,7 \pm 1,5$ y $73,0 \pm 1,4$, durante 20 meses en refrigeración.

La diferencia de color DE2000 se calculó tomando como referencia los valores de L^* , a^* y b^* previos a la aplicación de la irradiación.

DE2000 aumentó significativamente en todas las muestras durante el almacenamiento, sin que se observaran diferencias ($p > 0,05$) por el efecto de la irradiación hasta los 6 meses de almacenamiento, cuando DE2000 del control fue significativamente superior ($p < 0,05$) al de las muestras irradiadas (**Figura 5.1.4 C**).

Estos cambios en la diferencia de color durante el almacenamiento estarían de acuerdo con las observaciones de Yeannes & Casales (1995) y Yeannes et al. (2007), quienes observaron durante el deterioro de marinados de *E. anchoíta* cambios en el color

que tienden al oscurecimiento del color grisáceo blanquecino, hacia los amarillos y marrones.

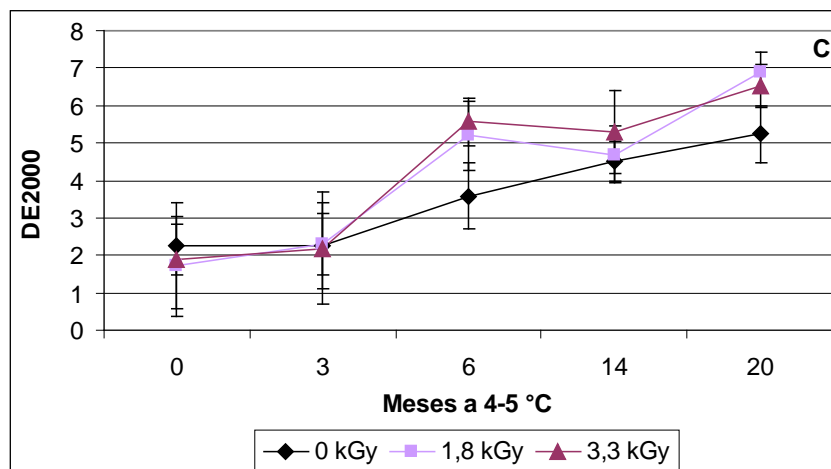


Figura 5.1.4. C. Evolución de DE2000 en marinados de anchoíta sin irradiar (◆) e irradiados con 1,8 (■) y 3,3 (▲) kGy, durante su almacenamiento a 4-5 °C (media \pm error estándar, n=2).

Durante el almacenamiento, el color varió siguiendo un mismo comportamiento en las muestras irradiadas y el control, a diferencia de lo observado en las anillas de calamar, donde el efecto de la irradiación fue significativo al retardar los cambios de color debido al deterioro, durante todo el almacenamiento. Es posible que los leves cambios observados en el color de los marinados se deban fundamentalmente a reacciones propias del deterioro, como la oxidación de lípidos, ya que el aumento del parámetro b^* fue el cambio de mayor importancia en comparación con los otros parámetros. Sin embargo, los marinados resultaron un producto muy estable, lo que fue evidenciado también por la poca variación en el color durante el almacenamiento. Asimismo, la irradiación no modificó el color de los marinados ni de las anillas de calamar. En la **Figura 5.1.5** se muestra una imagen de los marinados irradiados con las distintas dosis, a los 2 días de aplicada la irradiación, donde se pone de manifiesto lo mencionado anteriormente.



Figura 5.1.5. Marinados de anchoita envasados al vacío, sin irradiar e irradiados con 1,8 y 3,3 kGy, a los dos días de aplicada la irradiación.

Los resultados obtenidos de los parámetros de color han resultado muy promisorios para estos productos pesqueros utilizando esta combinación de tecnologías, dado que diversos autores han hallado en otros productos pesqueros modificaciones en el color característico, como consecuencia del tratamiento con radiación ionizante. Se pueden mencionar los resultados obtenidos en ese sentido por Badr (2012) en salmón ahumado quien determinó la pérdida de la coloración típica al aplicarse 4 kGy y aquellos de Lescano et al., (1990) en filetes de merluza tratados con 3,3 kGy de irradiación gamma quienes observaron una leve coloración rojiza.

5.1.3. Conclusiones parciales

Dosis de 1,8 y 3,3 kGy de irradiación gamma redujeron los recuentos de bacterias mesófilas y retrasaron la producción de NBVT, sin inducir cambios en el color característico de filetes marinados de anchoíta envasados al vacío. No se observaron diferencias entre ambas dosis aplicadas sobre los parámetros mencionados.

La menor producción de NBVT en los marinados irradiados se debería en parte al efecto bactericida de la irradiación. Considerando el valor límite genérico de aceptabilidad de NBVT, la dosis de 1,8 kGy fue suficiente para aumentar en 3 meses el tiempo en que

los marinados alcanzan el mismo, sin embargo este valor máximo podría no ser adecuado para este tipo de productos. Los resultados provenientes de este trabajo de tesis efectuarían un aporte al conocimiento en esta temática que permitiría definir en un futuro un límite específico para estos productos.

Se observaron valores de TBARS menores en los marinados anchoíta envasados al vacío irradiados, en comparación con el control. Esto podría atribuirse a la inactivación microbiana por la irradiación, y a que la atmósfera reducida en oxígeno le otorgara al producto cierto efecto protector frente a la oxidación lipídica.

El tiempo de almacenamiento tuvo un efecto más importante en el color que el efecto de las diferentes dosis, dado que no se observaron diferencias entre los parámetros de color de los marinados irradiados y sin irradiar. Asimismo, los cambios fueron leves durante el almacenamiento, pudiendo estar relacionados (en especial el parámetro b*) con la oxidación de lípidos.

La marinación en las condiciones analizadas en combinación con el envasado al vacío le otorgaron al producto una estabilidad mayor comparando con los marinados de anchoíta tradicionales, ya que ninguna muestra alcanzó el límite microbiológico establecido para este tipo de producto durante 20 meses en refrigeración, en comparación con la vida útil estipulada del producto tradicional (6 meses). La irradiación gamma retrasó reacciones relacionadas con el deterioro, mejorando así la calidad microbiológica y química de los filetes marinados.

Estos resultados indicarían que es posible disminuir la intensidad de la marinación utilizada en este caso por la empresa proveedora, por lo que se propone disminuir a 3% la concentración de ácido acético en lugar de 7% en la formulación de los marinados, para analizar el efecto de la irradiación sobre dicho producto.

IRRADIACIÓN DE MARINADOS DE ANCHOÍTA ELABORADOS EN SOLUCIÓN DE MARINACIÓN CON 3 % DE ÁCIDO ACÉTICO.

5.1 Irradiación de marinados de anchoíta con 3 % ácido acético

Debido a la extensa vida útil alcanzada por los marinados elaborados con solución acuosa al 7% de ácido acético, con y sin el tratamiento de irradiación, en esta experiencia se trabajó con marinados de anchoíta elaborados con una solución de marinación con un 3% de ácido acético. La menor concentración de ácido en la solución de marinación implicaría la reducción de la intensidad de la barrera acidez y de su efecto preservativo.

Los filetes envasados al vacío se irradiaron con 0, 2, 3 y 4 kGy y se analizaron aspectos microbiológicos, fisicoquímicos y la aceptabilidad sensorial durante el almacenamiento en refrigeración. También se determinó la textura mediante métodos instrumentales y sensoriales.

5.2.1 Tratamiento de la Materia prima y metodología utilizada

Los filetes de *Engraulis anchoita* marinados con solución acuosa de ácido acético al 3% p/v (**M3**) fueron obtenidos siguiendo el protocolo descrito en el **Capítulo 3**, en otra planta de procesamiento de la ciudad de Mar del Plata en el mes de Noviembre. Los marinados fueron elaborados a partir de anchoíta congelada, que había sido capturada en el mes de mayo y estuvo almacenada a -18 °C durante 7 meses. Los marinados fueron transportados refrigerados (4-5 °C) a la Facultad de Ingeniería, donde se envasaron al vacío utilizando una cerradora Minimax 430M (Servivac, Argentina), en envases termo-sellados de PEBD/PA (Cryovac®, espesor = 125 µm, velocidad de transferencia de oxígeno = 35 cc/m²/24h; velocidad de transferencia de vapor de agua = 9 g/ m²/24h). Cada muestra consistió en un envase de 130 ± 5 g de filetes marinados envasados al vacío. Se contó con 10 muestras para cada dosis y cada fecha de análisis a fin de realizar el experimento por duplicado.

Las muestras fueron transportados al Centro Atómico Ezeiza, donde se irradiaron con dosis de 2, 3 y 4 kGy (dosis mínimas reales absorbidas: 2,18; 3,12 y 3,85 kGy) a una velocidad de dosis de 10,9 kGy/h (Dmáx/Dmín = 1,13), de acuerdo a las consideraciones del **Capítulo 3**. Se utilizaron dosímetros de dicromato de plata.

Las muestras se mantuvieron a 4-5 °C durante almacenamiento y transporte. Fueron analizadas antes de la irradiación y a los 5, 125, 180, 243 y 330 días posteriores a la misma. Se determinó el pH, el NBVT, TBARS, la aceptabilidad sensorial (con 12 panelistas), el color y la textura (sensorial e instrumentalmente). Se cuantificaron bacterias mesófilas, psicrótrofas, clostridios sulfito-reductores y hongos y levaduras.

Los resultados se analizaron mediante ANOVA de dos factores: dosis (0, 2, 3 y 4 kGy) y tiempo de almacenamiento (00 -previo a la irradiación-, 0, 3, 6, 8 y 10 meses) (**Capítulo 3**).

5.2.2. Resultados y discusión

5.2.2.1. a_w , acidez y pH

La a_w de estos marinados fue $0,971 \pm 0,03$, similar a la de los marinados de la **Sección 5.1**. No se observaron modificaciones ($p > 0,05$) debido a la irradiación en ninguna de las muestras.

La acidez fue $1,13 \pm 0,05$ g ácido acético/100g filete, menor a la de los marinados elaborados con 7% de ácido (**Sección 5.1**). Este valor es similar al observado en marinados de *E. anchoíta* elaborados con 3 % p/v de ácido acético (Fuselli et al., 1994; Yeannes & Casales, 1995; Cabrer et al., 2002).

El pH de los marinados previo a la irradiación fue $4,26 \pm 0,04$, valor similar al hallado en marinados de *E. anchoíta* (Fuselli et al., 1994; Yeannes & Casales, 1995; Cabrer et al., 2002) y de *Cololabis saira* (Sallam et al., 2007) elaborados con 3% de ácido acético. El valor hallado es superior al de los **M7**, lo que se explicaría porque la concentración de ácido en la solución influye sobre la acidez y el pH del producto final. A mayor concentración de ácido en la solución se espera una mayor acidez y un menor pH en el filete, como ha sido comprobado en marinados de *Cololabis saira* elaborados con 3 % de ácido acético, los cuales presentaron una acidez significativamente mayor y un pH significativamente menor al de las muestras elaboradas con 2% de ácido (Sallam et al., 2007). Asimismo, Gokoglu et al. (2004) observaron un comportamiento similar en marinados de *Sardina pilchardus* elaboradas con 2% y 4% de ácido acético.

La irradiación gamma no tuvo un efecto significativo ($p > 0,05$) sobre el pH de los marinados. El pH de las muestras sin irradiar y las irradiadas se mantuvo sin cambios

significativos ($p > 0,05$) durante 10 meses de almacenamiento en refrigeración. Este resultado está de acuerdo con lo observado en los marinados **M7**, en los cuales el pH se mantuvo sin cambios durante 20 meses en refrigeración.

5.2.2.2. Aspectos microbiológicos

Los recuentos iniciales de bacterias mesófilas y psicrótrofas en las anchoítas enteras descongeladas previo a la marinación fueron bajos, siendo 6×10^2 y 9×10^2 UFC/g, respectivamente. No se detectó la presencia de *Staphylococcus aureus*, clostridios sulfito-reductores, ni de mohos y levaduras. Estos resultados son similares a los hallados por Fuselli (1994; 1998) en *Engraulis anchoita* conservada en las mismas condiciones que la presente experiencia.

No se detectaron bacterias mesófilas, psicrótrofas, clostridios sulfito-reductores ni hongos y levaduras (< 10 UFC/g) en los marinados de anchoíta previo a la irradiación, lo que indicaría que los grupos microbianos analizados se han visto afectados por el proceso de marinación. Estos resultados estarían de acuerdo con lo observado en marinados de *E. anchoita* elaborados con 3% de ácido acético, a partir de materia prima congelada (Fuselli et al., 1994). A su vez, Sallam et al. (2007) observaron que las bacterias mesófilas y psicrótrofas no eran totalmente inhibidas por la marinación de *Cololabis saira* con 3% de ácido acético.

Es importante destacar que trabajando con *Engraulis anchoita* marinada al 3% de ácido acético y habiendo partido de materia prima congelada, Fuselli et al. (1998) observaron que si bien al final del proceso de marinación no se detectaron bacterias mesófilas y psicrótrofas, las mismas se adaptaron al medio ácido luego de cuatro meses de almacenamiento. De acuerdo al procedimiento realizado en la experiencia actual, estos microorganismos no pudieron sobreponerse al medio ambiente hostil causado por la marinación, posiblemente por estar dañados debido al mayor período de almacenamiento en congelación (7 meses).

Durante 10 meses de almacenamiento en refrigeración, no se detectó desarrollo de bacterias mesófilas, psicrótrofas, CSR ni hongos y levaduras en los marinados sin irradiar y los irradiados con 2, 3 y 4 kGy. Estos resultados muestran la estabilidad microbiológica de los marinados, independientemente de que estén irradiados o no.

5.2.2.3. NBVT

Se partió de un valor de NBVT en la materia prima (anchoíta congelada) de $22,35 \pm 0,8$ mg/100 g. El mismo se encuentra dentro los usuales en esta especie (Yeannes et al., 1983; del Valle et al., 1984), considerando su condición de congelada y mantenida en esas condiciones durante 7 meses. (Ciarlo et al., 1987; Lupín et al., 2007).

El comportamiento del NBVT en los marinados de anchoíta irradiados durante el almacenamiento en refrigeración se presenta en la **Figura 5.2.1**.

El valor inicial promedio de los filetes marinados fue $24,5 \pm 1,1$ mg/100 g, considerando la materia prima de la que se partió y el proceso realizado, lo que concuerda con lo obtenido por Yeannes & Casales (2008) en similares condiciones. Este valor de NBVT en el marinado de anchoíta no fue afectado ($p > 0,05$) por la aplicación de la irradiación gamma.

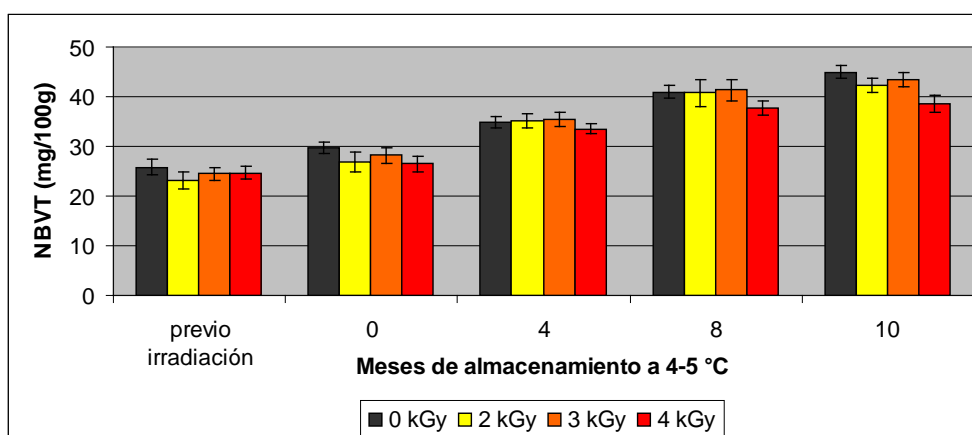


Figura 5.2.1. Evolución del NBVT en los marinados de anchoíta irradiados durante el almacenamiento en refrigeración (media \pm error estándar, n=2).

Durante el almacenamiento en refrigeración, el NBVT aumentó significativamente ($p < 0,05$) en todas las muestras, sin que se observaran diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de NBVT de las muestras irradiadas y sin irradiar. Este hecho se podría explicar por la ausencia de microorganismos tanto en las muestras irradiadas como en el control, ya que una de las causas del aumento de NBVT es la producción de trimetilamina por actividad microbiana. Asimismo, el incremento de NBVT durante el almacenamiento en refrigeración podría deberse a la producción enzimática de dimetilamina, dado que el proceso de irradiación no afectaría a las enzimas presentes (Huss, 1995; Hwang & Hau, 1995; Molins, 2001; Urbain, 1986).

5.2.2.4. Contenido de lípidos. Oxidación de lípidos (TBARS)

El contenido de lípidos de los marinados de anchoíta fue $13,3 \pm 0,7$ mg/100g (base húmeda). Este valor es superior al hallado en los marinados **M7**, pero se encuentra dentro de los valores registrados para la especie, de acuerdo con las variaciones estacionales características de la misma (Massa et al., 2007; Yeannes & Casales, 1995). Chiodi (1970) observó un porcentaje de lípidos de 13,6% en *E. anchoíta* capturada en el mes de mayo.

En la **Figura 5.2.2** se presenta la evolución del TBARS durante el almacenamiento refrigerado.

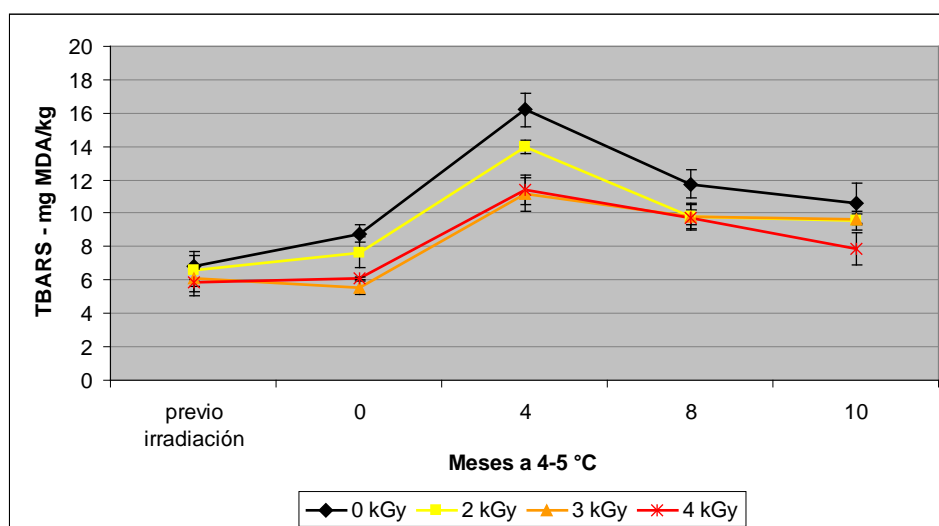


Figura 5.2.2. Evolución del TBARS en los marinados de anchoíta irradiados durante el almacenamiento en refrigeración.

El valor medio inicial para las muestras irradiadas y sin irradiar fue $6,3 \pm 0,8$ mgMDA/kg, superior al obtenido en la experiencia anterior de marinación con 7% de ácido acético. Al comparar ambas experiencias se debe considerar que en la experiencia actual se partió de una materia prima con mayor contenido de lípidos y un mayor tiempo de almacenamiento, siendo la oxidación de lípidos una reacción del deterioro muy importante durante el almacenamiento congelado de pescado (Aubourg et al., 2002; Sahoo & Verma, 1999; Sarma et al., 2000).

Durante el almacenamiento a 4-5 °C, el contenido de TBARS aumentó significativamente ($p < 0,05$) en los marinados sin irradiar y los irradiados con 2, 3 y 4 kGy

hasta $16,2 \pm 1,0$; $14,0 \pm 0,4$; $11,1 \pm 0,4$ y $11,4 \pm 0,4$ mgMDA/kg, respectivamente, a los 4 meses.

El aumento de TBARS fue más pronunciado en los marinados sin irradiar en comparación con las muestras irradiadas. Kilinc y Cakli (2005) hallaron valores de $4,47 \pm 0,15$ mgMDA/kg en sardina marinada, que aumentaron hasta $8,21 \pm 0,39$ mgMDA/kg luego de 6 meses de almacenamiento a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y Günsen et al. (2011) también observó en marinados de *E. encrasicholus* envasados al vacío un aumento de TBARS de 1,04 a 6,74 mgMDA/kg a los 7 meses de almacenamiento a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En el mes 4, el TBARS de los marinados sin irradiar fue significativamente mayor ($p < 0,05$) al de los irradiados, mientras que la muestra irradiada con 2 kGy presentó un valor mayor al de las muestras irradiadas con 3 y 4 kGy.

Estos resultados podrían indicar que la irradiación gamma ha tenido un efecto protector sobre la oxidación de lípidos en marinados de anchoíta envasados al vacío, en comparación con las muestras sin irradiar. Este mismo efecto fue observado en los marinados **M7**, en los que la menor oxidación en las muestras irradiadas se atribuiría a la inactivación de la flora microbiana por la irradiación. Sin embargo, en estos marinados no se observó desarrollo microbiano en ninguna de las muestras (irradiada o sin irradiar), por lo que la disminución de la oxidación no podría ser solamente atribuible al efecto bactericida de la irradiación. Razón por la cual es importante tener en cuenta observaciones de Nawar (1966; 1983), quien menciona que en ciertos casos la irradiación resultaría en la formación de nuevos factores protectores, por reacción de grupos carbonilo con aminas, tales como amino-hexosa-reductonas, que pueden mejorar la estabilidad del producto frente a la oxidación. Además, existen investigaciones que sostienen que por efecto de la irradiación se destruirían parcialmente el malondialdehído y otras especies que reaccionan con el TBA. Los productos de oxidación de lípidos en los productos irradiados podrían reaccionar con otros compuestos, como proteínas, antes que con el TBA (Diehl; 1983; Nawar, 1983; Tükenmez, 1997). Algunos de ellos sostienen que la irradiación ionizante aumentaría la oxidación de lípidos, pero tan rápido y en tal medida que la determinación del Índice de peróxido (IP) o TBARS podría no ser efectiva para la evaluación de esta actividad. La misma podría ser medida analíticamente mediante el perfil lipídico o evaluada sensorialmente.

5.2.2.5. Aceptabilidad sensorial

En las **Figuras 5.2.3** se presentan los resultados del test de aceptabilidad sensorial de los marinados de anchoíta envasados al vacío, sin irradiar e irradiados con 2, 3 y 4 kGy. Se muestra el puntaje promedio para los atributos aceptabilidad global, apariencia, color, aroma, sabor y textura en las diferentes fechas de análisis (5, 126, 183, 245 y 336 días posteriores a la irradiación).

Los atributos aceptabilidad global, apariencia, color, aroma, sabor y textura de los marinados sin irradiar y los irradiados con 2, 3 y 4 kGy fueron generalmente puntuados con valores de 5 o mayores durante los 10 meses de almacenamiento. Esto indica aceptación por parte de los panelistas, ya que puntajes superiores a 5 representan diferentes intensidades positivas de aceptabilidad (desde *me gusta poco* a *me gusta muchísimo*).

A los 5 días de aplicada la irradiación, la aceptabilidad global de los marinados sin irradiar y los irradiados con 2, 3 y 4 kGy fue puntuada con $6,8 \pm 1,5$; $6,4 \pm 1,8$; $6,6 \pm 1,6$ y $6,7 \pm 0,9$, respectivamente, sin que se observaran diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras irradiadas y el control. El mismo comportamiento fue observado en todos los atributos analizados. Resultados similares fueron hallados en caballa (*Scomber japonicus*) irradiada con 1,5 kGy (Mbarki et al., 2009). En dicho caso, las muestras envasadas al vacío y tratadas con irradiación gamma tuvieron mayor aceptabilidad sensorial que las no irradiadas.

Asimismo, el efecto de la dosis de irradiación no fue significativo ($p > 0,05$) sobre la aceptabilidad global, la apariencia, el color, el aroma, el sabor y la textura de los marinados de anchoíta durante el almacenamiento en refrigeración, es decir, a los 5 días y a los 4, 6, 8 y 10 meses, lo que implica que ningún atributo fue sensiblemente afectado por el tratamiento de irradiación. Este resultado concuerda con lo observado en las anillas de calamar en el **Capítulo 4** y con lo observado en otros productos pesqueros y en pollo (Javanmard et al., 2006; Kannat et al., 2006; Lescano et al., 1990). Sin embargo, la aceptabilidad de las anillas fue superior a la de los marinados de anchoíta. Una razón podría ser el alto nivel de TBARS. La oxidación de los lípidos afecta negativamente la calidad al producir cambios en el aroma, color y sabor de los productos pesqueros (Ólafsdóttir et al., 1997). A diferencia de la *Engraulis anchoita* que es una especie grasa, el calamar *Illex argentinus* presenta un bajo contenido de lípidos (1-2%) (Melaj et al., 1994; Sigiyama et al., 1990), lo que lo convierte en menos propenso a la oxidación, siendo este uno de los motivos que impulsaron la elección de las anillas de calamar para

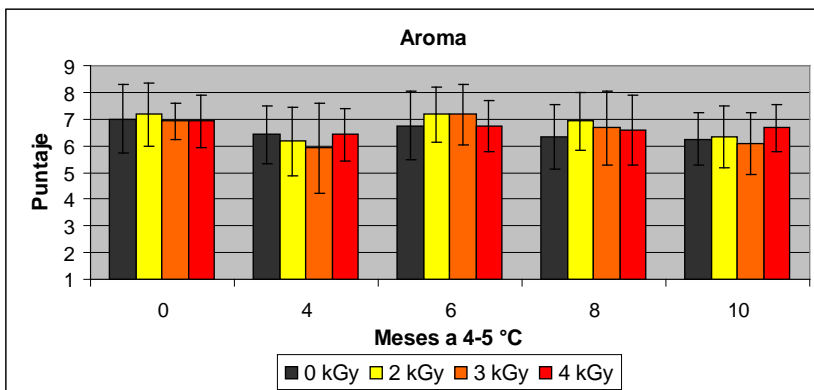
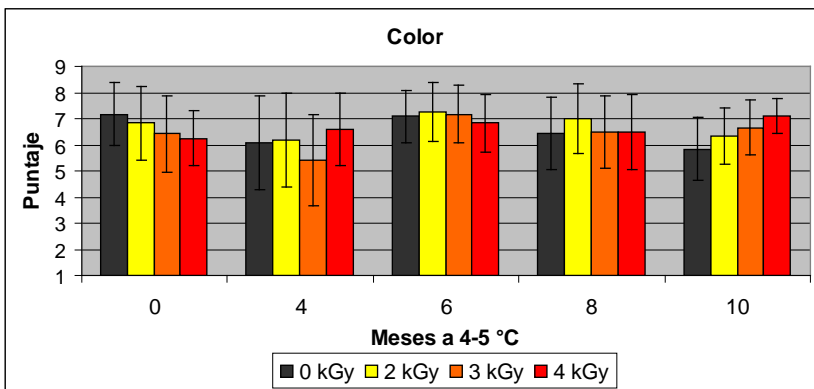
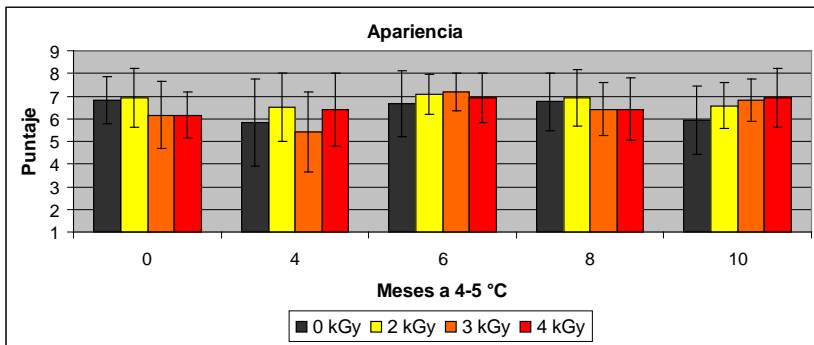
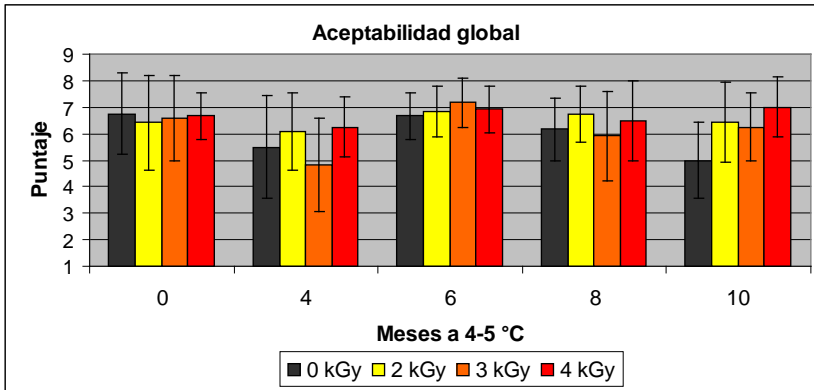
ser tratadas con irradiación gamma. De acuerdo a Diehl (1995), en los alimentos que tienen una baja proporción de lípidos la irradiación no provocaría un aumento de la autooxidación, ya que la competencia de otras sustancias como carbohidratos y proteínas por capturar la energía ionizante protegería a los lípidos del deterioro oxidativo (Green & Watts, 1966).

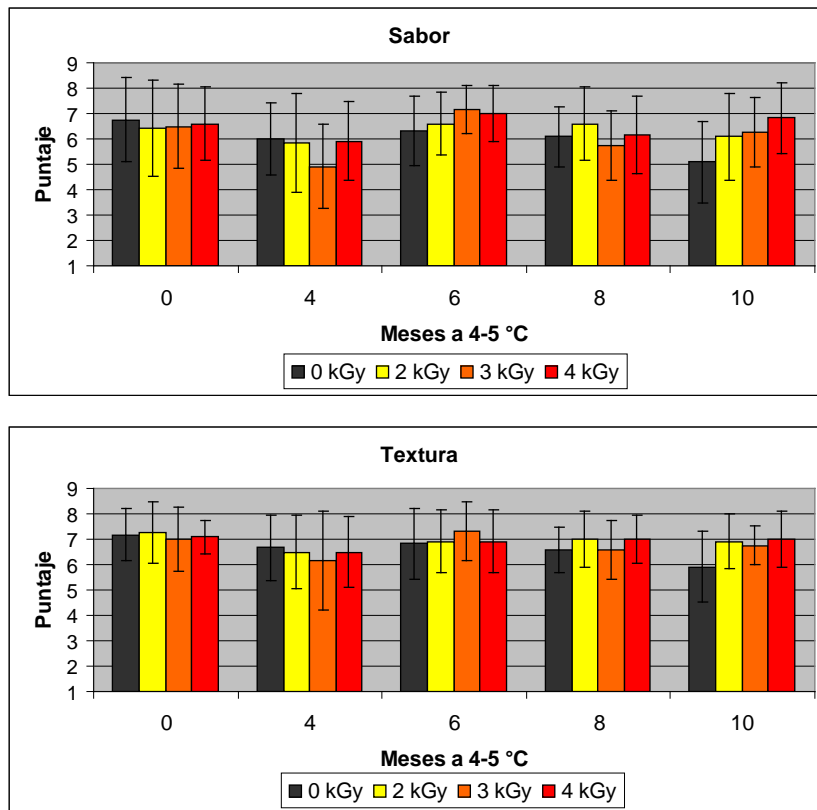
Los atributos apariencia, color y textura no fueron afectados ($p > 0,05$) por el tiempo de almacenamiento, recibiendo puntajes similares durante los 10 meses de almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, el efecto del tiempo de almacenamiento si fue significativo ($p < 0,05$) sobre la aceptabilidad global, el aroma y el sabor. Dichos atributos tuvieron un menor nivel de aceptación al cuarto mes de almacenamiento en comparación con los meses 0 y 6. Esto podría coincidir con el elevado nivel de oxidación observado en dicho momento, en el que las muestras irradiadas con 0, 2, 3 y 4 kGy presentaron valores de TBARS de $16,2 \pm 1,0$, $14,0 \pm 0,4$, $11,14 \pm 1,0$ y $11,4 \pm 0,9$ mgMDA/kg, respectivamente. De todas formas, los valores medios de aceptabilidad de estos atributos siempre superaron al valor 5, sobre el cual se considera que son aceptables.

De acuerdo con Günsen et al. (2011), filetes de *Engraulis encrasicolus* marinados con 4% de ácido acético, envasados al vacío y almacenados en refrigeración, fueron rechazados sensorialmente a los 7 meses, principalmente debido a la coloración marrón, el ablandamiento de la textura y la aparición de off-flavours. También ha sido reportada por Sallam et al. (2007) una disminución de la aceptabilidad sensorial de marinados (3% ácido acético) de *Cololabis saira* envasados al vacío, durante 3 meses de almacenamiento a 4 °C, siendo de todas formas aceptadas durante todo el período de almacenamiento. Gokoglu et al. (2004) informó que marinados de sardina presentaron una disminución de los puntajes sensoriales durante el almacenamiento en refrigeración, viéndose deterioradas a los 4 meses y Kilinc & Cakli (2005) observaron que el puntaje sensorial de sardina (*Sardina pilchardus*) marinada disminuía durante el almacenamiento en refrigeración, hasta alcanzar una calidad “no consumible” a los 6 meses.

En este trabajo, los marinados de anchoíta irradiados mantuvieron su aceptabilidad sensorial durante 10 meses de almacenamiento en refrigeración.

Los resultados de este trabajo indican que la aplicación de la irradiación gamma a 2, 3 y 4 kGy no disminuyó la aceptabilidad global ni la aceptabilidad de la apariencia, el color, el aroma, el sabor y la textura de los marinados de anchoíta en comparación con las muestras sin irradiar, durante 10 meses de almacenamiento en refrigeración.





Figuras 5.2.3. Resultados de la evaluación sensorial de la de la aceptabilidad global, la apariencia, el color, el aroma, el sabor y la textura de marinados de anchoita irradiados (media \pm error estándar, n=2).

5.2.2.6. Determinación de la textura de marinados irradiados, durante el almacenamiento en refrigeración. Determinaciones sensoriales e instrumentales

Como se mencionó anteriormente, la textura y el color son los atributos que presentan cambios mas pronunciados, fácilmente evidenciables y medibles en la calidad sensorial de marinados de *Engraulis anchoita* (Yeannes & Casales, 2007). Por estos motivos se analizó la textura de los marinados irradiados, a fin de analizar el efecto de la irradiación sobre la misma.

5.2.2.6.1. Determinación sensorial de la textura de marinados irradiados durante el almacenamiento.

Se llevó a cabo la evaluación sensorial de la dureza de los filetes marinados de anchoíta irradiados y sin irradiar, a los 5 días y 4, 6, 8 y 10 meses de almacenamiento en refrigeración. La dureza fue definida como la *fuerza requerida para cortar transversalmente la parte media del filete, valiéndose de un tenedor metálico* y se midió

utilizando una escala de 0 a 10, donde 5 representaba la textura característica de un marinado en su grado óptimo de marinación y 10 la mayor intensidad de dureza (filete de anchoita cruda sin marinar). Los resultados de dicha determinación se presentan en la **Tabla 5.2.4.**

Tabla 5.2.1. Dureza al corte de los marinados de anchoíta determinada sensorialmente.

Meses	0 kGy	2 kGy	3 kGy	4 kGy
0	4,8±0,9 a B*	6,7±1,1 a A	6,5±0,8 a A	6,7±1,0 a A
4	4,7±1,0 a B	6,5±1,0 a A	6,2±0,7 a A	6,7±1,0 a A
6	4,2±0,9 ab B	6,5±0,7 a A	6,0±0,9 a A	6,0±1,3 a A
8	2,8±0,7 bc B	6,3±1,0 a A	6,1±0,7 a A	6,5±0,7 a A
10	2,5±0,7 c B	6,1±0,8 a A	6,3±0,9 a A	6,3±1,1 a A

*Medias ± error estándar (ee) seguidas por letras mayúsculas diferentes en una misma fila son significativamente diferentes debido a la dosis. Medias seguidas por letras minúsculas diferentes en una misma columna son significativamente diferentes debido al tiempo de almacenamiento ($p < 0,05$).

La irradiación tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la textura de los marinados de anchoíta, al provocar un aumento en la dureza de los mismos. A los 5 días de almacenamiento, los marinados sin irradiar presentaron una dureza de $4,8 \pm 0,9$, mientras que los marinados irradiados con 2, 3 y 4 kGy tuvieron una dureza promedio de $6,6 \pm 0,9$, sin que se observaran diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras irradiadas. La dureza de los marinados sin irradiar se correspondería con la característica de un marinado en su punto óptimo de marinación, de acuerdo a la escala utilizada, en la que se tuvieron en cuenta las consideraciones de Yeannes & Casales (1995). Resultados similares se observaron a los 4, 6, 8 y 10 meses en refrigeración, resultando más duras las muestras irradiadas que el control ($p < 0,05$).

La dureza al corte de los marinados irradiados se mantuvo sin cambios, entre 6,0 y 6,7 (promedio $6,4 \pm 0,8$), durante 10 meses en refrigeración, siendo significativamente superior ($p < 0,05$) a la de los marinados sin irradiar durante todo el período. Mientras tanto, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de la dureza de los marinados sin irradiar durante el almacenamiento en refrigeración. En los marinados, la proteólisis ácida causada por el efecto de la solución de ácido acético afecta la textura tal como fuera determinado por Yeannes & Casales (2007, 2008) en esta misma especie, y por Belitz & Grosh (1987), Feeney (1977) y Meyer (1965) en otras especies pesqueras.

Estos resultados coinciden con los hallados en *Cololabis saira* semi-seco tratado con irradiación gamma, en los que la textura (fuerza de corte) no fue alterada durante 60 días en refrigeración en las muestras irradiadas, mientras que el control se tornó más blando (Woon Lee et al., 2002).

5.2.2.6.2. Determinación instrumental de la textura de marinados irradiados con 0, 2, 3 y 4 kGy, a los 6 meses de almacenamiento

La textura de los marinados también fue determinada instrumentalmente a los 6 meses de almacenamiento en refrigeración, mediante un ensayo de corte, según la metodología descrita en el **Capítulo 3**. Los resultados de la fuerza máxima de corte y del trabajo de corte se muestran en la **Tabla 5.2.2**.

Tabla 5.2.2. Fuerza máxima de corte y trabajo de corte de los marinados de anchoíta de acuerdo a la intensidad de la dosis de irradiación, a los 6 meses de almacenamiento en refrigeración.

Dosis	Fuerza máxima de corte (N)		Trabajo de Corte (Ns)	
0 kGy	26,7 ± 3,4	B*	327,6 ± 40,4	B
2 kGy	34,0 ± 2,7	A	413,4 ± 56,3	A
3 kGy	31,1 ± 5,0	A	390,4 ± 65,3	A
4 kGy	32,0 ± 4,7	A	392,6 ± 62,7	A

* Medias ± error estándar (ee) seguidas por letras diferentes en una misma fila son significativamente diferentes.

La irradiación tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la dureza (fuerza máxima de corte) de los marinados de anchoíta, de acuerdo con lo observado en la determinación sensorial, a los 6 meses en refrigeración. Las muestras irradiadas con 2, 3 y 4 kGy presentaron una dureza al corte significativamente mayor ($p < 0,05$) a la de las muestras sin irradiar, sin que hubiera diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la dureza de las muestras irradiadas.

Los resultados instrumentales obtenidos a los 6 meses de almacenamiento, concuerdan con lo observado sensorialmente en el mismo tiempo y con resultados de diversos autores. Sobre este tema, Lescano et al. (1990) observaron un aumento de la dureza (medida físicamente) en filetes de merluza (*Merluccius hubbsi*) envasados al vacío, debido al tratamiento con 3,3 kGy de irradiación gamma. Asimismo, Yoon (2003)

observó que la fuerza de corte en pechugas de pollo cocidas irradiadas a 2,2 kGy fue significativamente mayor en las muestras irradiadas (115,6 N) en comparación con las no irradiadas (66,8 N) almacenadas durante 14 días en refrigeración. Galán et al. (2010) también encontraron que la fuerza de corte en hamburguesas irradiadas a las mismas dosis que las utilizadas en esta experiencia fue significativamente superior a la de aquellas no irradiadas, sin que hubiera diferencia entre las dosis aplicadas, al igual que fue observado en este estudio.

Esta mayor dureza observada en tejidos musculares irradiados se explicaría por la contracción del diámetro de las miofibrillas musculares provocada por la irradiación. De acuerdo a Yoon (2003), este sería el factor más contribuyente al endurecimiento de la textura. Asimismo, la irradiación produciría entrecruzamientos que al formar agregados proteicos afectan la estructura del tejido muscular de la carne (Giroux & Lacroix, 1998). Se ha observado también que la agregación proteica inducida por la irradiación a 0,3 kGy habría contribuido con el aumento de la fuerza de corte en proteína de soja (El-Monein et al., 1988).

Los cambios a nivel muscular anteriormente descritos explicarían los resultados hallados.

Asimismo, Woon Lee et al. (2002) informan no haber observado cambios en la fuerza de corte de *Cololabis saira* semi-seco debido a la irradiación gamma a 3, 5, 7 y 10 kGy, inmediatamente después de su aplicación. Sin embargo hallaron resultados similares a los de este trabajo durante el almacenamiento, ya que no observaron cambios en la fuerza de corte de las muestras irradiadas durante 60 días en refrigeración, mientras que se apreció una disminución de la misma en las muestras sin irradiar. Es posible que la degradación autolítica y química del tejido que ocurre durante el almacenamiento, con el consecuente ablandamiento del mismo, se haya visto compensada por el efecto de la irradiación sobre los tejidos descrito anteriormente, resultando entonces más duras las muestras irradiadas en comparación con el control. Estos autores expresan la necesidad de profundizar en los estudios de textura para entender la relación entre la dosis y el tiempo de almacenamiento sobre las modificaciones en la textura del producto pesquero semi-seco.

Dado que la disminución de la dureza es una de las causas de pérdida de calidad de los marinados de anchoita (Cabrer et al., 2002; Yeannes y Casales, 2007), el hecho que la irradiación posea un efecto endurecedor de la misma es sumamente

beneficioso y sería un aspecto que colaboraría en la extensión del tiempo de comercialización de este producto.

Es relevante destacar que la aceptabilidad sensorial de los marinados no sólo no se vio afectada negativamente por la mayor dureza observada debido al tratamiento de irradiación, sino que se vio favorecida comparativamente con lo que sucedió con los marinados sin irradiar. La irradiación en todas las dosis aplicadas, permitió mantener la textura de los marinados sin cambios durante 10 meses, mientras que la textura de los marinados sin irradiar presentó una tendencia a ablandarse durante la refrigeración.

Correlación entre resultados de textura determinados sensorial e instrumentalmente

Los resultados de las determinaciones de textura de los marinados de anchoíta por los métodos instrumental (medida como la fuerza máxima de corte) y sensorial (utilizando la escala establecida), realizados a los 6 meses de almacenamiento en refrigeración presentaron una correlación significativa ($R^2 = 0,951$), como se muestra en la **Figura 5.2.4**. Este resultado estaría indicando que tanto la determinación sensorial como la instrumental de la dureza son prácticamente equivalentes, lo que permitirá el uso de una u otra de acuerdo a la necesidad y circunstancias.

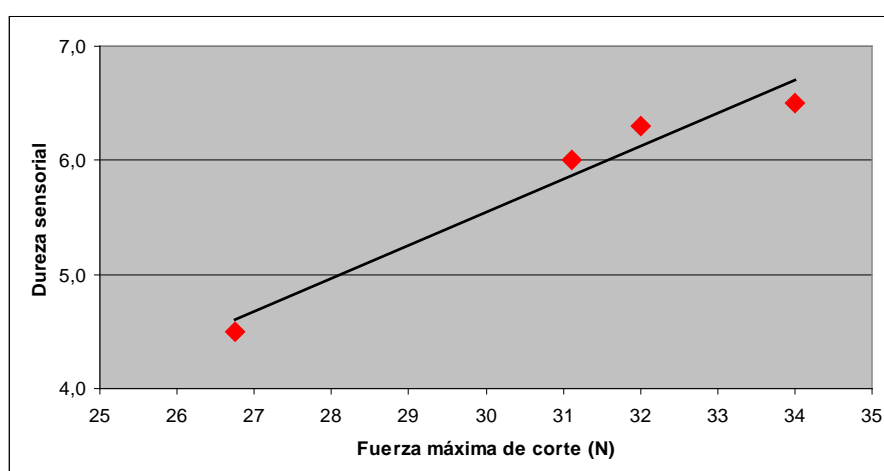
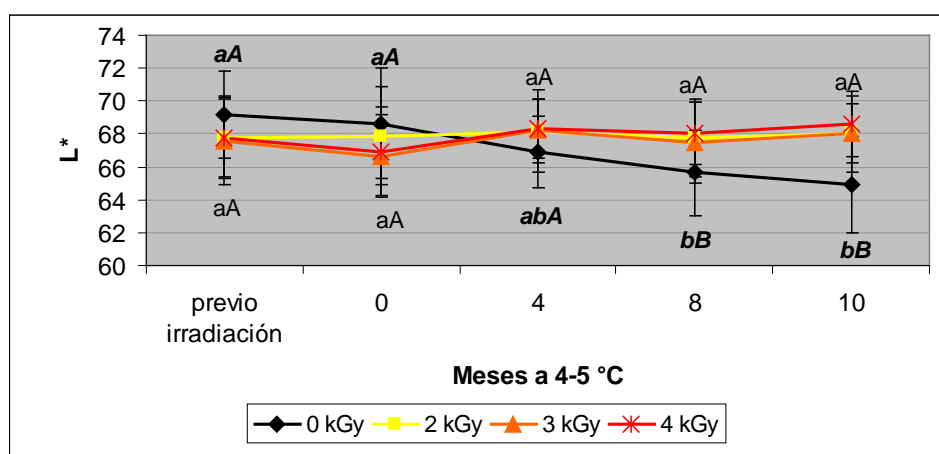


Figura 5.2.4. Relación entre los resultados de la dureza de los marinados de anchoíta determinada sensorial e instrumentalmente.

5.2.2.7. Color

En las **Figuras 5.2.5 A, B, C y D** se presentan los parámetros de color L^* , a^* , b^* y la diferencia de color (DE2000), respectivamente, de los marinados de anchoíta irradiados, durante el almacenamiento en refrigeración.

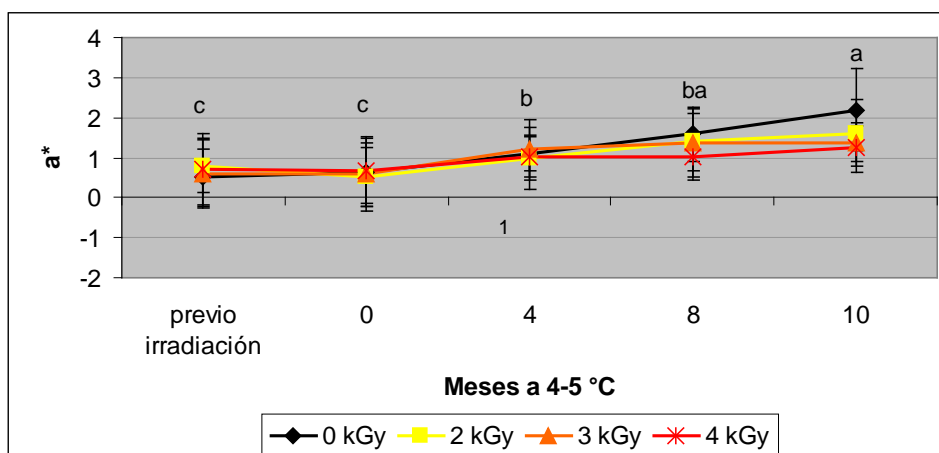
El parámetro L^* (luminosidad) se mantuvo sin cambios ($p > 0,05$) en las muestras irradiadas durante 10 meses en refrigeración, variando entre 66,66 y 68,61. En cambio, en los marinados sin irradiar se apreció una disminución significativa ($p < 0,05$) de L^* desde 69,19 hasta 64,92, durante 10 meses de almacenamiento. Este comportamiento indicaría una disminución de la luminosidad en las muestras sin irradiar, que se relacionaría con un oscurecimiento del color grisáceo/blanquecino característico, como fuera observado también durante el deterioro de marinados de *E. anchoita* (Yeannes & Casales, 1995; Yeannes et al., 2007).



Figuras 5.2.5 A. Evolución de L^* en los durante el almacenamiento a 4-5 °C. Letras minúsculas distintas (a, b, c) indican diferencias significativas debido al almacenamiento. Letras mayúsculas distintas (A, B, C) indican diferencias significativas debido a la dosis de irradiación ($p < 0,05$) (media \pm error estándar, $n=2$).

Con respecto al parámetro a^* (intensidad del color rojo), no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras debido a la dosis de irradiación durante los 10 meses de almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, se observó un incremento leve pero significativo ($p < 0,05$) en todas las muestras durante el almacenamiento, desde un valor medio $0,62 \pm 0,80$ hasta $1,62 \pm 0,83$. Este incremento podría relacionarse con el alto valor de TBARS hallado en las muestras durante el almacenamiento. En la experiencia anterior se observó una tendencia diferente, ya que a^* se mantuvo prácticamente sin cambio o bien, presentó una muy leve tendencia a

decrecer durante el almacenamiento, lo que podría atribuirse a diferencias en la calidad de la materia prima con respecto a los marinados **M7 (Sección 5.1)**.



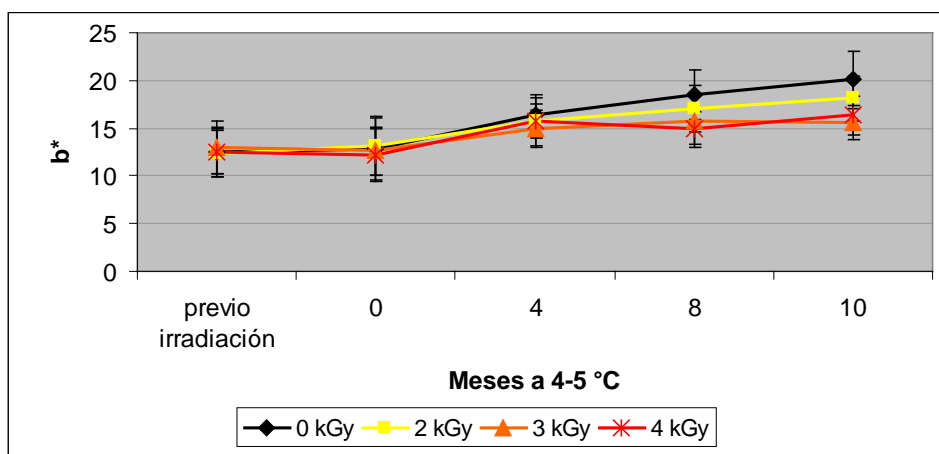
Figuras 5.2.5 B. Evolución de a^* en los durante el almacenamiento a 4-5 °C. Letras minúsculas distintas (a, b, c) indican diferencias significativas debido al almacenamiento. Letras mayúsculas distintas (A, B, C) indican diferencias significativas debido a la dosis de irradiación ($p < 0,05$) (media \pm error estándar, $n=2$).

Se puede observar que el parámetro b^* presenta una tendencia creciente ($p < 0,05$) desde un valor medio $12,58 \pm 1,92$ hasta $20,06 \pm 1,71$; $18,12 \pm 2,22$; $15,64 \pm 1,72$ y $16,32 \pm 1,18$ en los marinados sin irradiar y los irradiados con 2, 3 y 4 kGy, respectivamente. Este comportamiento es similar al de los marinados de la experiencia anterior elaborados con 7% de ácido acético y tal como se menciona en ese caso este estos incrementos han sido asociados con procesos de oxidación de lípidos, lo que se verifica con los aumentos obtenidos en los valores de TBARS (Corso et al., 2006; Thanokaew et al., 2006).

A diferencia del parámetro a^* , el efecto de la dosis fue significativo sobre b^* a partir de los 8 meses, observándose valores superiores ($p < 0,05$) en el control en comparación con las muestras irradiadas. Esto concuerda con los resultados de oxidación de lípidos, la cual fue superior en los marinados sin irradiar. Como se mencionó con anterioridad, la oxidación de lípidos en especies pesqueras se correlacionaría fundamentalmente con incrementos en el parámetro de color b^* (Lauritzsen et al., 1999; Thanonkaew et al., 2006). Se supone que los radicales hidróperóxido y los compuestos carbonilos producto de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, reaccionarían con los grupos amino libres con la consecuente condensación de pigmentos poliméricos color marrón (Pokorny, 1981). Asimismo, el contenido de lípidos de estos marinados fue superior al de la experiencia anterior, lo que puede haber provocado el mayor aumento en b^* , dado que este parámetro está relacionado con el

contenido de grasa del músculo, siendo afectado por fenómenos oxidativos (Corzo et al., 2006).

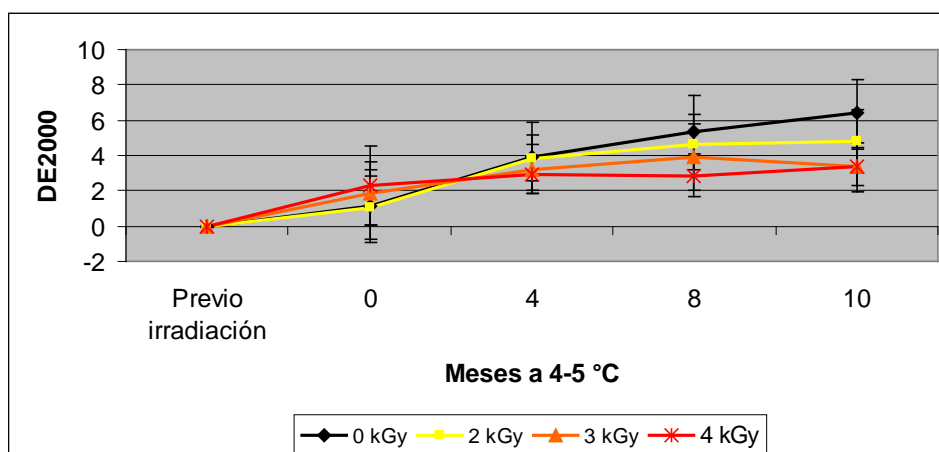
El parámetro b^* aumentó durante el almacenamiento, siendo superior en los marinados **M3** sin irradiar, en comparación con los irradiados, de acuerdo con la mayor oxidación observada en dicha muestra. Asimismo, el aumento de b^* fue más pronunciado en los marinados **M3** en comparación con los **M7**, posiblemente debido al mayor grado de oxidación observado en los mismos.



Figuras 5.2.5 C. Evolución de b^* en los durante el almacenamiento a 4-5 °C (media \pm error estándar, $n=2$).

La diferencia de color DE2000 con respecto a los parámetros antes de la irradiación aumentó significativamente ($p<0,05$) con el almacenamiento, como fuera observado en el análisis de los parámetros individuales. Asimismo, el efecto de la dosis fue significativo ($p<0,05$) sobre DE2000, hallándose valores mayores en las muestras sin irradiar y las irradiadas con 2 kGy en comparación con los marinados irradiados con 3 y 4 kGy.

La diferencia de color con respecto a los marinados antes de la irradiación aumentó durante el almacenamiento, sin que hubiera diferencias entre los marinados **M7** irradiados y sin irradiar, mientras que fue superior en los marinados **M3** sin irradiar, en comparación con los irradiados.



Figuras 5.2.5 D. Evolución de DE2000 en los durante el almacenamiento a 4-5 °C (media \pm error estándar, n=2).

La irradiación gamma a 2, 3 y 4 kGy no produjo modificaciones ($p>0,05$) en las características de color iniciales L^* , a^* y b^* de los marinados de anchoíta, al igual que fuera observado en los marinados elaborados con 7% de ácido acético y en las anillas de calamar.

Estos resultados permiten concluir que la irradiación gamma disminuyó los cambios de color asociados al deterioro durante el almacenamiento en refrigeración de marinados de anchoíta, resultando un beneficio sobre la calidad del producto final que permitiría extender el tiempo de comercialización de los mismos.

5.2.3. Conclusiones parciales

En los marinados de *Engraulis anchoita* elaborados con una solución al 3% de ácido acético no se detectaron bacterias mesófilas ni psicrótrofas, durante 10 meses de almacenamiento en vacío y refrigeración.

Se observó que la irradiación no modificó el color de los marinados y también permitió reducir los cambios de color asociados al deterioro.

Por otra parte, los marinados irradiados con 2, 3 y 4 kGy recibieron una buena aceptación entre los panelistas, sin que se observaran diferencias significativas en la aceptabilidad global, la apariencia, el color, el aroma, el sabor y la textura debido a la aplicación de la irradiación gamma. Asimismo, la aceptabilidad se mantuvo cercana a los puntajes iniciales durante 10 meses de almacenamiento.

La textura se vio modificada por el tratamiento de irradiación, observándose un aumento de la dureza debido a la misma, similar para todas las dosis. Este endurecimiento fue determinado tanto sensorial como instrumentalmente. La irradiación gamma permitió que la textura de los marinados se conservara sin cambios durante 10 meses en refrigeración, mientras que se observó un ablandamiento en las muestras sin irradiar producto del deterioro durante el almacenamiento, dando por resultado entonces un efecto beneficioso de este tratamiento sobre la calidad del producto.

La irradiación podría entonces aplicarse en los marinados de *Engraulis anchoíta*, pudiéndose disminuir las restantes barreras de marinación utilizadas o almacenando a temperatura ambiente, ya que los resultados obtenidos en esta tesis permitirían adelantar que las características sensoriales no se verían afectadas negativamente por la irradiación gamma y generaría la extensión del tiempo de comercialización de este producto marinado.

Asimismo, la irradiación podría esterilizar las larvas de nematodos de *Anisakis simplex* que usualmente parasitan a *Engraulis anchoíta* permitiendo prescindir del congelado previo de la materia prima, según establece la Comunidad Europea (CE, 1995).

5.4. Conclusiones generales del Capítulo 5

Las experiencias descritas permiten concluir que fue factible analizar el efecto de la irradiación gamma sobre las características microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales de filetes de *Engraulis anchoíta* marinados con NaCl y distintas concentraciones de ácido acético (3 y 7 % p/v), envasados al vacío, durante el almacenamiento en refrigeración.

A partir de los resultados hallados se pueden inferir las siguientes conclusiones:

- ▲ La irradiación gamma redujo la población de bacterias mesófilas en marinados **M7**, mejorando su calidad microbiológica, si bien los marinados sin irradiar presentaron una buena estabilidad durante 20 meses en refrigeración, superando ampliamente la vida útil del producto estimada en 6 meses por los organismos de control. Los resultados presentados en esta tesis efectúan un aporte en este sentido, dado que son resultados experimentales que permitirán analizar la conveniencia de determinar el tiempo de comercialización de estos productos sobre pautas científico-tecnológicas.
- ▲ En los marinados elaborados con una solución con 3 % de ácido acético no se detectó presencia de ningún microorganismo investigado, previo al tratamiento de irradiación, ni durante 10 meses en refrigeración, dado que las bacterias presentes en la materia prima no sobrevivieron al efecto preservativo de la marinación. Se puede decir que la calidad y composición de la materia prima fue un factor muy influyente sobre los resultados hallados.
- ▲ El comportamiento del índice químico NBVT, indicador de la pérdida de frescura, estuvo de acuerdo con los resultados microbiológicos. En los marinados **M7** se apreció una disminución de la producción de NBVT en las muestras irradiadas, que se condice con la reducción radio inducida de la población bacteriana, mientras que en los marinados **M3** la producción de NBVT no se vio afectada por la irradiación, debido a la ausencia de microorganismos en los marinados irradiados y sin irradiar.
- ▲ El contenido de lípidos fue diferente en las partidas de marinados y determinó en gran medida la diferencia de estabilidad química de los mismos frente a los procesos oxidativos durante el almacenamiento y debido a la irradiación. Los marinados que presentaron un mayor porcentaje de lípidos fueron los más susceptibles a la oxidación durante el almacenamiento, como fuera observado en

los marinados **M3**. Además, se observó un menor valor de TBARS en los marinados irradiados en comparación con el control.

- ▲ La irradiación gamma no produjo modificaciones en el color característico de ambas partidas de marinados. Sin embargo, se observaron cambios en los parámetros de color asociados al deterioro durante el almacenamiento en refrigeración, que fueron menores en los marinados **M3** irradiados en comparación con el control.
- ▲ La irradiación gamma produjo un leve endurecimiento de la textura, el cual fue determinado mediante análisis sensorial e instrumental, hallándose una correlación positiva entre estos resultados. Asimismo, la dureza de los marinados irradiados se mantuvo sin cambios durante 10 meses en refrigeración, mientras que las muestras sin irradiar se tornaron más blandas. Por estos motivos, la aplicación de la irradiación sería beneficiosa para mantener la textura de los marinados y evitar el ablandamiento debido al deterioro durante el almacenamiento.
- ▲ Los marinados irradiados fueron bien aceptados entre los panelistas del panel piloto. La aceptabilidad global y la aceptabilidad de la apariencia, color, aroma, sabor y textura no fue afectada por la irradiación gamma a 2, 3 y 4 kGy, y se mantuvo durante 10 meses en refrigeración.
- ▲ Ambas partidas de marinados presentaron una vida útil superior a la del producto típico, incluso sin la aplicación de la irradiación. Este hecho pone de manifiesto la posibilidad de utilizar otras intensidades en las barreras de reservación. Por ejemplo, se podría disminuir la intensidad de la acidez en la solución de marinación, o bien, aumentar la temperatura de almacenamiento, consiguiendo mediante la aplicación de la irradiación gamma desarrollar un producto estable a temperatura ambiente, para lo que se requerirán posteriores estudios relacionados con análisis microbiológico de reto microbiano. Esto último, resulta de sumo interés para su investigación y desarrollo futuro, considerando la importancia que reviste para la industria pesquera que un producto pueda prescindir del almacenamiento y transporte en refrigeración, con el aseguramiento de la inocuidad y la reducción de costos que esto implica.

CAPÍTULO 6

**CONCLUSIONES
GENERALES**

6. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados hallados en esta tesis permitieron cumplir con los objetivos planteados, ya que se pudo analizar desde un enfoque multidisciplinario el efecto de la irradiación gamma en dos productos pesqueros diferentes: anillas de calamar *Illex argentinus* frescas y filetes de anchoíta *Engraulis anchoita* marinados.

Con respecto a las anillas de calamar frescas:

- Se pudo observar el efecto biocida de la irradiación sobre las flora psicrótrofa deteriorante, la flora mesófila, enterobacterias, coliformes y *Staphylococcus spp.* La inactivación de estos grupos bacterianos durante el almacenamiento en refrigeración permitió extender la vida comercial de las anillas, y retrasar los cambios asociados con el deterioro, determinados mediante el pH, el NBVT y el color.
- La irradiación no indujo cambios en el color característico de las anillas, y permitió lentificar los cambios de color asociados al deterioro durante el almacenamiento refrigerado.
- Las anillas irradiadas fueron muy bien aceptadas por los panelistas, quienes no detectaron diferencias en sus características sensoriales en comparación con las anillas sin irradiar. A su vez, la irradiación posibilitó extender el tiempo de aceptabilidad sensorial durante el almacenamiento.
- En base a estos resultados se pudo determinar una dosis mínima de irradiación de 4 kGy, la cual permitió extender la vida comercial de las anillas, sin modificar su aceptabilidad sensorial. A su vez, se corroboró que las mismas fueron sensorialmente aceptables al ser irradiadas con 8,4 kGy, considerando la posible dispersión de dosis autorizada por el CAA.
- Se pudo comprobar la factibilidad práctica de extender el tiempo de comercialización de las anillas de calamar refrigeradas en más de 5 veces en comparación con las muestras sin irradiar, mediante la irradiación gamma a 4 kGy, sin modificar su aceptabilidad sensorial, incluso si la dispersión de dosis es tal que las muestras puedan recibir hasta el doble de esta dosis.

- Este resultado, además de demostrar la factibilidad de obtener un producto fresco de calamar con una vida útil extendida y aceptable sensorialmente, reviste importancia para la industria, ya que se estaría incrementando en 25 días el tiempo de comercialización de las anillas de calamar, lo cual es significativo tratándose de un producto tan perecedero, cuya vida útil no suele superar los 8-10 días en refrigeración.
- Los resultados hallados también permitieron concluir que los cambios sensoriales más importantes durante el deterioro de las anillas de calamar están relacionados con la formación de manchas de color rosado en el músculo y con la aparición de olores amoniacales y pútridos intensos.
- A su vez, el límite microbiológico establecido por la ICMSF con respecto a la población psicrótrofa de pescado o molusco refrigerado coincidió con la evidencia sensorial del deterioro, pudiendo considerarse el mismo como representativo del máximo aceptable para este producto.
- Se comprobó que la irradiación de anillas de calamar tratadas con polifosfatos y envasadas al vacío, como son usualmente procesadas en la industria y comercializadas, fue útil para incrementar su vida comercial.
- En las anillas tratadas con polifostafó se observó una menor inactivación bacteriana por la irradiación, atribuible a la ausencia de oxígeno en el envase.
- Se modeló matemáticamente la inactivación de la flora psicrótrofa causada por la irradiación en anillas de calamar, así como el comportamiento de la flora sobreviviente durante la refrigeración mediante dos modelos diferentes. El modelo que predijo con más precisión los recuentos microbianos fue seleccionado para desarrollar un modelo completo que permita estimar la vida comercial de anillas de calamar cuando son tratadas con irradiación gamma. Para ello, los parámetros de dicho modelo fueron ajustados a expresiones polinomiales de segundo orden en función de la dosis de irradiación. Por lo tanto, se desarrolló un modelo que permite predecir la vida útil en refrigeración de anillas de calamar en función de la dosis de irradiación. Este desarrollo es un aporte relevante tanto para el

conocimiento sobre la temática tratada, como para la transferencia tecnológica a la industria, ya que permite hacer estimaciones de la vida útil microbiológica alcanzada por un producto fresco de calamar, sin que sea necesario repetir ensayos preliminares de irradiación.

- También fue posible modelar el comportamiento de un índice químico del deterioro (NBVT, bases nitrogenadas volátiles) durante la refrigeración de las anillas, en función de la dosis de irradiación.

Con respecto a los marinados de anchoíta:

- Se observó una inactivación de la flora típica inducida por la irradiación en marinados elaborados con solución de ácido acético al 7%, que llevó a una disminución de los cambios provocados por el deterioro, como la generación de bases nitrogenadas volátiles y la oxidación de lípidos, durante 20 meses en refrigeración.
- Si bien la irradiación gamma redujo la población de bacterias mesófilas en marinados **M7**, mejorando su calidad microbiológica, los marinados sin irradiar resultaron estables durante 20 meses en refrigeración, superando ampliamente la vida útil del producto estimada en 6 meses por los organismos de control. Los resultados presentados en esta tesis efectúan un aporte en este sentido, dado que son resultados experimentales que permitirán analizar la conveniencia de determinar el tiempo de comercialización de estos productos sobre pautas científico-tecnológicas.
- Se irradiaron marinados elaborados con una solución con 3% de ácido acético, observándose que no hubo desarrollo bacteriano en los marinados irradiados o sin irradiar durante 10 meses en refrigeración.
- Los resultados demostraron que las características sensoriales de los marinados elaborados con 3% de ácido acético irradiados fueron bien aceptadas entre los panelistas. A su vez, la aceptabilidad sensorial de este producto no se vio afectada por la aplicación de irradiación gamma con 2, 3 y 4 kGy, y se mantuvo durante 10 meses en refrigeración.

- Con respecto a la textura de los marinados irradiados, se determinó sensorialmente un leve pero interesante aumento de la dureza causado por la irradiación, la cual se mantuvo sin cambios durante 10 meses, mientras que la misma se tornó mas blanda en aquellos marinados sin irradiar a medida que avanzó el tiempo de almacenamiento. Por lo tanto, desde este enfoque, la irradiación aportaría un efecto beneficioso para el producto. Este comportamiento de la textura fue determinado sensorial e instrumentalmente, hallándose una alta correlación entre los datos.
- Al igual que en las anillas de calamar, el color de los marinados de anchoíta no fue afectado por la aplicación de esta tecnología, la cual también permitió retrasar los cambios en dicho parámetro durante el almacenamiento.
- Se observó que el mayor contenido de lípidos de los marinados elaborados con 3% de ácido acético en comparación con los elaborados con el 7% influyó sobre la oxidación de lípidos, la cual fue más importante en los primeros. Asimismo, en ninguna de las experiencias se observó un aumento del valor de TBARS por irradiación en comparación con el control. Además, se observaron menores valores de TBARS en los marinados irradiados con respecto al control, lo que podría atribuirse a la inactivación de la flora bacteriana, a la formación de sustancias protectoras por la irradiación o a la destrucción del MDA causada por la misma. Definir específicamente este aspecto del tema podría ser un interesante desafío a futuro, pero estuvo fuera del abordaje de este trabajo de tesis.
- El análisis de la evolución de NBVT en los marinados y en los marinados irradiados pueden servir de base para futuros estudios que permitan fijar los límites para estos productos. Actualmente, aún no se ha establecido el valor máximo aceptable de NBVT para los marinados sin irradiar.
- Si bien los marinados de anchoíta sin irradiar resultaron ser productos estables, se plantea la posibilidad de disminuir la intensidad de las barreras preservativas, como la acidez y la actividad de agua, en la formulación del producto, o de modificar la temperatura de almacenamiento, analizando la posibilidad de desarrollar un producto estable a temperatura ambiente.

Además, la irradiación podría aplicarse para esterilizar larvas de *Anisakis simplex* que suelen parasitar la especie *Engraulis anchoita*, pudiendo prescindir de la etapa de congelación de la materia prima.

Los resultados de todas las experiencias aquí detalladas permiten concluir que fue factible aplicar la irradiación gamma en dos productos pesqueros diferentes, como lo es un producto a partir de un molusco fresco y un marinado a partir de un pescado graso, con resultados satisfactorios en cuanto a la inactivación microbiana con el consecuente retraso del deterioro, y a la aceptabilidad sensorial de los productos así desarrollados.

Se considera que los resultados de este trabajo son de suma relevancia para el avance y la difusión de la irradiación de alimentos, específicamente de productos pesqueros. Se espera que los resultados obtenidos realicen un aporte al conocimiento en este tema y que los productos desarrollados sean incorporados a la lista positiva de alimentos para irradiar por parte de las autoridades competentes, contribuyendo al aumento de nuevos productos con mayor valor agregado y una vida comercial más extensa, que puedan abastecer la demanda de distintos mercados a nivel nacional e internacional.

Se espera por lo tanto poder llevar a cabo la transferencia tecnológica hacia el sector industrial pesquero, tan relevante para la economía de la ciudad de Mar del Plata y del país, haciendo de la irradiación gamma una opción no sólo atractiva sino también innovadora para el mismo.

Asimismo, como perspectivas a futuro se pone en evidencia que este trabajo de tesis abrió un abanico de temas que pueden ser analizados con mayor profundidad, como pueden ser el efecto de la irradiación sobre oxidación de lípidos y los métodos de determinación de la misma, así como las modificaciones radio-inducidas en la textura de estos productos.

Por lo tanto, se pone de manifiesto el interés y el compromiso de continuar durante el desarrollo de la instancia post-doctoral de la tesista (CONICET) con el estudio del efecto de la irradiación sobre la textura del manto de calamar crudo y cocido, a fin de continuar con el aporte de esta tesis.

Bibliografía

Ackman, R.G. (1980). Fish lipids. Part 1. In: J. J. Connell (ed.) *Advances in fish science and technology*, Fishing News (Books) Ltd., Farnham, Surrey, 86-103.

ADA (2000). Position of the American Dietetic Association: food Irradiation. *Journal of the American Dietetic Association*, 100, 246–253.

Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R. & García de Fernando, G.D. (2011). Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms. *Int J Food Microbiol*, 149, 236–246.

Anderson, D.W. Jr. & Fellers, C.R. (1952). The occurrence of trimethylamine and trimethylamine oxide in fresh water fishes. *Food Res.* 17, 472-474.

Arvanitoyannis, I.S. & Stratakos, A.Ch. (2010). Effect of Irradiation on Fish and Seafood. In *Irradiation of Food Commodities* (pp. 287-365). Academic Press. London, UK.

Association of Official Analytical Chemists, AOAC. (1993). *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Washington.

ASTM. American Society for Testing and Materials. (1968). *Manual on Sensory Testing Methods*. ASTM Special Technical Publication 434. Philadelphia. USA.

Badr, H.M. (2012). Control of the potential health hazards of smoked fish by gamma irradiation. *Int J Food Microbiol*, 154, 177–186.

Baird-Parker, A. C. (1980). Organic acids. In ICMSF. *Microbial ecology of foods* (pp. 126–135). New York: Academic Press.

Barbosa-Cánovas, G.B., Pathakamury, U.R., Palou, E. & Swanson, B.G. (1998). *Conservación no térmica de alimentos*. Editorial Acribia S.A. Saragoza, España. ISBN: 84-200-0888-5. Pag: 161- 216.

Bassen, M., Gupta, L., Jolly, L. & Tewari, R. (1989). Thermal resistance of *Bacillus cereus* spores in custard preparations. *World J Microb Biot*, 5, 515–516.

Belinske, E. (1964). Biosynthesis of trimethylammonium compounds in aquatic animals. 4. Precursors of trimethylamine oxide and betaine in marine teleosts. *J. Fish. Res. Board Can.*, 21. 765-771.

Belitz, H.D. & Grosch, W. (1987). *Química de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia, p. 33-69.

Benedito, J., Cambero, M.I., Ortuño, C., Cabeza, M.C., Ordoñez, J.A. & de la Hoz, L. (2011). Modeling and optimization of sensory changes and shelf-life in vacuum-packaged cooked ham treated by E-beam irradiation. *Radiat Phys Chem*, 80, 505–513.

Bligh, E.G., & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem*, 37: 911–917.

Botsoglou, NA., Fletouris, DJ., Papageorgiou, GE., Vassilopoulos, VN., Mantis, AJ. & Trakatellis, AG. (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *J Agr Food Chem*, 42 (9), 1931–1937.

Botta, J.R., Downey, A.P., Lauder, J.T. & Noonan, P.B. (1979). Preservation of raw whole short-finned squid (*Illex illecebrosus*) during the period from catching to processing: Skin color of raw squid and sensory quality of the subsequently cooked squid. *Fish. Mar. Servo Tech. Rep.855: VI q 21 p.*

Brewer, M.S. (2009). Irradiation effects on meat flavour: A review. *Meat Science*, 81, 1-14.

Brunetti, N.E., Ivanovic, M.L. & Sakai, M. (1999). Calamares de importancia comercial en la Argentina. Biología, distribución, pesquerías, muestreo biológico. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Mar del Plata. Argentina. 45 p.

Buchanan, R.L., Edelson-Mammel, S.G., Boyd, G. & Marmer, B.S. (2004) Influence of acidulant identity on the effects of pH and acid resistance on the radiation resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.*, 21, 51–57.

Byun Myung-Woo, Lee Kyong-Haeng, Kim Dong-Ho, Kim Jae-Hun, Yook Hong-Sun & Ahn Hyun-Joo. (2000). Effects of gamma radiation on sensory qualities, microbiological and chemical properties of salted and fermented squid. *J Food Protec*, 63, (7), 934-939.

CAA. (2012). Código Alimentario Argentino. Capítulo 3. Visitado en Noviembre 2012. Disponible en:http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_III.pdf

Cabrer, A.I., Casales, M.R. & Yeannes, M.I. (2002). Physical and chemical changes in Anchovy (*Engraulis anchoita*) flesh during marination. *J Aquatic Food Product Technology*, 11 (1), 19-30.

Capaccioni, M.E., Casales, M.R. & Yeannes, M.I. (2011). Acid and salt uptake during the marinatio process of *Engraulis anchoita* fillets. Influence of the solution:fish ratio and agitation. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 31(4) 884-890, out.-dez. 2011.

Carrero, JJ; Martín-Bautista, E; Baró, L; Fonollá, J; Jiménez, J; Boza, JJ & López-Huertas, E. (2005). Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutrición Hospitalaria*, 20 (1), 63-69.

Carver, J.H., Connors, T.J. & Slavin, J.W. (1969). Freezing and irradiation of fish. *Fishing News (Books)*. LTD. London, 509-513.

Castro, G., Valbuena, E., Sánchez, E., Briñez, W., Vera, H. & Leal, M. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*. *Revista científica*, XVIII (5), 582-588.

CE (1991). Regulación del Consejo de la Comunidad Europea No. 91/493/EEC, del 22/07/1991, laying down the health conditions for the production and the placing on the market of fishery products. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31993D0140:ES:HTML>

CE (1995). Regulación del Consejo de la Comunidad Europea No. 95/149/EEC. Commission Decision of 8 March, 1995 fixing the total volatile basic nitrogen (TVB-N) limit values for certain categories of fishery products and specifying the analysis methods to be used. *Official Journal of the European Communities*, L 097, 29/04/1995, pp. 0084–0087.

Chiodi, R.O. (1970). Composición química inmediata de la anchoíta (*E. anchoita*) Variaciones estacionales y en regiones del individuo. Documento Informativo Proyecto Desarrollo Pesquero Mar del Plata. Argentina 7, 1-13.

Chouliara, I., Savvaidis, I.N., Panagiotakis, N. & Kontominas, M.G. (2004). Preservation of salted, vacuum-packed, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets by irradiation: microbiological, chemical and sensory attributes. Food Microbiol, 21, 351-359.

Ciarlo, AS, Boeri, RL & Giannini, DH. (1985). Storage life of frozen blocks of Patagonian hake (*Merluccius hubbsi*) filleted and minced. J Food Sci. 50: 722-726.

Ciarlo, A.S. Almandós, M.E., Boeri, R., Paredi, M.E., Yeannes, M.I. & Giannini, D.H. (1987). Incremento en el contenido de Bases Volátiles Totales (NBV) debido al proceso de congelación de merluza (*M. hubbsi*). Revista de Ciencias Agrarias. Argentina. julio-diciembre 1987. Vol VIII. Nº 3. p 29-33.

CIE. (1978) Recommendations on uniform colour spaces, colour difference equations, psychometric colour terms. CIE publication No.15 (E.-1.3.1) 1971, Supplement No.2. Viena.

CIE. (2001). CIE 142-2001. Improvement to industrial colour-difference evaluation. Commission Internationale de L'Eclairage. 15 pp. ISBN: 9783901906084.

Civera, T., Grassi, M.A. & Pattono, D. (1999). Caratteristiche chimiche e microbiologiche di molluschi cefalopodi nel corso Della conservazione. Industrie alimentari, 38, 933-937.

Civille, G.V. & Szczesniak, A.S (1973). Guidelines to training a texture profile panel. J Texture Stud, 4, 204-223.

CNEA. (2011). Irradiación de Alimentos. <http://caebis.cnea.gov.ar/aplicaciones/alim/lrra1.html>. (Visitado en Marzo 2012).

Codex Alimentarius. (2003a). Codex General Standard for Irradiated Foods. 106-1983, Rev. 1-2003, Roma.

Codex Alimentarius (2003b). Recommended International Code of Practice for Radiation Processing of Foods. CAC/RCP 19- 1979, Rev 2- 2003.

Coll Cárdenas, F., Giannuzzi, L., Noia, M.A. & Zaritzky, N. (2001). El modelado matemático: Una herramienta útil para la industria alimenticia. *Ciencia Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam*, 22-28.

Connell, J.J. (1975). Control of Fish Quality. Fishing News Books, Blackwell Scientific Publications, London.

Corzo, O. & Bracho, N. (2006). Application of Peleg model to study mass transfer during osmotic dehydration of sardine sheets. *J Food Eng.* 75 (4), 535-541.

Curia, A.V., Hough, G., Martínez, M.C., & Margalef, M.I. (2001). How Argentine consumers understand the Spanish translation of the 9-point hedonic scale. *Food Quality and Preference*, 12, 217-221.

Dalgaard, P. (2003). Predictive Microbiology. In *Assessment and Management of Seafood Safety and Quality*. FAO Fisheries Technical Paper 444. <http://www.fao.org/docrep/006/y4743e/y4743e0o.htm>.

Dalgaard, P., Mejlholm, O., Christiansen, T.J. & Huss, H.H. (1997). Importance of *Photobacterium phosphoreum* in relation to spoilage in modified atmosphere-packed fish products. *Lett appl Microbiol*, 24: 373.

del Valle, C.E., Filsinger, B.E., Yeannes, M.I. & Soulé, C.L. (1984). Shelf life of brine refrigerated anchovies (*E. anchoíta*) for canning. *J Food Sci*, 49, 180-182.

Dickson, J.S. (2001). Radiation inactivation of microorganisms. En: *Food Irradiation: Principles and Applications*. (Ed.: Molins, R.A.). John Wiley & Sons.

Diehl, F.J (1983). Radiolytic effects in food. En: *Preservation of Food by Ionizing Radiation*. Eds.: Josephson, E.S. & Peterson, M.S. CRC Press, Boca Ratón, Estados Unidos. Vol I, Capítulo X, 279 – 358.

Diehl, J.F. (2002). Food irradiation – past, present and future. *Radiat Phys Chem*, 63, 211–215.

Dragonetti Saucero, J.P. (2008). Guía ilustrada para la evaluación de la frescura. Facultad de Veterinaria- Universidad Nacional de Uruguay. ISBN: 978-9974-0-0481-8. pp: 51.

El-Marrakchi, A., Bouchriti, N., Bennour, M. & Hamama, A. (1992). The bacteriology of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. I. Nature of bacterial flora. *Microbiol Alim Nutr*, 10, 61.

El-Moneim, A., Afify, M.R. & Shousha, M.A. (1988). Effect of low dose irradiation on soybean protein solubility, trypsin inhibitor activity, and protein patterns separated by polyacrilamide gel eletrophoresis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 36, 810-813.

Erkan, N. & Özden, Ö. (2007). The changes in fatty acid and amino acid composition in sea bream (*Sparus aurata*) during irradiation process. *Radiat Phys Chem*, 76, 1636-1641.

Farkas, J. (2006). Irradiation for better foods. *Trends Food Sci Tech*, 17, 148-152.

FDA (2001). Packaging materials approved for use in the irradiation of prepackaged food. U.S. Food and Drug Administration. USA Code of Federal Regulation, 21, 3.

Feeney, R.E. (1977). Chemical changes in food proteins. In: *Evaluation of Proteins for Humans*. Bodwell, C. E. (Ed.). Connecticut: The AVI Publishing Company, Inc. p. 233-251.

Foley, D.M. (2006). Irradiation of Seafood with a particular emphasis on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products. Chapter 11, In *Food Irradiation Research and Technology*. Eds. Sommers, Ch. H. & Xuetong Fan. IFT Press. Blackwell Publishing.

Francis, F. J. (1995). Quality as influenced by color. *Food Qual Prefer*, 6, 149–155.

Fakruddin, Md., Reaz Mohammad Mazumder & Khanjada Shahnewaj Bin Mannan. (2011). Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science*, 40 (2), 121-131.

Fuselli, S.R., Casales, M.R., Fritz, R. & Yeannes, M.I. (1994). Microbiology of the marination process used in anchovy (*Engraulis anchoita*) production. *LWT – Food Science and Technology*, 27, 214-218.

Fuselli, S.R., Casales, M.R., Fritz, R. & Yeannes, M.I. (1998). Isolation and characterization of microorganisms associated with marinated anchovy (*Engraulis anchoita*). *J Aquatic Food Prod Technology*, 7 (3), 29-38

Galán, I., García, M.L. & Selgas, M.D. (2010). Effects of irradiation on hamburgers enriched with folic acid. *Meat Science*, 84, 437–443.

Galati, S., Gianuzzi, L. & Giner, S.A. (2011). Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of *Aspergillus parasiticus* on irradiated Argentinian flint maize. *J Stored Prod Res*, 47, 1-7.

Giannini, D.H., Davidovich, L.A. & Lupín, H.M. (1979). Adaptación del método comercial para la determinación de Nitrógeno básico Volátil en merluza (*Merluccius hubbsi*). *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 19, 55–60.

Gianuzzi, L., Pinotti, A. & Zarizky, N. (1998). Mathematical Modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *Int J Food Microbiol*, 39, 101-110.

Gibson, A.M. & Roberts, T.A. (1989). Predicting microbial growth: Development of a mathematical model to predict bacterial growth responses. *Food Australia*, 41, 1075-1079.

Giroux, M. & Lacroix, M. (1998). Nutritional adequacy of irradiated meat-a review. *Food Res Int*, 31, 257-264.

Gökoglu, N., Cengiz, E. & Yerlikaya, P. (2004). Determination of the shelf-life of marinated sardine (*Sardina pilchardus*) stored at 4 °C. *Food Control*, 15, 1-4.

Goldblith, S.A. (1971). The inhibition and destruction of the microbial cell by radiation. In Hugo, W.B (Ed.), *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell* (pp. 285-305). Academic Press. London.

- Gram, L. & Dalgaard, P.** (2002). Fish spoilage bacteria- problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 262-266.
- Gram, L. & Huss, H.H.** (1996). Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas sp* and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *J Appl Bacteriol*, 80: 589.
- Gram, L. & Huss, H.H.** (2000). Fresh and processed fish and shellfish. En: *The microbiological safety and quality of foods*. Editado por Lund, M.B., Baird-Parker, A.C. & Gould, G.W. Londres: Chapman & Hall, 472-506.
- Green, B.E. & Watts, B.M.** (1966). Lipid oxidation in irradiated cooked beef. *Food Technol*, 20(8), 111-114.
- Grecz, N., Rowley, D.B. & Matsuyama, A.** (1983). The Action of Radiation on Bacteria and Viruses. En: *Preservation of Food by Ionizing Radiation*. Eds.: Josephson, E.S. & Peterson, M.S. CRC Press, Boca Ratón, Estados Unidos Vol. II, 167 -218.
- Günsen, U., Özkan, A. & Aydm, A.** (2011). Determination of some quality criteria of cold stored marinated anchovy under vacuum and modified atmosphere conditions. *Turkish J Fisheries Aquatic Sci*, 11, 233-242.
- Hallman, G.J.** (2011). Phytosanitary applications of irradiation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Technology*, 10, 143-151.
- Hansen, JE.** (2000). Anchoíta (*Engraulis anchoita*). En: *Síntesis del Estado de las Pesquerías Marítimas Argentinas y de la Cuenca del Plata. Años 1997-1998, con una actualización de 1999*. Ed: Bezzi, S; Akselman, R; Boschi, EE. Publicaciones especiales. INIDEP, Mar del Plata, 388 p.
- Heath, J. L., Owens, S. L., Tesch, S., & Hannah, K. W.** (1990). Effect of high-energy electron irradiation of chicken meat on thiobarbituric acid values, shear values, odor, and cooked yield. *Poultry Science Journal*, 69(2), 313–319.
- Hebard, C.E., Flick, G.J. & Martin, R.E.** (1982). Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. In: R.E. Martin, G.J. Flick

and C.E. Hebard (eds.), Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products, AVI, Westport, CT, USA, 149-304.

Huang, L. (2010). Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 in mechanically-tenderized beef. *Int J of Food Microbiol*, 140, 40-48.

Huss, H.H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical Paper - 348. Food and agriculture organization of the United Nations. <http://www.fao.org/docrep/V7180E/V7180e09.htm>

Huss, H.H. (1999). El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. FAO Fisheries Technical Paper - 348. Food and agriculture organization of the United Nations. <http://www.fao.org/docrep/V7180S/V7180S00.HTM>

Hussain, A.M., Chaudry, M.A. & Haq, I. (1985) Effect of low doses of ionizing radiation on shelf-life of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*). *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 18, 273-276.

Hylding, G. & Nielsen, D. (2001). A review of sensory and instrumental methods used to evaluate the texture of fish muscle. *J texture studies*, 32, 219-242.

IAEA. (1969). Preservation of Fish by Irradiation. Panel Proceedings Series - International Atomic Energy Agency, 26. Viena.

IAEA. (2000). Irradiation of fish, shellfish and frog legs. En: A compilation of technical data for authorization and control. International Atomic Energy Agency. Viena.

ICGFI. (1999). Facts about food irradiation. International Consultative Group on Food Irradiation. Joint FAO/ IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. International Atomic Energy Agency. <http://www.iaea.org/Publications/Booklets/foodirradiation.pdf>. Visitado en Enero 2009.

ICMSF. (1983). Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico. Ed. Acribia. España.

ICMSF. (1983). Microorganismos de los alimentos 2. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. Ed. Acribia. España.

IRAM (2003). Buenas Prácticas de Procesamiento para la Irradiación de Alimentos destinados al Consumo Humano. Norma 20.301, Instituto Argentino de Normatización (IRAM), Buenos Aires, Argentina.

Jacquot, R. (1961). Organic constituents of fish and another aquatic animal foods. En Borgstrom, G. (Ed.). Fish as Food. Vol I, pp:144. Academic Press, New York, USA.

Jay, J. M. (2000). Modern food microbiology (6th ed.). Gaithersburg, MD, USA: Aspen Publishers, Inc.

Jeevanandam, K., Kakatkar, A., Doke, S.N., Bongirwar, D.R. & Venugopal, V. (2001) Influence of salting and gamma irradiation on the shelf-life of threadfin bream in ice. Food Res Int, 34, 739-746.

Josephson, E.S. (1983). Preservation of Food by Ionizing Radiation. Eds.: Josephson, E.S. & Peterson, M.S. CRC Press, Boca Ratón, Estados Unidos.

Josephson, E.S., Thomas, M.H. & Calhoun, W.K. (1978). Nutritional aspects of food irradiation: an overview. J Food Process Pres, 2, 299–313.

Kanatt, S.R., Chawla, S.P., Chander, R. & Sharma, A. (2006). Development of shelf-stable, ready-to-eat (RTE) shrimps (*Penaeus indicus*) using gamma irradiation as one of the hurdles. LWT – Food Science and Technology, 39, 621-626.

Kasimoglu, A., Denli, E. & Erhan, I. (2003). The extension of the shelf-life of sardine which were packaged in a vacuum stored under refrigeration, and treated by gamma irradiation. Int J Food Sci Technol, 38, 529-535.

Ke, P., Burns, B.G. & Woyewoda, A.D. (1984). Recommended procedures and guidelines for quality evaluation of atlantic short-fin squid (*Illex illecebrosus*). Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 24, 328-333.

Kilcast, D. (1995). Food irradiation: Current problems and Future Potential. Int Biodeter Biodegr, 39, 279-296.

Kilinc, B. & Cakli, S. (2004). Chemical, microbiological and sensory changes in thawed frozen fillets of sardine (*Sardina pilchardus*) during marination. *Food Chem*, 88, 275-280.

Kim, Hyunjoo, Ji-Hyoung Ha, Ju-Woon Lee, Cheorun Jo & Sang-Do Ha. (2012). Synergistic effect of ionizing radiation on chemical disinfectant treatments for reduction of natural microflora on seafood. *Radiat Phys Chem*, 81, 1091-1094.

Kirk, R.S., Sawyer, R. & Egan, H. (1996). Composición y análisis químico de los alimentos de Pearson. Compañía Editorial Continental S.A de C.V., México.

Kodo, J.L. (1990). L'ionisation des produits de la pêche. Collection « Valorisation des produits de la mer » ISBN11 2905434260. Ifremer. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/649/>. Visitado en Enero 2012.

Kosugi, H., Kato, T., & Kikugawa, K. (1987). Formation of yellow, orange, and red pigments in the reaction of alk-2-enals with 2-thiobarbituric acid. *Anal. Biochem.*, 165, 456-464.

Kume, T., Furuta, M., Todoriki, S., Uenoyama, N. & Kobayashi, Y. (2009). Status of food irradiation in the world. *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 222–226.

Lakshmanan, R., Venugopal, V., Venketashvaran, K. & Bongirwar, D.R. (1999). Bulk preservation of small pelagic fish by gamma irradiation: studies on a model storage system using Anchovies. *Food Res Int*, 32, 707-713.

Lapa-Guimarães, J., Azevedo da Silva, M.A., de Felício, P. E. & Contreras Guzmán, E.S. (2002). Sensory, colour and psychrotrophic bacterial analyses of squid (*Loligo plei*) during storage in ice. *Lebensm Wiss Technol*, 35, 21-29.

Lapa-Guimarães, J., de Felício, P. E. & Contreras Guzmán, E. S. (2005). Chemical and microbial analyses of squid muscle (*Loligo plei*) during storage in ice. *Food Chem*, 91 (3), 477-483.

Lauritzsen, K., Martinsen, G. & Olsen, RL. (1999). Copper induced lipid oxidation during salting of cod (*Gadus morhua L.*) *Journal of Food Lipids*, 6, 299-315.

Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2005). Quality characteristics of irradiated turkey breast rolls formulated with plum extracts. *Meat Science*, 71, 300–305.

Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int J Food Microbiol*, 55, 181-186.

Lescano, G., Kairiyama, E., Narvaiz, P. & Kaupert, N. (1990). Studies on quality of radurized (Refrigerated) and non-radurized (frozen) Hake (*Merluccius merluccius hubbsi*). *Lebensm Wiss u Technol*, 23, 317-321.

Leta, H.R. (1981). Aspectos biológicos del calamar *Illex argentinus*. Informe Técnico del Instituto Nacional de Pesca (INAPE). Montevideo, Uruguay, N° 23, pp. 50.

Liston, J. (1980). Microbiology of the fishery science. En: *Adeances in Fishery Science and Technology*. Connell, J.J. (Ed.) Fishing News Books, Surrey, England.

Loaharanu, P. & Thomas, P. (2001). Irradiation for Food Safety and Quality. Ed.: Loaharanu P. y Thomas, P. Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), Viena.

Lück, E y Jager, M. (1990). Antimicrobial Food Aditives. Characteristics, Uses, Effects. Ed. Springer. Alemania. 2da Edición. pp: 259.

Lupín, H.M., Giannini, D.H., Soulé, C.L, Davidovich, L.A. & Boeri, R.L (2007). Storage life of chilled Patagonian hake (*Merluccius hubbsi*). *Int J Food Sci Technol*, 15 (3), 285-300.

Madrid, A., Madrid, J.M. & Madrid, R. (1994). Tecnología del pescado y productos derivados. AMV Ediciones, Mundi Prensa, Madrid, España.

Madureira Pastous, L.S., Castello, J.P., Prentice-Hernández, C., Queiroz, M.I., Espírito Santo, M.L. Ruiz, W.A., Raggi Abdallah, P., Hansen, J., Bertolotti, M.I., Manca, E., Yeannes, M.I., Avdalov N. & Fernández Amorín, S. (2009). Current and potential alternate food uses of the Argentine anchoita (*Engraulis anchoita*) in Argentina, Uruguay and Brazil. En: *Fish as feed inputs for aquaculture. Practices, sustainability and implications*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 518. ISBN 978-92-5-106419-1, pp: 269 – 288.

Mañas, P. & Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. A review. *J Appl Microbiol*, 98, 1387–1399.

Massa, A., Yeannes, M.I. & Manca, E. (2007). Ácidos grasos poliinsaturados de la serie Omega-3 en ejemplares bonaerenses y patagónicos de anchoíta argentina. *Aceites y Grasas*, XVII (1), 568-572.

Mbarki, R., Miloud, N.B., Selmmi, S., Dhib, S. & Sadok, S. (2009) Effect of vacuum packaging and low-dose irradiation on the microbiol, Chemicals and sensory characteristics of chub Mackerel (*Scomber japonicus*). *Food Microbiol*, 26, 821-826.

McMeekin, T., Olley, J., Ross, T. & Ratkowsky, D. (1993). Basic concepts and methods. In *Predictive microbiology: theory and application*. Research Studies Press LTD (pp. 11-84). Taunton, England.

Melaj, M.A., Sánchez-Pascua, G.L., Casales, M.R. & Yeannes, M.I. (1993). Características de importancia tecnológica del calamar (*Illex argentinus*). *Revista Ciencias Agrícolas y Tecnología Alimentaria*. UCA (Buenos Aires)

Melaj, M.A., Sánchez-Pascua, G.L., Casales, M.R. & Yeannes, M.I. (1997). Aspectos a considerar en la evaluación de la frescura del calamar (*Illex argentinus*). *Alimentaria*, Mayo 97, 93-96.

Meyer, V. (1965) Marinades. In G. Borgstrom (Ed.), *Fish as food*, Vol. 3, Part I, (pp 221). New York: Academic Press.

MINAGRI. (2007). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. *Pesquerías de Calamar y Langostino. Situación actual*. Argentina.

MINAGRI (2012). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. http://www.minagri.gob.ar/site/pesca/pesca_maritima/02-desembarques/lectura.php?imp=1&tabla=especie_puerto_2010.

Molins, R.A. (2001). *Irradiación de alimentos-Principios y Aplicaciones*. Ed. Molins R. ACRIBIA, Zaragoza.

Molins, R.A.; Motarjemi, Y.; Käferstein, F.K. (2001) Irradiation: a critical point in ensuring the microbiological safety of raw foods. *Food Control*, 12, 347-356.

Moragas Encuentra, M. & De Pablo Busto, M. B. (2008). Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario. Bilbao, España.

Moseley, B.E.B. (1989) Ionizing irradiation: action and repair. In Gould, G.W (Ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures* (pp. 43-70). Elsevier Applied Science, London.

Mossel, D.A.A. & Moreno García, B. (1985) Microbiología de los alimentos. Acribia S.A. España.

Narvaiz P. (2009). Irradiación de Alimentos: Situación Argentina en 2009. *Revista CNEA*, 33/34, 10-17.

Narvaiz P. (2012). Comunicación personal.

Narvaiz, P. & Ladomery, L. (1998). Estimation of the effect of food irradiation on total dietary vitamin availability as compared with dietary allowances: study for Argentina. *J Sci Food Agric*, 76, 250- 256.

Nawar, W.W. (1983). Radiolysis of non aqueous components of foods. En: *Preservation of Food by Ionizing Radiation*. Eds.: Josephson, E.S. & Peterson, M.S. CRC Press, Boca Ratón, Estados Unidos. Vol. II, 75-124.

Nawar, W.W. (2000). Lípidos. En: *Química de los Alimentos*. (Ed.: Fennema, O.). Editorial Acribia. Segunda edición, pp: 357.

Oehlenschläger J. (1997). Suitability of ammonia-N, dimethylamine-N, trimethylamine-N, trimethylamine oxide-N and total volatile basic nitrogen as freshness indicators in sea foods. "Methods to determine the freshness of fish in research and industry. - Evaluation of Fish Freshness", *Institut International du Froid*, 92-99.

Ólafsdóttir, G., Martindóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I.M., Henehan, G., Nielsen, J. & Nilsen, H. (1997). Methods to

evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 258-432.

OIEA. Organismo Internacional de Energía Atómica (1982). *Training Manual on Food Irradiation Technology and Techniques*. TRS 114, FAO/IAEA. Viena.

OIEA. Organismo Internacional de Energía Atómica (2009a). *Food and Environmental Protection Newsletter*, 12 (1), Viena.

OIEA. Organismo Internacional de Energía Atómica (2009b). <http://www.iaea.org/About/Policy/GC/GC52/GC52InfDocuents/English/gc52inf-10>

OIEA. Organismo Internacional de Energía Atómica (2009c). *Irradiation to Ensure the Safety and Quality of Prepared Meals*. STI/PUB/1365. Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), Viena. http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/Pub1365_web.pdf

OMS. (1989). *La irradiación de los alimentos. Una técnica para conservar y preservar la inocuidad de los alimentos*. Organización Mundial de la Salud (OMS), Ginebra, Suiza.

OMS. (1994). In *Safety and nutritional adequacy of irradiated food*. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza, pp. 81–107.

OMS. (1999). *High-dose irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy*. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza. WHO Technical Report Series 890.

Quattara, B, Sabato, S.F. & Lacroix, M. (2002). Use of gamma irradiation technology in combination with edible coating to produce shelf-stable foods. *Radiat Phys Chem*, 63, 305-310.

Özden, O., Inugur, M. & Erkan, N. (2007). Effect of different dose gamma radiation and refrigeration on the chemical and sensory properties and microbiological status of aqua cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Radiat Phys Chem*, 76, 1169-1178.

Özogul, F. & Özden, Ö. (2011). The effects of gamma irradiation on the biogenic amine formation in Sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. Food and Bioprocess Technology, DOI: 10.1007/s11947-011-0593-8.

Özoğul, F., Polat, A. & Özoğul, Y. (2004). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). Food Chem, 85, 49-57.

Paarup, T., Sanchez, J.A., Moral, A., Christensen, H., Bisgaard, M. & Gram, L. (2002a) Sensory, chemical and bacteriological changes during storage of iced squid (*Todaropsis eblanae*). J Appl Microbiol, 92, 941- 950.

Paarup, T., Sanchez, J.A., Peláez, C. & Moral A. (2002b). Sensory, chemical and bacteriological changes in vacuum-packed pressurised squid mantle (*Todaropsis eblanae*) stored at 4 °C. Int J Food Microbiol, 74, 1-12.

Pedrosa-Menabrito A. & Regenstein J.M. (1988). Shelf-life extension of fresh fish - a review. Part I – Spoilage of fish. *J Food Quality*, 11 (2), 17–127.

Pedrosa-Menabrito A. & Regenstein J.M. (1990). Shelf-life extension of fresh fish - a review. Part III - fish quality and methods of assessment. *J Food Quality*, 13, 209-223.

Peryam, D.R. & Pilgrim, F.J. (1957). Hedonic scale method of measuring food preferences. Food Technology, 11(9), 9-14.

Pigott, G.M & Tucker, B.W. (1990). Seafood. Effects of technology on nutrition. Marcel Dekker, Inc. New York. pP: 176 – 204.

Pokorny, J. (1981). Browning from lipid-protein interactions. Prog Food Nutr Sci. 5, 421-428.

Potter, N.N. & Hotchkiss, J. H. (1995). Food Science, 5th edn. London, U.K.: Chapman & Hall, International Thomson Publishing.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Rehbein, H. & Oehlenschlager, J. (2001). En: Fishery Products: Quality, Safety and Authenticity. John Wiley & Sons. pp: 20.

Ross, T., McKeekin, T.A. & Baranyi, J. (2000). Predictive microbiology and food safety. In Robinson, R.K., Batt, C.A. & Patel, P.D. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp 1699-1710). Academic Press, San Diego.

Sahena, F., Zaidul, I., Jinap, S., Saari, N., Jahurul, H., Abbas, K. & Norulaini, N. (2009). PUFAs in fish: extraction, fractionation, importance in health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8(2), 59-74.

Sallam, Kh.I., Ahmed, A.M., Elgazzar, M.M. & Eldaly, E.A. (2007). Chemical quality and sensory attributes of marinated Pacific saury (*Cololabis saira*) during vacuum-packaged storage at 4 °C. *Food Chem*, 102, 1061-1070.

Shakila, R. Jeya; Vijayalakshmi, K. & Jeyasekaran, G. (2003). Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. *Food Chem*, 82, 347-352.

Sidhu, K. (2003). Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regul Toxicol Pharm*, 38 (3), 336-344.

Slavin, J.W., Nickerson, J.T.R., Ronsivalli, L.J., Goldbith, S.A. & Licciardello, J.J. (1966). The quality and wholesomeness of irradiation pasteurized marine products with particular referene to fish fillets. *Food Irradiation* 3, 365-381.

Sommers, Ch. H. & Xuetong Fan. (2006). *Food Irradiation Research and Technology*. IFT Press. Blackwell Publishing.

Stansby, M.E. & Hall, A.S. (1967). Chemical composition of commercially important fish of the USA. *Fish Ind Res.*, 3, 29-34.

Sugiyama, M., S. Kòusu, M. Hanabe and Y. Okuda. (1989). *Utilization of Squid*. A. A. Balkema/roterdam. ISBN 90 6191 479 5

Sungsri-in, R.; S. Benjakul and K. Kijroongrojana. (2011). Pink discoloration and quality changes of squid (*Loligo formosana*) during iced storage. *LWT – Food Science and Technology* 44 (1): 206-213.

Suzuki, T. (1987). *Tecnologías de las proteínas de pescado y krill*. Acribia, Zaragoza, España.

Thanonkaew, A., Benjakul, Z., Visessanguan, W. & Decker, E.A. (2006). Development of yellow pigmentation in squid (*Loligo peali*) as a result of lipid oxidation. *J Agr Food Chem*, 54, 956-962.

Thatcher, F.S. & Clark, D.S. (1973). *Análisis microbiológico de los alimentos*. Ed. Acribia, España. Pp: 41.

Timi, J.T., Sardella, N.H. & Navone, G.T. (2001). Parasitic nematodos of *Engraulis anchoita* Hubbs et Mariani, 1935 (Pisces, Engraulidae) off the Argentine and Uruguayan coasts, South West Atlantic. *Acta Parasitologica*, 46 (3), 186-193.

Tironi, V.A., Tomás, M.C. & Añón, M.C. (2007). Lipid and protein deterioration during the chilled storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). *J Sci Food Agr*, 87, 2239–2246.

Tsironi, T., Salapa, I. & Taoukis, P. (2009). Shelf life modelling of osmotically treated chilled gilthead seabream fillets. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 23–31.

Urbain, W.M. (1986). *Food Irradiation*. Food Science and Technology Monographs, Academic Press Inc., Orlando.

van Gerwen, S.J.C., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. & Zwietering, M.N. (1999). A data analysis on the irradiation parameter D_{10} for bacteria and spores under various conditions. *J Food Prot.*, 62, 1024– 1032.

Vaz-Pires, P., Seixas, P., Mota, M., Lapa-Guimaraes, J., Pickova, J., Lindo, A. & Silva, T. (2008) Sensory, microbiological, physical and chemical properties of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and broadtail shortfin squid (*Illex condecti*) stored in ice. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1655-1664.

Wang, He; Ruijin Yang, Yanning Liu, Weibin Zhang, Wei Zhao, Yanpeng Zhang & Xiao Hua. (2010). Effects of low dose gamma irradiation on microbial inactivation and physicochemical properties of fried shrimp (*Penaeus vannamei*). *Int J Food Sci Technol*, 45, 1088–1096.

Weaver BJ & Holub BJ. (1988). Health effects and metabolism of dietary eicosapentaenoic acid. *Programme Food Nutrition Science* 12(2), 111–150.

Whiting, R.C. & Buchanan, R.L. (1993). A classification of models for predictive microbiology. *Food microbiol*, 10, 175-177.

Witting de Penna, E. (2001). Evaluación Sensorial: Una metodología actual para la tecnología de alimentos. <http://hdl.handle.net/2250/5556>

Woon Lee, Ju; Kyung.-Hwan Cho, Hong.-Sun Yook, Cheorun Jo, Dong.-Ho Kim & Myung.-Woo Byun. (2002). The effect of gamma irradiation on the stability and hygienic quality of semi-dried Pacific saury (*Cololabis saira*) flesh. *Radiat Phys Chem*, 64, 309-315.

Woyewoda, A.D. & Ke P.J. (1980). Laboratory quality assessment of Canadian Atlantic Squid (*Illex illecebrosus*) Fisheries and Marine Service Technical Report No 902. Department of Fisheries and Oceans Field Services Branch, Inspection Division Research Section, Halifax, Nova Scotia B3J 2S7.

Yamanaka, H., Shiomi, K. & Kikuchi, T. (1987) Agmatine as a potential index of freshness of common squid (*Todarodes pacificus*). *J Food Sci*, 28, 2.

Yeannes, M.I. (2006). Aspectos científicos y tecnológicos en Preservas de Productos Pesqueros. Editorial Facultad de Ciencias Agrarias. UCA. Editado en CD. ISBN: 987-05-1523-1 octubre de 2006.

Yeannes, M.I. (2012). Capítulo 4: Manipuleo y acondicionamiento de pescado a bordo. En: "Ingeniería de Productos Pesqueros". Coordinadora: Cantalupi, Ana M., Editorial: EUDEM. Universidad Nacional de Mar del Plata. ISBN: 978-987-544-462-1. Vol 1.

Yeannes, M.I. & Casales, M.R. (1995). Estudio de las variables de proceso de marinados de anchoíta (*E. anchoíta*). *Alimentaria*, Mayo 95, 87-91.

Yeannes, M.I. & Casales, M.R. (2008). Modifications in the chemical compounds and sensorial attributes of *Engraulis anchoíta* fillet during marinating process. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28 (4), 798-803.

Yeannes, M.I., del Valle, C.E. & Lupín, H.M. (1983). Generación de Bases Nitrogenadas Volátiles durante el proceso de elaboración de conservas de pescados. *Rev. Inst. de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. Valencia. España. ISSN: 0034-7698, 23(4), 585- 590.

Yeannes, M.I., Sanchez Pascua, G.L., & Casales, M.R. (2007). Determinación de aspectos del deterioro en marinados de anchoíta que afectan su vida útil. Libro de Actas del XI Congreso Argentino CYTAL, ISBN 978-987-22165-2-8.

Yoon, K.S. (2003). Effect of gamma irradiation on the texture and microstructure of chicken breast meat. *Meat Science*, 63, 273-277.

Zhang, L., Lu, Z. & Wang, H. (2006). Effect of gamma irradiation on microbial growth and sensory quality of fresh-cut lettuce. *Int J Food Microbiol*, 106, 348-351.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van Riet, K. (1990). Modelling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microb*, 56, 1875-1881.