

**UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZONICA DE
MADRE DE DIOS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA
CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**



**“EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ATMÓSFERA MODIFICADA
SOBRE LA FORMACIÓN DE HISTAMINA EN EL
PROCESAMIENTO DE FILETE DE PERICO (*Coryphaena hippurus*)
CONGELADO”**

TESISTA: Bach. CATHERINE LIZ CALLA QUISPE

**Para Optar el Título Profesional de:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

PUERTO MALDONADO – PERÚ

2010



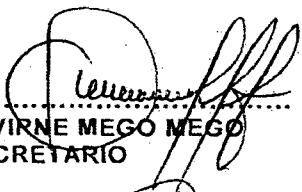
UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS
FACULTAD DE INGENIERÍA

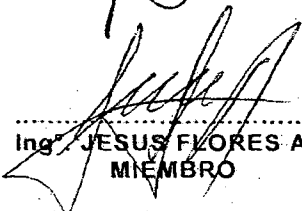
"Año de las Cumbres Mundiales en el Perú"
"Madre de Dios Capital de la Biodiversidad del Perú"

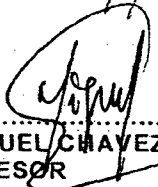
**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO
PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

En la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, en la sala de videoconferencias del primer piso de la Ciudad Universitaria, a las diecisiete horas del cuatro de noviembre del año dos mil diez, en cumplimiento a la Resolución Decanal N° 103-2010-UNAMAD-DFI de fecha 02 de noviembre del 2010, se reunió el Jurado de Sustentación del Trabajo de Tesis, integrado por: Presidente: Ing°. Raúl Huamán Cruz; Secretario: Ing°. Virne Mego Mego y Miembro: Ing°. Jesús Flores Arizaca, para evaluar el trabajo de Tesis intitulado "Efecto del Tratamiento con Atmósfera Modificada Sobre la Formación de Histamina en el Procesamiento del Filete de Perico (*Coryphaena hippurus*) Congelado", presentado por la Bachiller en Ingeniería Agroindustrial CATHERINE LIZ CALLA QUISPE. Los señores Miembros del Jurado, después de haber observado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas y terminada la réplica; luego de debatir entre sí, reservada y libremente lo declaran APROBADO por UNANIMIDAD con el calificativo de BUENO con la Nota de 15, en fe de lo cual se firmó la presente acta, siendo las diecinueve con treinta horas del mismo día, con lo que se dio por terminado el acto de sustentación.


.....
Ing°. RAÚL HUAMAN CRUZ
PRESIDENTE


.....
Ing. VIRNE MEGO MEGO
SECRETARIO


.....
Ing°. JESUS FLORES ARIZACA
MIEMBRO


.....
Ing°. MIGUEL CHAVEZ PINCHI
ASESOR

El jurado deja constancia de observaciones al presente trabajo de investigación, las cuales se hacen llegar concluidas a la culminación del acto de sustentación y se notifica a la sustentante inmediatamente.

DEDICATORIA

Esta Tesis se la dedico a toda mi familia

Para mis padres Jorge y Alicia por su comprensión y ayuda en los momentos difíciles. Me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio.

Para mis hermanos Omar, Vladimir, Vanessa y Frida a ellos les dedico especialmente esta tesis por el empeño y la fuerza que ponen para alcanzar sus metas y que me ha servido como ejemplo para que yo alcance las mías.

Para mis sobrinos Imanol, Tatiana, Elías y Andrés que son sin duda mi referencia para el presente y para el futuro.

AGRADECIMIENTO

Primero quiero agradecer sinceramente a mi tutor de Tesis, Ing. Miguel Chávez Pinchi por su esfuerzo y dedicación en la presente tesis.

También me gustaría agradecer a la empresa CONGELADOS PACIFICO S.A.C en especial al Ing. Andrés Minga Guerrero por sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como profesional. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración.

De igual manera agradecer a los profesores de la universidad por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, que ayudan a formarte como persona e investigador.

RESÚMEN

La presente tesis tiene como objetivo determinar el efecto de los tratamientos con atmósfera modificada sobre la formación de histamina en el procesamiento del filete de perico (*Coryphaena hippurus*) congelado, mediante el diseño factorial 2^k se encontró que la temperatura del filete ($p = 0,00001$), el tipo de gas ($0,0001$) y la interacción temperatura del filete con tiempo de reposo ($p = 0,0093$) son altamente significativos y la interacción tiempo de reposo con tipo de gas ($p = 0,0322$) es poco significativo a un nivel de confianza del 95 % y sus valores recomendados son 0 °C, 24 h a 70 % de monóxido de carbono que generan una concentración de histamina 4,3 ppm.

Este trabajo de investigación responde a la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto del tratamiento con atmósferas modificadas sobre la formación de histamina en el procesamiento del filete de perico (*Coryphaena hippurus*) congelado? Asimismo la hipótesis establecida es: el efecto de los factores del tratamiento con atmósferas modificadas en el procesamiento del filete de perico (*Coryphaena hippurus*) congelado es alto.

La importancia de la presente investigación científica radica en la estandarización del los factores del tratamiento con atmósferas modificadas en el procesamiento del filete de perico (*Coryphaena hippurus*) congelado, así como la sostenibilidad de la calidad del producto durante las siguientes producciones, generación de nuevos conocimientos científicos basados en la tecnología de atmósferas modificadas con monóxido de carbono (CO), aplicados a otras especies propias de nuestra región Madre de Dios, bajar los costos de producción y tener mayor margen de ganancia.

ABSTRACT

This thesis aims to determine the effect of modified atmosphere treatments on the formation of histamine in the production of fillet mahi mahi (*Coryphaena hippurus*) frozen by the 2^k factorial design found that the temperature of the steak ($p = 0, 00001$), the type of gas (0.0001) and interaction temperature of the steak rest time ($p = 0.0093$) are highly significant and rest time interaction with type of gas ($p = 0.0322$) is insignificant at a confidence level of 95% and their recommended values are 0 ° C, 24 h at 70% of carbon monoxide generated by a concentration of 4.3 ppm histamine.

This research answers the following question: What is the effect of treatment with modified atmospheres in the formation of histamine in the processing of the fillet mahi mahi (*Coryphaena hippurus*) frozen? Similarly, the hypothesis established is the effect of treatment factors modified atmosphere processing steak mahi mahi (*Coryphaena hippurus*) frozen halt.

The importance of this research lies in the standardization of factors of treatment with modified atmosphere processing steak mahi mahi (*Coryphaena hippurus*) frozen, and the sustainability of product quality during the next production, generation of new knowledge technology-based scientists modified atmosphere with carbon monoxide (CO), applied to other species native to our region Madre de Dios, lower production costs and have higher profit margin.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE CUADROS :	v
LISTA DE FIGURAS :	vii
LISTA DE ANEXOS :	x
NOMENCLATURA :	xi
INTRODUCCIÓN :	xii
CAPÍTULO I : MARCO TEÓRICO	1
1.1 : Problema, hipótesis y variables	1
1.1.1 : Problema	1
1.1.2 : Hipótesis	2
1.1.3 : Identificación de las variables	3
1.2 : Objetivos	4
1.2.1 : General	4
1.2.2 : Específico	4
1.3 : Justificación e importancia	5
1.4 : Antecedentes bibliográficos	7
1.4.1 : Aspectos generales del perico	7
1.4.1.1 : Perico	7
1.4.1.2 : Clasificación sistemática	8
1.4.1.3 : Composición física, química y nutricional	9
1.4.2 : Tecnología en la producción de filete de perico (<i>coryphaena hippurus</i>) con tratamiento en atmósfera modificada, selladas al vacío y congeladas en la empresa Congelados Pacífico SAC	12

1.4.2.1	: Recepción	16
1.4.2.2	: Primer pesado	16
1.4.2.3	: Fileteo y perfilado	17
1.4.2.4	: Segundo pesado	18
1.4.2.5	: Codificado	18
1.4.2.6	: Primer embolsado	19
1.4.2.7	: Inyección de gas	20
1.4.2.8	: Almacenamiento en pre – cámara	20
1.4.2.9	: Retiro del filete tratado	21
1.4.2.10	: Lavado	22
1.4.6.11	: Limpieza	22
1.4.6.12	: Segundo embolsado	23
1.4.6.13	: Sellado al vacío	24
1.4.6.14	: Tercer pesado	25
1.4.6.15	: Interfoliado en placas	25
1.4.6.16	: Congelado	26
1.4.6.17	: Empaque	27
1.4.6.18	: Almacenamiento en cámara	28
1.4.6.19	: Embarque	28
1.4.3	: Envasado en atmósfera modificada	29
1.4.3.1	: Factores que intervienen en la eficacia del tratamiento con atmósfera modificada	33
1.4.3.2	: Tratamiento en atmósfera modificada con monóxido de carbono (CO) en el músculo del pescado	28
1.4.3.3	: Reglamentación del uso del monóxido de carbono en pescados y derivados	39
1.4.4	: Índice de calidad en productos pesqueros	39
1.4.4.1	: Histamina, amina biógena como índice de calidad higiénico sanitaria en el pescado	40
1.5	: Definiciones	44
1.5.1	: Aminas biógenas	44

1.5.2	: Histidina	44
1.5.3	: Histamina	45
1.5.4	Intoxicación histamínica	46
CAPÍTULO II : MARCO METODOLÓGICO		48
2.1	: Materiales	49
2.1.1	: En campo	49
a)	: Materia prima	49
b)	: Aditivos	50
c)	: Materiales	50
d)	: Procedimiento	51
2.1.2	: En laboratorio	52
a)	: Materiales	52
b)	: Reactivos	53
c)	: Procedimiento	54
2.2	: Métodos	62
2.2.1	: Diseño experimental	62
2.2.1.1	: Diseño factorial 2 ^k	62
2.2.2	: Análisis estadístico	65
2.2.2.1	: Análisis de varianza	65
2.2.2.2	: Software Statgraphics Plus V. 5,1	66
CAPÍTULO III : DISCUSIÓN DE RESULTADOS		67
3.1	: Caracterización física, química y microbiológica del filete de perico (<i>Coryphaena hippurus</i>) con y sin tratamiento con atmósfera modificada	67
3.1.1	: Físico sensorial	67
3.1.2	: Química	74

3.1.3	: Microbiológica	76
3.2	: Evaluación del tratamiento con atmosfera modificada en el filete de perico (<i>Coryphaena hippurus</i>)	78
3.2.1	: Tratamiento con atmósfera modificada en el filete de perico	78
3.3	: Análisis estadístico del efecto del tratamiento con atmósfera modificada sobre la formación de histamina en el filete de perico (<i>Coryphaena hippurus</i>)	89
3.3.1	: Estructura alias	89
3.3.2	: Valor y error de los factores del tratamiento con atmósferas modificadas en el filete de perico	90
3.3.3	: Gráfico del Pareto	92
3.3.4	: Análisis de varianza de la concentración de histamina con respecto a los factores	94
3.3.5	: Coeficientes de regresión de la concentración de histamina	97
3.3.6	: Análisis de los residuales	98
3.3.7	: Concentración de histamina con respecto a los factores	101
3.3.8	: Valores recomendados para el tratamiento con atmósferas modificadas	109
CONCLUSIONES		110
SUGERENCIAS		112
BIBLIOGRAFÍA		113
ANEXOS		122

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1 : Composición física del perico	9
Cuadro 2 : Composición de ácidos grasos en el perico	2
Cuadro 3 : Componentes minerales	11
Cuadro 4 : Composición de nutrientes de perico	11
Cuadro 5 : Códigos del filete según peso	19
Cuadro 6 : Presentaciones de acuerdo a los códigos	25
Cuadro 7 : Composición química del gas normal	32
Cuadro 8 : Composición química del gas ecológico	33
Cuadro 9 : Índice de calidad en pescados susceptibles a formar histamina	41
Cuadro 10 : Relación extracto - agua para la dilución del extracto filtrado en pescados y conservas.	56
Cuadro 11 : Factores del tratamiento con atmósferas modificadas y los valores de sus niveles	63
Cuadro 12 : Matriz de diseño con valores actuales y codificados de las variables independientes para el tratamiento en atmósfera modificada	64
Cuadro 13 : Calificación y puntaje del olor	68
Cuadro 14 : Calificación y puntaje de la textura	70
Cuadro 15 : Calificación y puntaje del color	71
Cuadro 16 : Calificación y puntaje del sabor	73
Cuadro 17 : Análisis de la concentración de histamina del filete de perico con y sin tratamiento en atmósfera modificada	74
Cuadro 18 : Evaluación microbiológica de la muestra sin tratamiento	76
Cuadro 19 : Evaluación microbiológica de la muestra con gas normal	77
Cuadro 20 : Evaluación microbiológica de la muestra con gas ecológico	77

Cuadro 21	: Histamina con respecto a los factores, primera réplica	80
Cuadro 22	: Histamina con respecto a los factores, segunda réplica	81
Cuadro 23	: Histamina con respecto a los factores, tercera réplica	82
Cuadro 24	: Valores promedios de la histamina con respecto a los factores	83
Cuadro 25	: Estructura alias	89
Cuadro 26	: Valor y error de los factores de tratamiento con atmósferas modificadas	91
Cuadro 27	: Estimación de los efectos principales	92
Cuadro 28	: Análisis de varianza de la concentración de histamina	94
Cuadro 29	: Coeficientes de regresión de la concentración de histamina	97
Cuadro 30	: Valores recomendados del tratamiento con atmósferas modificadas	109
Cuadro 31	: Histamina experimental y promediada con respecto a los factores principales codificados	126
Cuadro 32	: Estimación de los efectos principales	127
Cuadro 33	: Histamina promediada con respecto a los factores codificados	128
Cuadro 34	: Multiplicación de la histamina con los factores codificados	130
Cuadro 35	: Suma de cuadrados del error de histamina	133
Cuadro 36	: Ecuaciones para determinar los grados de libertad de los factores, bloques y error	134
Cuadro 37	: Grados de libertad de los factores, bloques y error con valores numéricos	135
Cuadro 38	: Características físicas y organolépticas del pescado, con calificación y puntaje respectivo	138
Cuadro 39	: Calificación y puntuación del color en el filete de perico	140
Cuadro 40	: Calificación y puntuación del sabor en el filete de perico	141

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 : Perico (<i>Coryphaena hippurus</i>)	8
Figura 2 : Diagrama de flujo en la producción de filete de perico con tratamiento en atmósfera modificada, selladas al vacío y congeladas	14
Figura 3 : Recepción de perico entero eviscerado	16
Figura 4 : Filete de perico	17
Figura 5 : Codificado del filete	18
Figura 6 : Embolsado de filete de perico	19
Figura 7 : Filete de perico con inyección de gas	20
Figura 8 : Almacenamiento en pre cámara	21
Figura 9 : Lavado y limpieza del filete	22
Figura 10 : Segundo embolsado y sellado al vacío	24
Figura 11 : Filete de perico con sello al vacío	21
Figura 12 : Interfoliado de los filete sellados al vacío	26
Figura 13 : Túnel de congelamiento, parte posterior	27
Figura 14 : Empaque del filete de perico congelado	28
Figura 15 : Estructura química de la histamina	45
Figura 16 : Formación de la amina biógena a partir del aminoácido precursor (histidina)	46
Figura 17 : Materiales de laboratorio	54
Figura 18 : Muestra extraída y desmenuzada del filete de perico	55
Figura 19 : Muestra en bolsa plástica	57
Figura 20 : Filtración del sobrenadante	58
Figura 21 : Lector ELISA equipado con 650 nm	61
Figura 22 : Evaluación del olor del filete de perico con tratamiento y sin tratamiento con atmósfera modificada	68
Figura 23 : Evaluación de la textura del filete de perico con y sin	70

	tratamiento con atmósfera modificada	
Figura 24	: Evaluación del color del filete de perico con y sin tratamiento con atmósfera modificada	72
Figura 25	: Evaluación del sabor del filete de perico con y sin tratamiento de monóxido de carbono	73
Figura 26	: Concentración de histamina con respecto a los tratamientos	75
Figura 27	: Aerobios mesófilos con y sin tratamiento en atmósfera modificada	78
Figura 28	: Concentración de histamina del filete de perico con y sin tratamiento en atmósfera modificada a 0°C	85
Figura 29	: Concentración de histamina del filete de perico con y sin tratamiento en atmósfera modificada a 10 °C	86
Figura 30	Histamina con respecto a la densidad óptica de los 24 tratamientos	88
Figura 31	: Gráfico de Pareto de los efectos con sus respectivos factores	93
Figura 32	: Probabilidad normal de la concentración de histamina en el filete de perico	98
Figura 33	: Gráfico de residuos para la concentración de histamina	100
Figura 34	: Concentración de Histamina con respecto a los factores	101
Figura 35	: Concentración de histamina con respecto a temperatura del filete y tiempo de reposo con gas ecológico constante, en 2 dimensiones	102
Figura 36	: Concentración de histamina con respecto a temperatura del filete y tiempo de reposo con gas ecológico constante, en 3 dimensiones	103
Figura 37	: Concentración de histamina con respecto al tiempo de reposo y temperatura del filete con gas normal constante, en 2 dimensiones.	104
Figura 38	: Histamina con respecto al tiempo de maduración y temperatura del filete con gas normal constante, en 3 dimensiones	105
Figura 39	: Concentración de histamina con respecto al tipo de gas y	106

tiempo de reposo con temperatura del filete constante, en 2 dimensiones maduración y temperatura con gas normal constante en 2 dimensiones

- Figura 40** : Concentración de histamina con respecto al tipo de gas y tiempo de reposo con temperatura del filete constante, en 3 dimensiones 107
- Figura 41** : Concentración de histamina con respecto al tipo de gas y temperatura del filete con tiempo de reposo constante, en 3 dimensiones 108
- Figura 42** : Ecuación cuadrática de la concentración de histamina con respecto a la densidad óptica de las muestras de control 142

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 : Conceptos fundamentales	122
Anexo 2 : Análisis de varianza	123
Anexo 3 : Cálculo de efectos de las variables operativas del tratamiento con atmósfera modificada en la concentración de histamina	126
Anexo 4 : Cálculo de la suma de cuadrados	128
Anexo 5 : Cálculo de la suma de los cuadrados medios, F_0 calculado y F_0 tabulado	136
Anexo 6 : Análisis organoléptico del pescado	138
Anexo 7 : Calificación y puntuación del color del filete de perico	140
Anexo 8 : Calificación y puntuación del sabor del filete de perico	141
Anexo 9 : Cálculo de la concentración de histamina con respecto a la densidad óptica	142
Anexo 10 : Protocolo técnico del gas normal aplicado al filete de perico	143
Anexo 11 : Protocolo técnico del gas ecológico aplicado al filete de perico	144

NOMENCLATURA

a^*	:	Coordenada de rojez
b^*	:	Coordenada de amarillo
F_0	:	Estadístico F
gl_r	:	Grados de libertad de los efectos e interacciones
gl_E	:	Grados de libertad del error
H_i	:	Hipótesis alternativa
H_0	:	Hipótesis nula
k	:	Número de factores
L^*	:	Coordenada de luminosidad
$MS_{Efectos}$:	Suma de cuadrados medios de los efectos
MS_{Error}	:	Suma de cuadrados medios del error
N_r	:	Número de réplicas en el diseño
p	:	Máxima probabilidad de cometer error
SS_{Total}	:	Suma total de cuadrados
$SS_{Efectos}$:	Suma de cuadrados debido a los efectos
SS_{Error}	:	Suma de cuadrados debido al error
T	:	Temperatura (°C)
t_m	:	Tiempo de maduración del filete de perico (h)
Y	:	Respuesta esperada
X_i	:	VARIABLES del diseño
x_i	:	Nivel del factor
ϵ	:	Error experimental observado en la respuesta
θ	:	Tipo de gas monóxido (s/d)
ρ	:	Densidad

INTRODUCCIÓN

El perico, es una especie pelágica de aguas tropicales, de cuerpo esbelto, alargado y comprimido lateralmente con escamas muy pequeñas que le da apariencia de “liso”. Cuando está vivo, tiene el cuerpo de color verde azulado amarillento brillante con tintes iridiscentes, plateado a los costados tornándose dorados y cuando mueren cambian rápidamente a un color grisáceo verdoso.

Morfológicamente presentan diferenciación sexual a partir de la talla de 30 cm por el desarrollo de una cresta en la cabeza del macho de forma vertical (cabeza convexa en las hembras). El perico es una especie pelágica oceánica, pero también se aproxima a la costa y es frecuente alrededor de islas. En estadios juveniles ocasionalmente se presenta en las bahías. Viven formando cardúmenes pequeños constituidos por 10 a 30 individuos; en la época de reproducción nada en parejas.

Los mayores desembarques de perico en la costa peruana se produjeron en los años 1983, 1987 y 1998, favorecidos por la presencia de El Niño, sin embargo, a partir del 2001, se observa un incremento en las capturas, asociado a cambios medio ambientales y a un mayor esfuerzo pesquero, especialmente de la flota artesanal. El desarrollo de esta pesquería artesanal ha permitido sostener una actividad socioeconómica muy importante en el país, porque es fuente de trabajo directo e indirecto para miles de peruanos, brindando productos frescos para consumo humano directo. Entre las especies oceánicas que destacan por su volumen de desembarque podemos mencionar a *Coryphaena hippurus* “perico”, *Sphyrna zygaena* “tiburón martillo”, *Prionace glauca* “tiburón azul”, *Isurus oxyrinchus*

“tiburón diamante”, *Alopias vulpinus* “tiburón zorro” y *Myliobatis peruvianus* “raya águila”. Durante primavera y verano las especies oceánicas se hacen más accesibles, sobre todo el “perico”, alcanzando en los desembarques más del 65 % de la pesca artesanal (Solano A. y col. 2008).

En la actualidad se está realizando la exportación del perico como filete tratado con atmósfera modificada a diversos países tales como los Estados Unidos de Norte América (234,6 TM), este tratamiento se realiza con la finalidad de brindar una coloración rojiza al músculo del pescado de esta manera se consigue una presentación comercial atractiva (Esparza E. y Bermejo A., 2010). El problema de esta tecnología radica cuando no se tiene control de los parámetros del tratamiento con atmósfera modificada (temperatura del filete, tiempo de reposo y tipo de gas) produce una variación en la concentración de histamina, llegando inclusive a valores cercanos a los límite máximo permisible (50 ppm) establecidos por la Administración de Alimentos y Drogas de los EE.UU, que conlleva a una reducción de la calidad del producto, esto se evidencia cuando el filete de perico (*Coryphaena hippurus*) presenta una coloración marrón (oxidación de las hemoproteínas), aumento de microorganismos aerobios y pérdida de textura (poco firme) (Fernández Jeri, Amstrong (2002)).

El objetivo del presente trabajo de investigación es: Determinar el efecto del tratamiento con atmósfera modificada en la formación de histamina en el procesamiento del filete de perico (*Coryphaena hippurus*) congelado, para ello primero se caracterizo física, química y microbiológicamente el filete del perico con y sin tratamiento en atmósfera modificada luego se determino la concentración de histamina en el filete de perico (*Coryphaena*

hippurus) con tratamiento en atmósfera modificada y finalmente se determina el grado de correlación que existe entre el tratamiento con atmósfera modificada y la concentración de histamina. Todo ello se realizó con la finalidad de definir en forma clara y concisa los valores adecuados de temperatura del filete, tiempo de reposo y tipo de gas para controlar la formación de histamina en la etapa de almacenamiento en pre-cámara, lo que conlleva a conservar la calidad del producto, es por esta razón que se plantea la presente investigación científica.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 PROBLEMA, HIPÓTESIS Y VARIABLES

1.1.1 PROBLEMA

La aplicación del tratamiento con atmósfera modificada en la producción de filetes de perico (*Coryphaena hippurus*) en la empresa Congelados Pacífico SAC, comprende 2 etapas dentro de la producción del filete congelado, cuyo objetivo es adquirir un color rojo intenso en el filete, de esta manera se consigue una presentación comercial atractiva.

La falta de estandarización de los parámetros del tratamiento con atmósfera modificada (temperatura del filete, tiempo de reposo y tipo de gas), que involucra la inyección y reposo del filete produce una variación en la concentración de histamina, llegando inclusive a valores cercanos a los límite máximo permisible (50 ppm) establecidos por la Administración de Alimentos y Drogas de los EE.UU, que conlleva a una reducción de la calidad del producto, esto se evidencia cuando el filete de perico (*Coryphaena hippurus*) presenta una coloración marrón (oxidación de las hemoproteínas), aumento de microorganismos aerobios y pérdida de textura (poco firme).

En base a lo anterior, el presente trabajo de investigación respondió a la siguiente pregunta:

¿Cuál es el efecto de los factores del tratamiento con atmósfera modificada en la formación de histamina en el procesamiento del filete de perico (*Coryphaena hippurus*) congelado?

1.1.2 HIPÓTESIS

1.1.2.1 H₁

El efecto de los factores del tratamiento con atmósferas modificadas sobre la formación de histamina en el procesamiento del filete de perico (*Coryphaena hippurus*) congelado es alto.

1.1.2.2 H₀

El efecto de los factores del tratamiento con atmósferas modificadas sobre la formación de histamina en el procesamiento del filete de perico (*Coryphaena hippurus*) congelado no es alto.

1.1.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIABLES

1.1.3.1 Dependiente

- Formación de histamina.

1.1.3.2 Independientes

- Tratamiento con atmósfera modificada:

- ✓ Temperatura del filete
- ✓ Tiempo de reposo
- ✓ Tipo de gas

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 GENERAL

Determinar el efecto de los factores del tratamiento con atmósfera modificada sobre la formación de histamina en el procesamiento del filete de perico (*Coryphaena hippurus*) congelado.

1.2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar física, química y microbiológicamente el filete del perico (*Coryphaena hippurus*) con y sin tratamiento en atmósfera modificada.
- Determinar la concentración de histamina en el filete de perico (*Coryphaena hippurus*) con tratamiento en atmósfera modificada.
- Determinar el grado de correlación que existe entre el tratamiento con atmósfera modificada y la concentración de histamina.

1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

1.3.1 JUSTIFICACIÓN

En la línea de producción de filete de perico (*Coryphaena hippurus*) tratado con atmósfera modificada se requiere definir en forma clara y concisa los valores adecuados de temperatura del filete, tiempo de reposo y tipo de gas para controlar la formación de histamina en la etapa de almacenamiento en precámara, lo que conlleva a conservar la calidad del producto, es por esta razón que se plantea la presente investigación científica.

Con una estandarización adecuada de los factores del tratamiento con atmósfera modificada en el procesamiento del filete de perico (*Coryphaena hippurus*) congelado, nos permitirá controlar la buena calidad del producto (oxidación de las hemoproteínas) y por ende evitar pérdidas de producción que disminuyen el costo de producción del filete tratado, esto se refleja cuando el rendimiento es menor a 48 %.

El presente trabajo de investigación sirve como base para otros estudios específicos de la calidad del pescado aplicando diferentes proporciones de monóxido de carbono (CO), temperatura, tiempo y otras variables que incidan sobre la calidad del pescado. Asimismo sirve los resultados obtenidos en esta

tesis sirve para contrastar o validar nuevas investigaciones con otras especies hidrobiológicas propias de nuestra región Madre de Dios.

1.3.2 IMPORTANCIA

El presente trabajo de investigación es importante porque busca determinar el efecto del tratamiento con atmósfera modificada sobre la formación de histamina en el procesamiento del filete de perico (*Coryphaena hippurus*) congelado, cuyo indicador es la concentración de histamina.

1.4 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.4.1 ASPECTOS GENERALES DEL PERICO

1.4.1.1 Perico (*Coryphaena hippurus*)

Pez pelágico grande altamente migratorio, que se distribuye a través de los trópicos y subtropicos de todos los océanos. Pertenece a la familia *coryphaenidae* que solo tiene otra especie integrante *Coryphaena esquiselis* Castro y col. (1999). Ambas especies presentan dimorfismo sexual, siendo más evidente después de los 6 meses de edad tanto en los machos como en las hembras. Presenta una coloración vistosa y variable en el cuerpo, el mismo que cambia en forma rápida entre tonos azul, amarillo a verde sobre el dorso. Tiene una aleta caudal que es una de las principales características distintivas de esta especie por ser fuertemente ahorquillada Aguilar-Palomino y col. (1998).

Esta especie se desarrolla en mares tropicales cuya temperatura oscila entre 20 y 30 °C. Se alimenta de peces y moluscos. Son depredados por el marlín azul, tiburones, pez espada, atunes entre otros. El crecimiento del perico es acelerado, alcanzando 1 metro de longitud y un peso de 8 kg al final del primer año, se estima que su longevidad promedio de 4 a 5 años, Castro y Col. (1999).



Figura 1. Perico.

Fuente: Congelados Pacifico SAC (2010).

1.4.1.2 Clasificación sistemática

Oro (2000) considera la siguiente clasificación sistemática del perico:

Reyno: Animal

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Clase: Osteichthyes

Subclase: Actinopterygii

Orden: Perciformes

Suborden: Percoide

Familia: Coryphaenidae

Género: Coryphaena

Especie: *Coryphaena hippurus*

Nombre común: Perico, dorado o

llampuga

1.4.1.3 Composición física, química y nutricional

1.4.1.3.1 Física

Cuadro 1. Composición física del perico.

Componente	Promedio (%)
Cabeza	21,3
Vísceras	8,8
Espinas	9,0
Piel	4,1
Aletas	4,4
Filetes	50,1
Pérdidas	2,3

Fuente: Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (2005).

1.4.1.3.2 Química

A) Ácidos grasos

Cuadro 2. Composición de ácidos grasos en el perico.

Ácido graso	Promedio (%)
C14:0 Mirístico	3,80
C15:0 Palmitoleico	0,30
C16:0 Palmítico	21,50
C16:1 Palmitoleico	3,70
C17:0 Margárico	1,60
C18:0 Esteárico	3,80
C18:1 Oleico	17,20
C18:2 Linoleico	trazas
C20:0 Aráquico	2,30
C20:1 Eicosaenoico	trazas
C20:4 Araquidónico	0,20
C20:5 Eicosapentaenoico	5,60
C22:4 Docosatetraenoico	1,10
C22:5 Docosapentanoico	2,10
C22:6 Docosahexanoico	35,40

Fuente: Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (2005).

B) Componentes minerales

Cuadro 3. Composición de minerales, base humedad.

Componente	Promedio (%)
Sodio	63,5
Potasio	402,5
Calcio	3,9
Magnesio	31,5
Fierro	8,3
Cobre	0,7
Cadmio y plomo	0,0

Fuente: Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (2005).

1.4.1.3.3 Nutricional

Cuadro 4. Composición de nutrientes del perico, base humedad.

Componente	Promedio (%)
Humedad	76,5
Grasa	0,4
Proteína	20,5
Sales minerales	1,2
Calorías (100 g)	120,0

Fuente: Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (2005).

**1.4.2 TECNOLOGÍA EN LA PRODUCCIÓN DE FILETE DE PERICO
(*Coryphaena hippurus*) CON TRATAMIENTO EN ATMÓSFERA
MODIFICADA, SELLADAS AL VACÍO Y CONGELADAS EN LA
EMPRESA CONGELADOS PACIFICO S.A.C.**

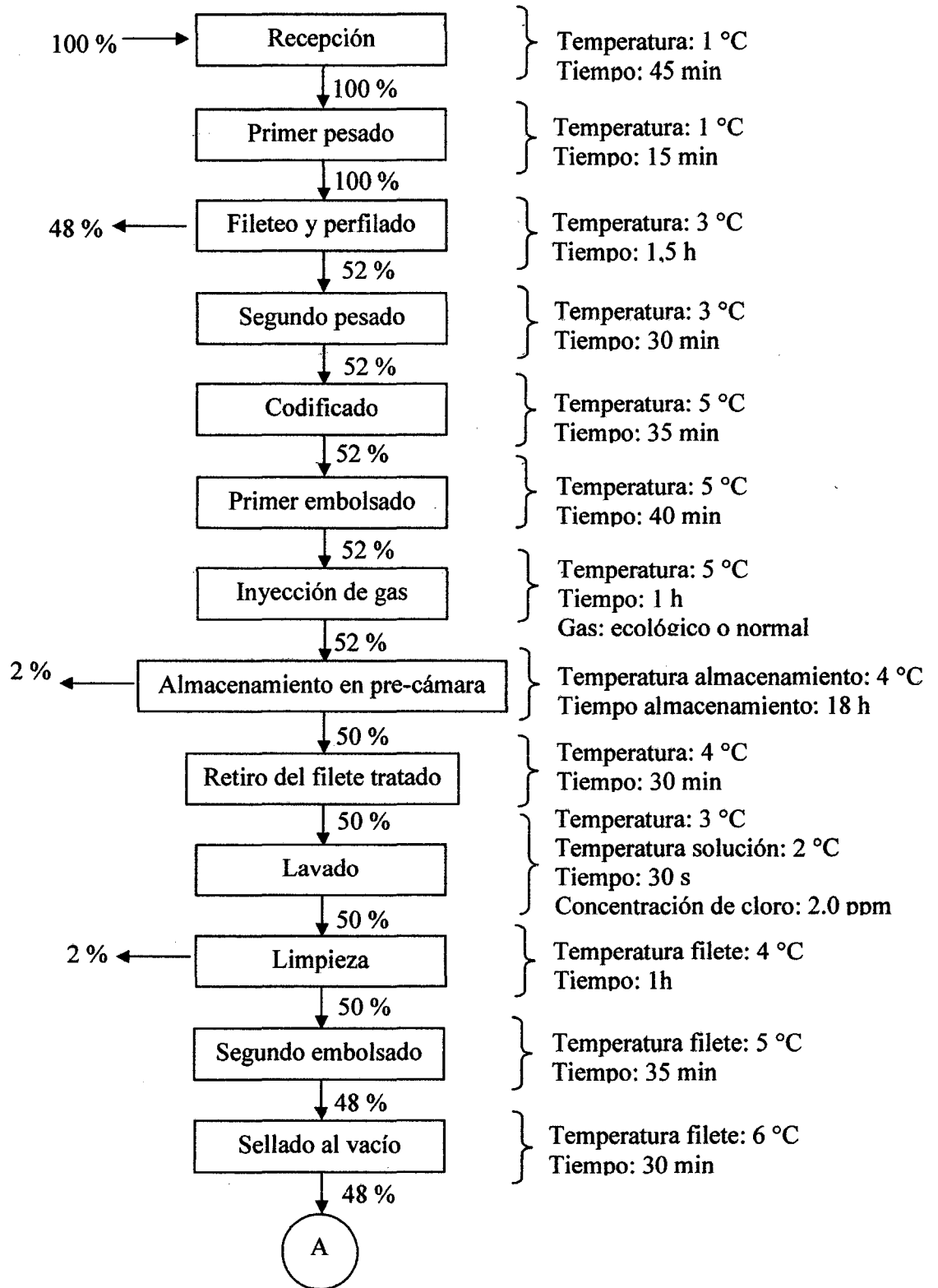
La producción de filete de perico (*Coryphaena hippurus*) con tratamiento en atmósferas modificadas, selladas al vacío y congeladas, comprende las siguientes etapas:

- Recepción
- Primer pesado
- Fileteo y perfilado
- Segundo pesado
- Codificado
- Primer embolsado
- Inyección de gas
- Almacenamiento en pre-cámara.
- Retiro del filete tratado
- Lavado
- Limpieza
- Segundo embolsado
- Sellado al vacío
- Tercer pesado

- Interfoliado en placas
- Congelado
- Empaque
- Almacenamiento en cámara
- Embarque

A continuación se presenta el diagrama de flujo en la figura 2.

Base: 1000 kg



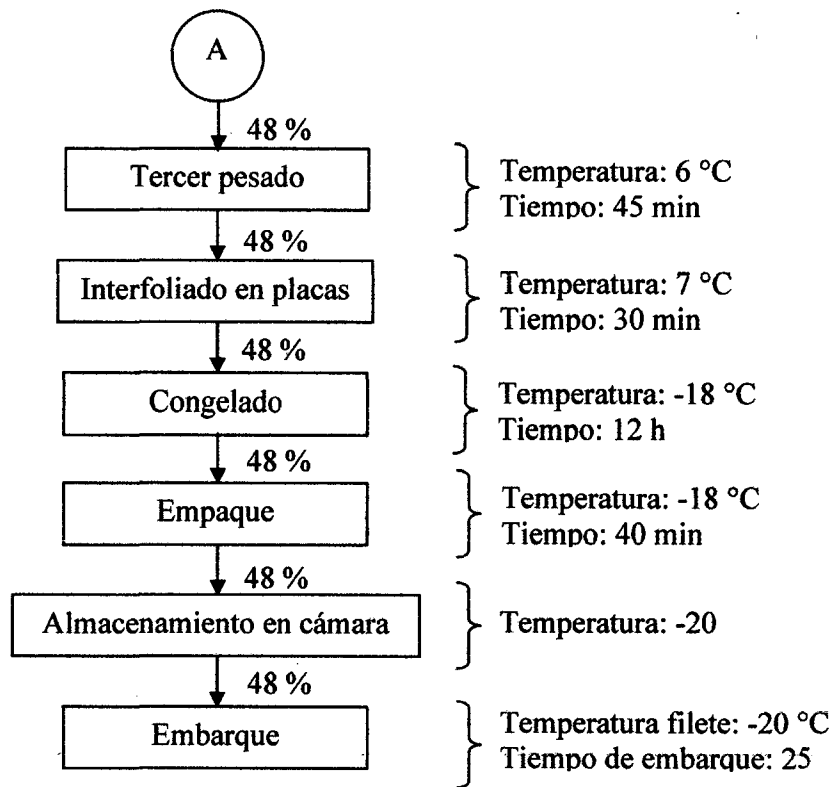


Figura 2. Diagrama de flujo en la producción de filete de perico (*Coryphaena hippurus*) con tratamiento en atmósfera modificada, selladas al vacío y congeladas.

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

A continuación se describen cada una de las etapas mencionadas.

1.4.2.1 Recepción

Consiste en la descarga de la materia prima, que es el perico entero eviscerado, dispuesto entre capas de hielo y papel, dentro de una cámara frigorífica. Se realiza el análisis organoléptico (olor, color, textura) y químico (contenido de histamina), con el fin de determinar la frescura y calidad del mismo. El perico entero eviscerado es colocado en cajas de plástico (5 a 7 pericos/caja, según el tamaño y peso del pescado).



Figura 3. Recepción de perico entero eviscerado.

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

1.4.2.2 Primer pesado

Las cajas de plástico que contienen perico entero eviscerado (32 kg / caja) son colocadas en una balanza digital con capacidad de 100 kg

seguidamente los datos del peso son registrados en el parte de producción diario.

1.4.2.3 Fileteo y perfilado

Las cajas que contienen perico entero, eviscerado, pesado son colocadas sobre mesas de acero inoxidable. El fileteo consiste en realizar cortes verticales y ventrales al pescado de tal modo que se obtenga el filete y se recortan los pedazos de piel sobrantes en los bordes del filete. El filete perfilado es colocado en canastillas plásticas.



Figura 4. Filete de perico.

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

1.4.2.4 Segundo pesado

Las canastillas plásticas que contienen los filetes son puestos sobre una balanza digital y se registra el dato del mismo para llevar el control del peso de las unidades fileteadas por cada trabajador.

1.4.2.5 Codificado

Consiste en clasificar los filetes de perico con la finalidad de proporcionar unidades estándares en pesos y tamaños convenientes definidos por el cliente.



Figura 5. Codificado del filete.

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

Cuadro 5. Códigos del filete según peso.

Peso	
(lb)	(kg)
1-3	0,45 – 1,36
3-5	1,36 – 2,27
5-7	2,28 – 3,18
7 a más	3,18 – a más

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

1.4.2.6 Primer embolsado

Los filetes son colocados en bolsas de polietileno de baja densidad (3 μm de espesor), luego puestos en canastillas plásticas y llevados hacia la sala de inyección de gas.



Figura 6. Embolsado del filete de perico.

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

1.4.2.7 Inyección de gas

Los filetes embolsados son colocados en una mesa de acero inoxidable, en seguida se pone la “aguja de inyección” dentro de la bolsa que contiene el filete se abre la válvula de inyección e ingresa el gas, la “aguja de inyección” va conectado a un balón hermético que puede contener gas normal (70 % CO) o gas ecológico (25 % CO), luego se cierra la bolsa y se pone en canastillos plásticos.



Figura 7. Filete de perico con inyección de gas.

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

1.4.2.8 Almacenamiento en pre-cámara

Las canastillas plásticas que contienen las bolsas con el filete y gas son llevadas a la pre-cámara de almacenamiento por un periodo aproximado de 18 h a una temperatura de 4 °C. Durante el periodo de

almacenamiento se producen reacciones entre el ion hierro (Fe^{2+}) presente en la mioglobina del filete y el CO del gas, dando como producto la carboximioglobina, compuesto que da la coloración rojo cereza intenso al músculo del pescado. Siendo estas reacciones dependientes de la temperatura del filete, tiempo de reposo y tipo gas que son factores del tratamiento en atmosfera modificada.

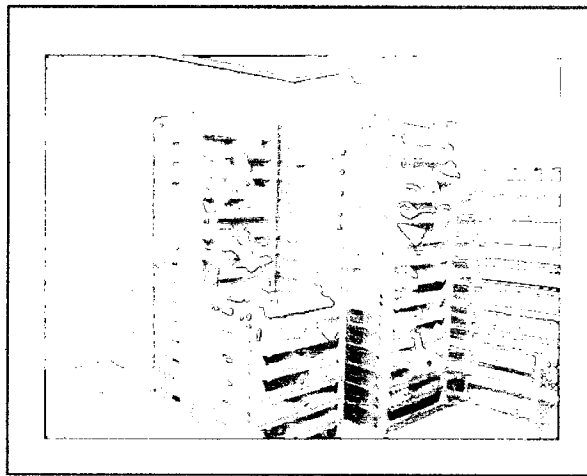


Figura 8. Almacenamiento en pre cámara.
Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

1.4.2.9 Retiro del filete tratado

Terminado el periodo de reposo, las canastillas que contienen las bolsas con filete tratado y gas son retiradas de la pre-cámara y llevadas a la sala de inyección donde se procede al retiro del filete tratado para ser colocados en canastillas plásticas y llevadas a la etapa de lavado.

1.4.2.10 Lavado

Previo a iniciar esta etapa se prepara una solución clorada con 500 litros de agua, 4 kg de sal (NaCl), 50 ml de cloro y 4 cajas (80 kg) con hielo. Se realiza la inmersión y zarandeo de las canastillas que contienen los filetes en la solución por un lapso de 30 s.

1.4.2.11 Limpieza

La operación se realiza sobre una mesa de acero inoxidable y consiste en pasar en forma suave una esponja humedecida en agua clorada sobre el músculo y piel del filete con la finalidad de retirar residuos de sangre y escamas sobrantes. Si el filete presenta algunas espinas, hematomas, piel sobrante (mal perfilado) o parásitos, se emplea un cuchillo para retirarlos. Los filetes limpios son colocados a mitad de la mesa.

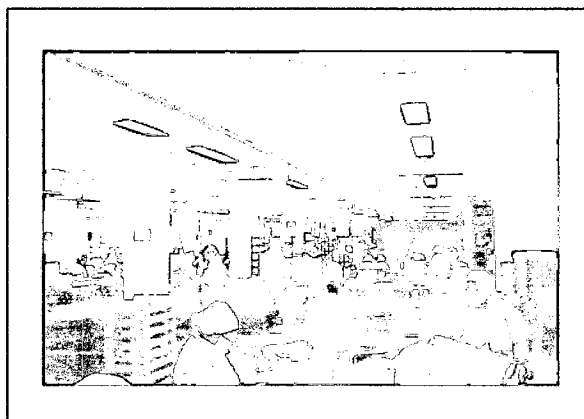


Figura 9. Lavado y limpieza del filete.

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

1.4.2.12 Segundo embolsado

Los filetes limpios son sujetos por la parte superior y colocados en bolsas de polietileno de alta densidad (5 μm de espesor) con previo etiquetado. A continuación se limpia la humedad de la abertura de la bolsa con una esponja. Los filetes embolsados son puestos en canastillas plásticas y llevados hacia la máquina de sellado.



Figura 10. Segundo embolsado y sellado al vacío.

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

1.4.2.13 Sellado al vacío

Para esta etapa se emplea una selladora al vacío de doble campana cuyos parámetros de operación son: 1 atmósfera de presión por 1 min de tiempo de sellado. La operación de sellado consiste en colocar la abertura de la bolsa que contiene el filete sobre la resistencia de la máquina selladora y acomodar de modo que los filetes estén extendidos dentro de la bolsa, luego se cierra la tapa de la maquina y se realiza la extracción de aire y cierre hermético del producto. Los filetes sellados son colocados en canastillas de plástico.

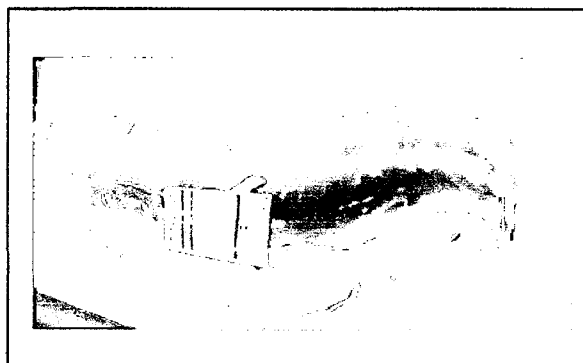


Figura 11. Filete de perico con sello al vacío.

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

1.4.2.14 Tercer pesado

Los filetes sellados al vacío de acuerdo a su codificación y presentación (peso de caja según código) son pesados en canastillas. Las presentaciones son las siguientes:

Cuadro 6. Presentaciones de acuerdo a los códigos.

Código (lb/filete)	Presentación (lb/caja)
1-3	10
3-5	25
5-7	25
7 a más	25

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

1.4.2.15 Interfoliado en placas

Los filetes sellados al vacío y pesados se colocan en placas metálicas de acero inoxidable previo lavado y desinfectado donde son extendidos e interfoliados con la finalidad que los filetes se congelen sin formar pliegues y que no se adhieran entre ellos, luego las placas son puestas en

anaqueles de acero inoxidable cuya capacidad es de 360 kg repartidos en 36 placas.

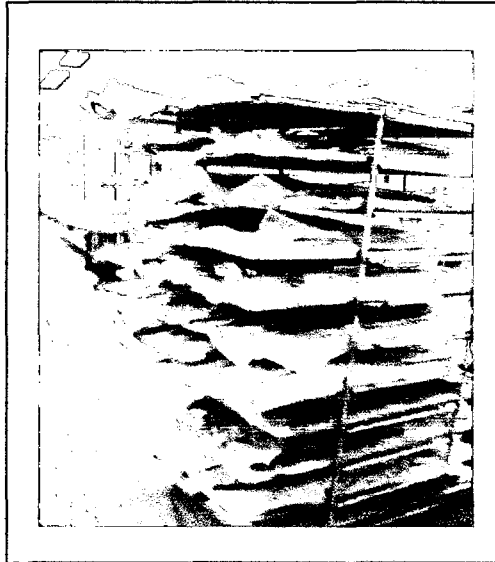


Figura 12. Interfoliado de los filetes sellados al vacío.

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

1.4.2.16 Congelado

Los anaqueles son llevados hacia los túneles de congelación por un tiempo de 12 hrs a una temperatura de -25 a -30 °C. Con estos parámetros de congelación el filete debe presentar al final de esta etapa -18°C en su centro térmico. Finalizada esta etapa los anaqueles son retirados del túnel para ser llevados al área de empaque.

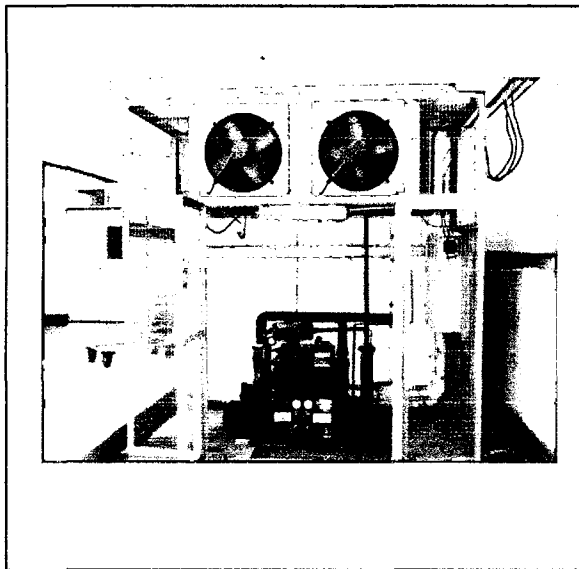


Figura 13. Túnel de congelamiento, parte posterior.

Fuente: Congelados Pacifico SAC (2009).

1.4.2.17 Empaque

Las placas metálicas conteniendo los filetes son retirados del anaquel, luego los filetes son retirados de las placas con un pequeño golpe (desbloqueo) y colocados en cajas de cartón corrugado según su código y presentación, en seguida estas cajas son aseguradas con cintas adhesivas y colocadas en forma ordenada sobre una plataforma de madera hasta completar el número de cajas requeridas.

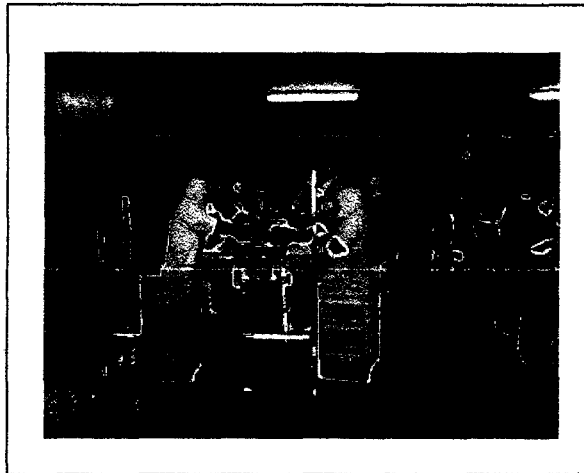


Figura 14. Empaque del filete de perico congelado.

Fuente: Congelados Pacífico SAC (2009).

1.4.2.18 Almacenamiento en cámara

Las plataformas de madera son llevadas con un montacargas hacia la cámara de almacenamiento que se encuentra a una temperatura de - 25 °C. El producto permanece en la cámara hasta que se complete el número de cajas requerido para un embarque.

1.4.2.19 Embarque

El producto es colocado en forma ordenada dentro del contenedor de capacidad variable, equipado con un sistema de frío con la finalidad de mantener la cadena de frío hasta su destino, esta operación se realiza en el menor tiempo posible para evitar que el producto se descongele.

1.4.3 ENVASADO EN ATMOSFERA MODIFICADA

Consiste en el envasado permanente o momentáneo de un alimento perecible en una atmosfera cuya composición ha sido modificada de manera diferente a la del aire. Hintlian y Hotchkiss (1986).

La finalidad del tratamiento en atmosfera modificada es reducir o minimizar reacciones químicas, enzimáticas y/o microbianas responsables del deterioro de los alimentos durante su almacenamiento y comercialización. Hintlian y Hotchkiss (1986).

1.4.3.1 Factores que intervienen en la eficacia del tratamiento con atmósfera modificada

Según Parry (1995), el éxito de las atmósferas no solo depende del gas o mezclas de gases, sino de otros factores tales como:

- Temperatura de conservación
- Calidad inicial del producto
- Actividad de agua
- Carga microbiana (cuantitativa y cualitativa)
- Aditivos

Tipo de envase

Estos factores se consideran cuando la atmósfera modificada forma parte de la presentación del producto final.

Si el empleo de atmósferas modificadas abarca una de las etapas del procesamiento, el tiempo de permanencia del producto con el gas o mezcla de gases es limitado, entonces se debe considerar los factores que intervengan en el efecto (reducir o minimizar reacciones químicas, enzimáticas y/o microbiológicas) que se busque al tratar al producto en la atmósfera.

Los factores del tratamiento en atmósfera modificada con monóxido de carbono (CO) considerados en el presente trabajo de investigación son los siguientes:

- Temperatura del filete
- Tiempo de reposo
- Tipo de gas

a) Temperatura del filete

Para lograr la fijación del monóxido de carbono (CO) en las hemo proteínas del filete es necesario que la temperatura del mismo sea menor o iguales a las temperaturas de refrigeración, debido a que el gas de monóxido de carbono (CO) es soluble a bajas temperaturas tal como lo manifiesta Daniel y Getmann (1948).

b) Tiempo de reposo

El efecto que va a producir el gas en el filete va a depender entre otros factores del tiempo de maduración o tiempo de permanencia entre estos. Durante este tiempo las moléculas de monóxido de carbono se fijan en las hemo proteínas (hemoglobina y mioglobina) del filete tal como lo detalla Sorheim (1997).

c) Tipo de gas

El efecto principal que se busca con el tratamiento en atmósfera modificada es el cambio en el color del músculo del pescado, sin embargo este efecto puede repercutir en la formación de histamina.

Entonces para determinar si existe incidencia en la formación de histamina es necesario tener en cuenta el factor que va a producir el cambio en el color del músculo que es el tipo de gas.

Los tipos de gases empleados para dar la coloración al músculo del pescado tienen como componente principal al monóxido de carbono (CO). Entre los tipos de gases que se comercializan para dar coloración a carnes tenemos (nombres comerciales):

- Gas normal o gas con 70 % CO.
- Gas ecológico o humo filtrado súper purificado o humo insaboro.

La composición química de estos gases se detalla a continuación:

Cuadro 7: Composición química del gas normal.

Componentes	Cantidad (%)
Nitrógeno (N ₂)	30,00
Monóxido de carbono (CO)	70,00

Fuente: Praxair Perú (2007).

Cuadro 8: Composición química del gas ecológico.

Componentes	Cantidad
Monóxido de carbono	25,00 %
Dióxido de carbono	25,00 %
Oxígeno y nitrógeno	45,00 %
Metano	< 15,00 %
Fenoles aromáticos (vapor gaseoso)	10 ppb a 15,6 ppb
Hidrocarburos (C ₅ – C ₁₀)	2000 a 6000 ppm
Hidrocarburos (C ₂ – C ₄)	2000 a 6000 ppm

Fuente: Praxair Perú (2007).

1.4.3.2 Tratamiento en atmósfera modificada con monóxido de carbono (CO) en el músculo del pescado

Se emplea el tratamiento en atmósfera modificada con monóxido de carbono porque se busca un cambio en el color del músculo del pescado sin embargo investigaciones han demostrado que también tiene un efecto sobre los microorganismos productores de histamina.

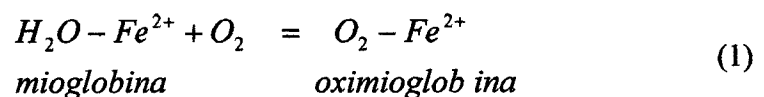
Los efectos que se producen en el tratamiento en atmósfera modificada con monóxido de carbono (CO) en el músculo del pescado se detallan a continuación:

a) Cambio en el color del músculo del pescado

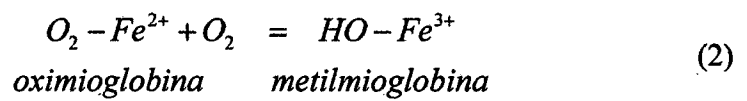
Kaneko (2003), afirma que el color de músculo de atún de buena calidad cambia de rojo a marrón, este cambio produce la degradación de la calidad del pescado.

Estos cambios de color reflejan la oxidación química de mioglobina y hemoglobina dentro del músculo.

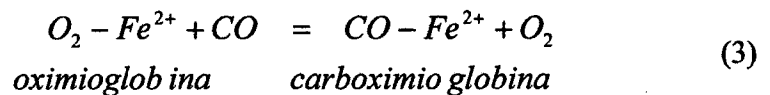
La mioglobina que se encuentra en la sangre del pescado contiene ion hierro hidratado (H_2O-Fe^{2+}), este ion Fe^{2+} se une con el oxígeno molecular añadido durante el rigor mortis del pescado, el oxígeno desplaza a la molécula del agua que se comporta como un anión de tal modo que se forma un nuevo producto denominado oximioglobina (O_2-Fe^{2+}) como lo sostiene Kaneko (2003).



La oximioglobina va a seguir oxidándose con el oxígeno que está alrededor del pescado de tal manera que pierde un electrón (Fe^{3+}) y a la vez gana un átomo de hidrógeno formándose la metilmioglobina ($HO-Fe^{3+}$), cambiando la estructura molecular del filete y adquiriendo un color marrón como lo sostiene Kaneko (2003).



El tratamiento en atmósfera modificada con monóxido de carbono (CO) durante la autólisis del pescado detiene la oxidación del ion Fe^{2+} . El oxígeno molecular va a ser desplazado por el CO, formándose un nuevo producto que es la carboximioglobina que está conformada por una molécula de monóxido de carbono (CO) que se comporta como un anión y el ion Fe^{2+} que se comporta como un catión, este producto da la coloración rojo cereza intenso en el filete del perico como lo sostiene Kaneko (2003).



Balaban y col. (2005); Chow y col.(1997); Chow y col.(1998); Danyali (2004); Demir y col.(2004); Garner (2004); Hsieh y col.(1998);

Kristinsson y col.(2003); Ross (2000); Kaneko (2003), demuestran que el uso de monóxido de carbono (CO) en el músculo del pez influye enormemente en el color rojo, lo cual produce un incremento del valor a^* (rojez) pero no tiene mucho efecto sobre los valores de L^* (luminosidad) y b^* (amarillo).

Kristinsson y col. (2006) realizaron estudios sobre el modo en que el monóxido de carbono (CO) y los tratamientos con humo de leña filtrado afectaban la calidad del músculo de pescado. La investigación consistió en almacenar filetes de atún aleta amarilla y mahi mahi en diversas concentraciones de monóxido de carbono (CO): 100% CO, humo filtrado (FS) con 18% de CO, 18% de CO, 4% de CO; durante 48, 32 y 24 hrs a una temperatura de 4 °C. Para determinar la coloración se utilizó un colorímetro de minolta. Los resultados arrojaron un aumento en la rojez en todos los tratamientos (aumento del valor a^*), pero el valor a^* disminuía a medida que la concentración de CO era menor, llegando a la conclusión:

“El monóxido de carbono tuvo un efecto estabilizador importante en la hemoglobina del pescado, lo que se tradujo en una mayor resistencia a la desnaturalización de la hemoglobina, auto-oxidación (y por lo tanto cambio de color) y una menor actividad pro-oxidativa. Estos resultados sugieren que los problemas de calidad que surgen de

las hemo-proteínas de los alimentos acuáticos probablemente disminuyen al ser tratados con monóxido de carbono y humo de leña filtrado”.

b) Disminución en la concentración de histamina en el músculo del pescado

Balaban y col. (2005) realizaron una investigación para determinar si el tratamiento en atmósfera modificada en el filete de perico provoca una reducción de microorganismos aeróbicos. Los filetes de perico fueron tratados con 100 % de CO y humo filtrado (18 % CO, 21 % CO₂) durante 24 y 48 h a una temperatura de 4°C; obteniendo como conclusión que:

“A mayor tiempo de almacenamiento con humo filtrado o con 100 % de monóxido de carbono resulta una reducción de los microorganismos aerobios y por ende menor concentración de histamina en el filete de perico”.

“El tratamiento con humo filtrado causa la mayor reducción de microorganismos en el filete de perico comparado con el tratamiento con un gas al 100 % CO a 4°C”.

Kristinsson y col. (2006) realizaron estudios sobre el modo en que el monóxido de carbono y los tratamientos con humo de leña filtrado afectaban la calidad del musculo del pescado. Se almacenaron filetes de atún aleta amarilla y perico en diversas concentraciones de monóxido de carbono (CO): 100% CO, humo filtrado (FS) con 18% de CO, 18% de CO, 4% de CO; durante 48 hrs a una temperatura de 4 °C, llegando a la conclusión:

“El tratamiento con monóxido de carbono y con humo de leña filtrado redujeron los cálculos de microbios aeróbicos y extendieron el tiempo de almacenamiento tanto del perico como del atún, probablemente como resultado de la reducción de oxígeno. Las muestras tratadas desarrollaron histamina tanto durante el tratamiento con gas como en el almacenamiento, sin embargo la histamina se desarrollaba más lentamente a medida que aumentaba el porcentaje de monóxido de carbono, indicando que tenían un efecto sobre los microorganismos que forman histamina”.

1.4.3.3 Reglamentación del uso de monóxido de carbono en pescados y derivados

De acuerdo a las reglamentaciones previas y actuales de los Estados Unidos el monóxido de carbono es un aditivo para los alimentos. A partir de marzo del 2000 la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA sus siglas en ingles), pide que todos los productos del mar tratados con humo filtrado, humo insípido o con monóxido de carbono industrial incluyan la información en la etiqueta como seria para cualquier otro ingrediente. La finalidad de que se etiqueten los productos tratados con monóxido de carbono, en sus diversas presentaciones, es que permite al consumidor fijarse en otros indicadores de frescura y no en el color a la hora de elegir.

1.4.4 ÍNDICE DE CALIDAD EN PRODUCTOS PESQUEROS

Mietz y Karmas (1977); Veciana-Nogués y col. (1997); propusieron que en el caso concreto del pescado la determinación de las aminas biógenas como evaluación del estado higiénico – sanitario de la materia prima y sus derivados debido a que su formación ha estado ligada a un almacenamiento incorrecto o al uso de materia prima de baja calidad.

Bardócz (1995), refiere que el pescado fresco, debería presentar cantidades nulas o insignificantes de aminas biógenas (a excepción de las poliaminas

fisiológicas), ya que asumiendo su origen bacteriano y la baja capacidad formadora de la flora saprófita del pescado, su presencia se relacionaría con una manipulación no adecuada.

Paralelamente al estudio de la formación de aminas biógenas durante los procesos de deterioro del pescado investigadores como Mietz y Karmas (1977); Veciana-Nogués y col. (1997); Chytiri y col. (2004); Paleologos y col. (2004) han realizado seguimientos microbiológicos y organolépticos dando como conclusión que la aparición de las aminas es generalmente anterior a la aparición de signos organolépticos de deterioro, de aquí que se sugiera el uso de ciertas aminas biógenas como índices químicos objetivos para valorar la frescura y/o deterioro del pescado.

1.4.4.1 Histamina, amina biógena como índice de calidad higiénico-sanitaria en el pescado

En el pescado se acepta que el contenido elevado de histamina (amina biógena) es fruto de la actividad aminoácido descarboxilasa que presentan algunos microorganismos y es por ello que su determinación se ha propuesto para reflejar el índice de calidad higiénico – sanitaria en el pescado. Brink y col. (1990); Halász y col. (1994).

La determinación de la histamina como de las otras aminas biógenas se centra en la necesidad de controlar algunas de ellas ya que se han descrito problemas toxicológicos (intoxicación histamínica) relacionados con el consumo de pescado que presentaba contenidos elevados de esta sustancia.

Los pescados involucrados son aquellos con un alto contenido de histidina como los pertenecientes a las familias *Scomberesocidae* y *Scombridae* y en las familias *Clupeidae* y *Scaridae*.

En el cuadro 9 se puede apreciar una calificación de pescados pertenecientes a las familias *Scomberesocidae* y *Scombridae* y a la familia *Clupeidae* y *Scaridae* en base a su concentración de histamina como índice de calidad realizada por Armstrong (2002).

Cuadro 9. Índice de calidad en pescados susceptibles a formar histamina.

Concentración de histamina (ppm)	Calificación	Descripción
Menor a 50	Pescado seguro	Presenta un buen índice de calidad y esta aumenta a medida que la concentración de histamina disminuye.
50 a 200	Posiblemente tóxico	Riesgo para el consumo humano.

200 a 1000	Probablemente tóxico	No apto para el consumo humano.
------------	----------------------	---------------------------------

Fuente: Fernández Jeri, Armstrong (2002).

Desde la perspectiva legal, solo se han fijado límites tolerables para la histamina en pescados y en productos derivados. Así, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) (1998) propuso como nivel máximo 50 ppm para pescados y derivados. La Comunidad Europea reglamenta (91/493/CEE), para los pescados de las familias de los escómbridos y clupeidos, un límite más elevado: un valor promedio máximo de 100 ppm en un grupo de nueve muestras de pescados fresco o enlatado.

a) Efecto de la temperatura y tiempo en la producción de histamina

El efecto de la temperatura y tiempo en la producción de histamina está relacionado con el crecimiento bacteriano, la inducción a la actividad aminoácido descarboxilasa y en la actividad enzimática en general.

Millán y col. (2003) realizaron una investigación sobre el “Efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la calidad microbiológica y la producción de histamina en la lisa (*Mugil*

curema)". Se empleo 20 ejemplares almacenados a 0, 6 y 25°C y se tomo muestras a 24, 48, 72 y 96 horas para realizar el recuento de aerobios mesófilos (RAM), concentración de histidina e histamina, identificación de bacterias productoras de histamina. Los resultados mostraron que a 0 °C no se detectaron diferencias significativas en RAM, mientras que a 6 y 25 °C se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) a partir de 96 y 24 horas respectivamente. La concentración inicial de histidina fue de 1333,9 ppm, que a 0 °C varió hasta 2025,4 ppm, sin diferencias significativas. A 6 °C disminuyó hasta 528,7, detectándose diferencias significativas ($p < 0,05$) a partir de 96 horas, mientras a 25 °C disminuyó a 137,5 ppm, detectándose diferencias significativas ($p < 0,05$) a las 24 horas. A las temperaturas de 0 y 6 °C las concentraciones de histamina fueron inferiores a 10,65 ppm; mientras que a 25 °C se observaron incrementos significativos ($p < 0,05$) a las 48 horas, alcanzándose una concentración final de 1288,7 ppm. El mayor porcentaje de bacterias productoras de histamina correspondió a la familia Enterobacteriaceae (62 %). *Vibrio damsella* produjo la mayor concentración de histamina, 659 ppm. Se concluyó que el tiempo y la temperatura de almacenamiento afectan el RAM y la producción de histamina en la lisa, su almacenamiento a 0 y 6 °C retarda la actividad bacteriana y limita la producción de histamina durante 96 horas.

1.5 DEFINICIONES

1.5.1 AMINAS BIÓGENAS

Las aminas biógenas son compuestos orgánicos nitrogenados de carácter básico y de bajo peso molecular, presentes en animales, plantas y microorganismos como consecuencia de procesos metabólicos, Brink y col. (1990); Halász y col. (1994) .

Marine-Font y col. (1995) clasificaron las aminas biógenas en base a su estructura química. Establecieron tres grandes grupos:

- Aminas aromáticas: histamina, B-feniletilamina, tiramina, octopanina, dopamina, serotonina y triptamina.
- Diaminas alifáticas: putrescina y cadaverina.
- Poliaminas alifáticas: agmatina, espermina, espermidina.

1.5.2 HISTIDINA

Es un aminoácido libre que se encuentra en el musculo del pez. En los peces el contenido natural del aminoácido libre histidina puede superar el 20% del peso de la carne. Valiente, O. (2001).

1.5.3 HISTAMINA

Es un compuesto orgánico nitrogenado, posee un grupo amino (NH_2), de carácter básico y de bajo peso molecular. Brink y col. (1990); Halász y col. (1994).

La estructura química de la histamina se presenta a continuación:

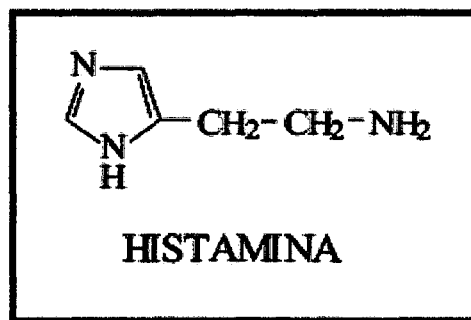


Figura 15. Estructura química de la histamina.

Fuente: Sánchez Cascado, Sofia Pons (2005).

Se forma cuando la musculatura del pescado se encuentra en estado post mortem. La acción proteolítica de las catepsinas causa la degradación de la proteína de pescado a aminoácidos y bajo la acción de descarboxilación bacteriana se forma el compuesto amino no volátil, la histamina. El aminoácido importante iniciador de la degradación es la histidina. A continuación en la figura 16 se presenta la formación de la histamina.

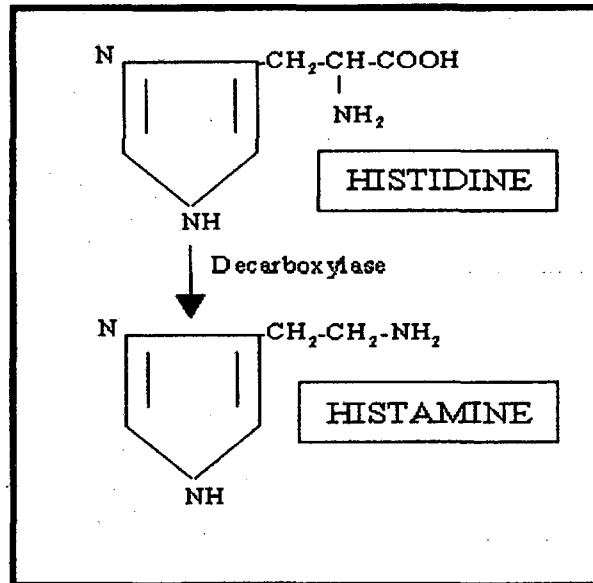


Figura 16. Formación de la amina biógena (histamina) a partir del aminoácido precursor (histidina).

Fuente: Sánchez Cascado, Sofia Pons (2005).

1.5.4 INTOXICACIÓN HISTAMÍNICA

Es una intoxicación alimentaria producida por la ingestión de alimentos con cantidades elevadas de histamina, Taylor (1986). Este trastorno está especialmente relacionado al consumo de pescado que pertenece a las familias Scomberesocidae y Scombridae.

Entre las bacterias productoras de histamina se pueden mencionar a grupos de *Enterobacteriaceae*, ciertos *Vibrio* sp., *Clostridium* y *Lactobacillus* sp. Estas

bacterias se desarrollan en un amplio rango de temperaturas pero la mayoría son mesófilas (*M. morganii*).

Las enterobacterias se han descrito como grandes formadores de histamina en pescado, Chen y col. (1989); Beutling (1996) dentro de esta familia, los generos *Proteus* (Du y col. (2002)) y *klesiella* (Hernández-Herrero y col. (1999)) son los que más se han relacionado con la capacidad de descarboxilación de la histidina.

CAPÍTULO II

MARCO METODOLOGÍCO

La metodología del trabajo de investigación consta de dos partes. La primera parte consistió en caracterizar física, química y microbiológicamente el filete de perico con y sin tratamiento en atmósfera modificada. Para la caracterización física - organoléptica se empleó el análisis de Witffogel (1987), Nielsen (1995) y Sánchez-Cascado (2005); en cuanto a la caracterización química se determinó la concentración de histamina y la caracterización microbiológica fue corroborada por los reportes de calidad de la empresa Certificaciones del Perú S.A (CERPER). De esta manera se determinó el grado de calidad de los filetes de perico con tratamiento en atmosfera modificada.

La segunda parte comprende el acondicionamiento de la muestra según los parámetros del tratamiento experimental para realizar el análisis de histamina con el equipo Veratox y proceder a su lectura de densidad óptica con el lector ELISA, en seguida los datos fueron introducidos en el software Veratox para obtener los resultados de la concentración de histamina de los tratamientos. Luego los resultados fueron introducidos en el software STATGRAPHICS PLUS V. 5,1. para su análisis estadístico.

2.1 MATERIALES

Esta sección comprende la metodología seguida para la caracterización física, química y microbiológica del filete de perico y para el tratamiento experimental.

2.1.1 EN CAMPO

La aplicación del tratamiento con atmósfera modificada comenzó en la sala de inyección de gas con la inyección de gas (normal y ecológico) dentro de una bolsa que contiene el filete. Luego la bolsa que contiene el filete y gas fueron llevados hacia la pre - cámara de almacenamiento.

La materia prima, aditivos, materiales y procedimientos empleados en el proceso (campo) se detalla a continuación:

a) Materia prima

- Filetes de perico (*Coryphaena hippurus*).

b) Aditivos

- 2 Balones de mezcla gaseosas (1 balón de gas normal y 1 balón de gas ecológico), marca: Praxair Perú, de capacidad de 6,8 m³.

c) Materiales

- 1 Mesa metálica.
- Canastillas de plástico polimerizadas
- Bolsas de polietileno con una densidad 3 µm.
- Rollos de plástico de polietileno para cubrir mesas de trabajo.
- Balanza electrónica de plataforma, Henkel BCHSM60, USA, precisión: 1/3000 FS; exactitud: +/- 10 g y rango: 0 - 60 kg.
- 02 termómetros de punzón jumbo FOV, 11060, exactitud: +/- 0.5 °C, rango: - 40°C a 150 °C.
- 01 cronometro digital con memoria, Cebek CD-33, España, exactitud 0.00001 s y rango: 0.01 s a 99 h. 59.99 s.

d) Procedimiento

- Los filetes fueron acondicionados dentro de una cámara térmica donde se modificó la temperatura según el valor requerido (4°C para la caracterización y 0°C o 10°C para el tratamiento experimental).

- Los filetes a la temperatura deseada son llevados hacia la sala de inyección para ser puestos dentro de bolsas de polietileno (3 μm) e inyectados con un tipo de gas (normal o ecológico) en seguida se amarra la abertura de la bolsa.

- La bolsa que contiene el filete con el gas son llevados hacia la pre-cámara que previamente se ha graduado la temperatura, donde serán almacenados según el tiempo de reposo requerido (18 h para la caracterización y 10 h ó 24 h para el tratamiento experimental).

- Terminado el tiempo de reposo las muestras destinadas para las caracterización física – organoléptica se analizan mientras que las muestras para la caracterización química y tratamiento experimental son llevadas al laboratorio para realizar la lectura de la concentración de histamina.

Asimismo la muestra destinada para la caracterización microbiológica será analizada por un laboratorio particular.

2.1.2 EN LABORATORIO

El equipo Veratox para histamina es un enzimoimmunoanálisis de adsorción directo competitivo (CD-ELISA, por sus siglas en ingles) que permite obtener concentraciones exactas de histamina expresadas en partes por millón (ppm), cuyo fundamento técnico consiste en la utilización de anticuerpos específicos (con los cuales han sido cubiertos micropozos) para la sustancia buscada, en este caso la histamina.

a) Materiales

- Micropozos desglosables recubiertos con anticuerpos.
- Micropozos desglosables para mezclado con marca roja.
- 01 pipeta de 100 uL, Mettler Toledo, Pos-D, España, exactitud +/- 0,5 uL, y precisión: 0,8 % - 2 %.
- Puntas para pipetas de 100 uL.
- Vasos precipitados de 250 mL, Pirex, USA, exactitud +/- 0.5%.
- Papel filtro.
- Frascos pequeños.

- 01 portapozos.
- 01 marcador a prueba de agua.
- Toallas de papel absorbentes.
- 01 mortero.
- 01 reloj.
- 01 balanza digital, OEM YH014, China, precisión: 0,1 g, exactitud +/- 0,001 y rango: 0.001 - 5 kg,
- Lector Elisa, Neogen Corporation, EE. UU., exactitud: +/- 1%, rango: -0.2 a 3 unidades de absorbancia.

b) Reactivos

- 01 frasco de agua destilada.
- Solución conjugada de enzima-histamina.
- Solución control de histamina de 0, 2.5, 5, 10, 20 y 50 ppm.
- Polvo buffer diluyente (fosfato salino) para extracto de muestra.
- Solución buffer de lavado concentrado (fosfato salino y polisorbato).
- Solución azul de sustrato tetrametilbenzidina.
- Solución roja de sustratos tetrametilbenzidina (TMB).



Figura 17. Materiales de laboratorio.

Fuente: Elaboración propia.

c) Procedimiento

- Preparación de la muestra: Se pesa 10 g de una muestra, de acuerdo a la primera fila del cuadro 10, luego se procede a trozar finamente con una tijera y desmenuzar con un mortero, la muestra se coloca dentro de una bolsa plástica gruesa.

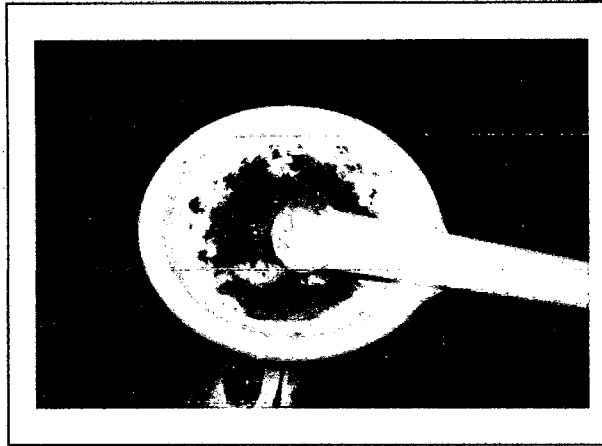


Figura 18. Muestra extraída y desmenuzada del filete de perico.

Fuente: Elaboración propia.

- Preparación del extracto: se determina la relación muestra – agua destilada para la dilución del extracto filtrado indicado en el cuadro 10, en este caso es de 90 mL por cada 10 g de muestra homogenizada.

Cuadro 10. Relación muestra – agua destilada para la dilución del extracto filtrado en pescados y conservas.

Concentración de histamina (ppm)	Muestra homogenizada (g)	Agua a adicionar (mL)	Mezclado y filtrado	Dilución del extracto filtrado
0 - 50	10	90	Si	Mezclar 100 uL con 10 mL de diluyente de extracto para muestra.
10 - 200	10	90	Si. Luego mezclar en un vaso pequeño 100 uL con 300 uL de agua	Mezclar 100 uL con 10 mL de diluyente de extracto para muestra.
200 - 1000	10	90	Si. Luego mezclar en un vaso pequeño 100 uL con 1,9 mL de agua	Mezclar 100 uL con 10 mL de diluyente de extracto para muestra.
125 - 2500	10	90	Si. Luego mezclar en un vaso pequeño 100 uL con 4,9 mL de agua	Mezclar 100 uL con 10 mL de diluyente de extracto para muestra.

Fuente: Neogen Corporation (2009).

- Como se conoce la concentración inicial de histamina de las muestras, 3 ppm, se asume que la concentración final de histamina no supera las 50 ppm, es por esta razón que se consideró la primera relación muestra – agua destilada (sombreada de color cereza) del cuadro 10.



Figura 19. Muestra en bolsa plástica.

Fuente: Elaboración propia.

- La mezcla se agita vigorosamente por 20 s. para luego reposar por 5 min. Repetir el paso anterior una vez más. Finalmente se agita por 20 s. y se deja sedimentar por 30 s.
- Con la mezcla sedimentada se filtra el sobrenadante usando papel de filtración rápido y luego se coloca el extracto en un vaso precipitado limpio y seco.



Figura 20. Filtración del sobrenadante.

Fuente: Elaboración propia.

- Lectura de histamina: obtenido el extracto se realiza la lectura de histamina de una muestra para ello se separan 7 micropozos de mezclado (rojos) siendo 1 para muestra y 6 para los controles. También se separan 7 micropozos con anticuerpos (blancos).

- Usando 1 sola punta de pipeta, se adiciona 100 uL de conjugado enzima - histamina a todos los micropozos rojos.

- Usando 1 nueva punta de pipeta se adiciona 100 uL del primer control de histamina seleccionado (0 ppm) al primer micropozo rojo. Con esa misma punta se mezcla el contenido 3 veces (aspirar y botar en forma suave). Usando 1 nueva punta de pipeta se adiciona 100 uL del segundo control de histamina seleccionado (2,5 ppm) al segundo micropozo rojo.

Con esa misma punta se mezcla el contenido 3 veces (aspirar y botar en forma suave). Se procede de la misma forma con el resto de controles de histamina seleccionados (5, 10, 20 y 50 ppm).

- Usando una nueva punta por cada muestra, se adiciona 100 uL de extracto filtrado y diluido a su correspondiente micropozo rojo. Con esa misma punta se mezcla el contenido 3 veces (aspirar y botar en forma suave).
- Con puntas nuevas se transfiere 100 uL del micropozo rojo a su correspondiente micropozo blanco (para cada micropozo rojo se debe usar una punta nueva).
- Al completar la transferencia de todos los micropozos blancos se agita de forma suave por deslizamiento en superficie plana por 20 s. Se descartar los pozos rojos.
- Se Incuba por 10 min los micropozos blancos (en oscuridad).
- Después de la incubación se elimina el contenido de los micropozos blancos. Se golpea energéticamente los micropozos sobre papel toalla para eliminar los residuos líquidos. Se llena los micropozos con la solución buffer de

lavado. Se vota el líquido y se repite 3 veces más. Después de votar la última solución de lavado se golpea rápida y energéticamente los micropozos sobre el papel toalla para eliminar residuos líquidos.

- Usando una nueva punta de pipeta por cada micropozo se adiciona 100 μ L de sustrato K-Blue a todos los micropozos. Se agita por deslizamiento en superficie plana por 20 s.

- Se Incuba por 10 minutos en oscuridad.

- Usando una nueva punta pipeta por cada micropozo se adiciona 100 μ L de solución Red Stop a todos los micropozos. Se agita por deslizamiento en superficie plana por 20 s.

- Con los micropozos conteniendo la solución Red Stop se realiza la lectura instrumental para ello se emplea un lector ELISA de pozos equipado con filtro de 650 nm el cual nos proporciona los datos de las densidades ópticas de los controles y de la muestra.

- Las densidades ópticas de los controles y de la muestra son ingresados en el protocolo correspondiente al software

Veratox para obtener la concentración de histamina de la muestra.



Figura 21. Lector ELISA equipado con 650 nm.

Fuente: Elaboración propia.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.2.1.1 Diseño factorial 2^k

Este diseño tiene por objeto el estudio del efecto sobre una respuesta de k factores, cada uno de 2 niveles, Montgomery (2002).

$$2^k \quad (4)$$

donde:

2: numero de valores de los factores.

k : numero de factores.

En la presente investigación busca conocer el efecto de los k factores del tratamiento con atmosfera modificada sobre la formación de histamina en el filete de perico que es la variable respuesta.

Los k factores del tratamiento en atmósfera modificada y los valores de sus niveles se aprecian en el cuadro 11.

Cuadro 11. Factores del tratamiento con atmósferas modificadas y los valores de sus niveles.

Factor	Nivel alto (+1)	Nivel bajo (-1)
Temperatura del filete (°C)	0	10
Tiempo de reposo (h)	10	24
Tipo de gas	Gas normal	Gas ecológico

Fuente: Elaboración propia.

Siendo $k = 3$, reemplazando en (4) tenemos:

$$2^k = 2^3 = 8 \quad (5)$$

Entonces son 8 los experimentos llevados a cabo.

Se realizó 3 replicas del diseño obteniéndose 24 unidades experimentales analizadas.

En la matriz de diseño del cuadro 12 se presenta los valores actuales y codificados de los factores o variables independientes.

Cuadro 12. Matriz de diseño con valores actuales y codificados de las variables independientes para el tratamiento con atmósfera modificada.

Número de experimentos	Valores actuales			Valores codificados			Concentración de Histamina
	Temperatura del filete (T)	Tiempo de reposo (t _m)	Tipo de gas (θ)	Temperatura del filete (T)	Tiempo de reposo (t _m)	Tipo de gas (θ)	
1	0	10	ecológico	-1	-1	-1	Y ₁
2	10	10	ecológico	+1	-1	-1	Y ₂
3	0	24	ecológico	-1	+1	-1	Y ₃
4	10	24	ecológico	+1	+1	-1	Y ₄
5	0	10	normal	-1	-1	+1	Y ₅
6	10	10	normal	+1	-1	+1	Y ₆
7	0	24	normal	-1	+1	+1	Y ₇
8	10	24	normal	+1	+1	+1	Y ₈

Fuente: Elaboración propia.

2.2.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la relación de la variable respuesta, en este caso la concentración de histamina con respecto al tratamiento en atmosferas modificadas, variables independientes, se utilizó el análisis de varianza, y dentro de este análisis se contrastó la hipótesis mediante dos estadísticos, tal es el caso del p – valor y el estadístico F. Luego se verificó la linealidad de la relación mediante el análisis residual.

2.2.2.1 Análisis de varianza

Se empleó el presente análisis debido a que se busca la significancia o insignificancia de la concentración de histamina con respecto a las variables independientes como la temperatura del filete, tiempo de reposo y tipo de gas, usando para ello los estadísticos F, comparado con el F tabulado y p-valor, cuando este valor es $< 0,01$ se dice que el efecto es altamente significativo, cuando este valor oscila entre $0,01 < p < 0,05$; se dice que el efecto es probablemente significativo y cuando $p > 0,01$; se dice que el efecto es insignificativo, toda esta aseveración a un nivel de confianza del 95 % y con un grado de correlación del 90,8 %. Finalmente se aplica el análisis residual para

determinar la linealidad entre las variables, Montgomery (2002).

2.2.2.2 Software STATGRAPHICS PLUS V. 5,1

El STATGRAPHICS PLUS V. 5,1; es un programa para gestionar y analizar valores estadísticos. Comprende cuatro módulos principales: un editor estadístico (StatReport) que prepara informes con datos variables; un asistente estadístico (StatWizard) que sugiere los métodos más adecuados para recopilar y analizar datos; y un enlace estadístico (StatLink) que enlaza el libro de análisis (Statfolio) con la fuente de datos.

Este software se destaca especialmente por sus capacidades para la representación gráfica de todo tipo de estadísticas y el desarrollo de experimentos, previsiones y simulaciones en función del comportamiento de los valores. Asimismo determina el gráfico de Pareto, análisis de varianza, el grado de correlación, el nivel de significancia, análisis residual y representación gráfica de la variable respuesta frente a las variables independientes, Araujo y Gandur (2008).

CAPÍTULO III

DISCUSION DE RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA, QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL FILETE DE PERICO (*Coryphaena hippurus*) CON Y SIN TRATAMIENTO CON ATMÓSFERA MODIFICADA

Se realizó el análisis a tres muestras de filete de perico, las cuales son: una muestra control, una muestra tratada con gas normal y otra tratada con gas ecológico. Las tres muestras fueron puestas dentro de una cámara de refrigeración a una temperatura de 4°C por un tiempo de almacenamiento de 18 h.

3.1.1 FÍSICO SENSORIAL

Consistió en la evaluación del olor, color, textura y sabor del filete de perico. Siendo el olor y textura evaluados en base a la calificación propuesta por Witffogell (1987) (ver anexo 6), el color en base a la calificación propuesta por Nielsen (1995) (ver anexo 7), mientras que el sabor se evaluó en base a la calificación propuesta por Sofía Pons (2005) (ver anexo 8).

A continuación se presenta los puntajes establecidos de los parámetros mencionados con anterioridad:

a) Olor

La calificación del olor de la muestra sin tratamiento es “neutral”, mientras que las muestras tratadas con gas normal y gas ecológico obtuvieron una calificación a “fresco”. Calificación según Wittfogell (1987).

Cuadro 13. Calificación y puntaje del olor.

Tratamiento	Calificación	Puntaje
Sin tratamiento	Neutral	2
Gas ecológico	Fresco	3
Gas Normal	Fresco	3

Fuente: Elaboración propia.

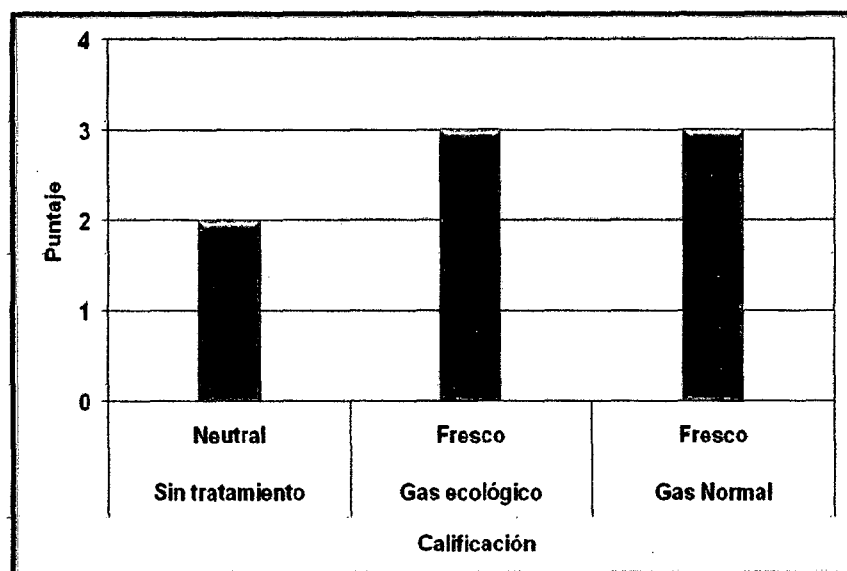


Figura 22. Evaluación del olor del filete de perico con y sin tratamiento con atmósfera modificada.

Fuente: Elaboración propia.

La muestra control presentó una calificación de olor “neutral”, Wittfogell (1987) menciona que la calificación de “neutral” se designa cuando el olor es ligeramente ácido, parecido al de la cerveza. Asimismo Brink y col. (1966) manifiesta que el olor y sabor ácido se debe a la presencia del nucleótido hipoxantina, el cual le imparte un olor y sabor ácido o amargo al pescado en proceso de deterioro.

Las 2 muestras con tratamiento en atmosferas modificadas con gas normal y gas ecológico presentaron una calificación de olor a “fresco”, Wittfogell (1987) designa esta calificación cuando el olor es específico lo cual demuestra que las reservas de energía de ATP y glucógeno casi han desaparecido mientras se acumulan los primeros nucleótidos como la inosina monofosfato (IMP) que es un nucleótido insípido, Brink y col. (1966).

b) Textura

La calificación de la textura de la muestra sin tratamiento es “blanda”, mientras que las muestras tratadas con gas normal y gas ecológico obtuvieron una calificación de “poco firme”. Calificación según Wittfogell (1987).

Cuadro 14. Calificación y puntaje de la textura.

Tratamiento	Calificación	Puntaje
Sin tratamiento	Blanda	1
Gas ecológico	Poco firme	3
Gas Normal	Poco firme	3

Fuente: Elaboración propia.

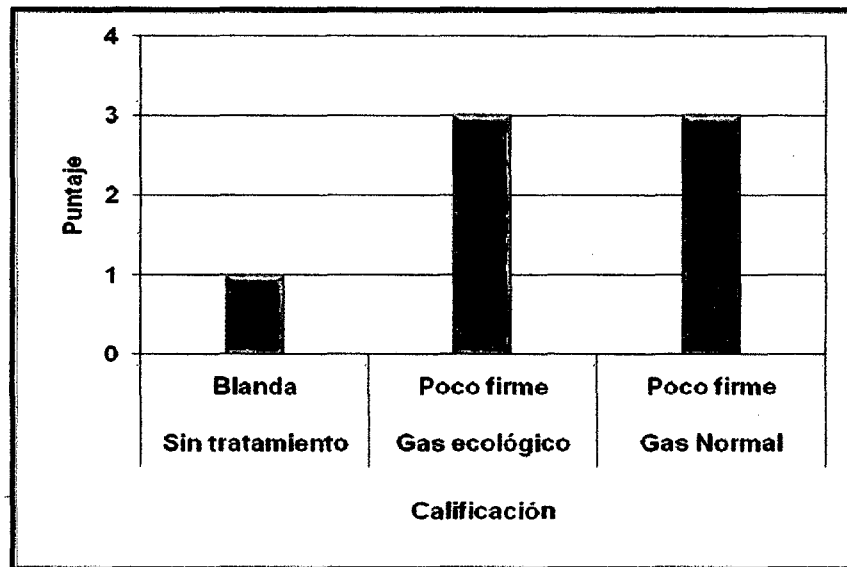


Figura 23. Evaluación de la textura del filete de perico con y sin tratamiento con atmósfera modificada.

Fuente: Elaboración propia.

La muestra control presento una calificación “blanda” en su textura de debido a que la temperatura y el tiempo de almacenamiento aplicadas (4°C y 18 h) favorecen las pérdidas de reservas de energía celular que se traducen en un desequilibrio químico intracelular que activan ciertas enzimas endógenas proteolíticos, generando rupturas de los enlaces péptidos que provocan el ablandamiento de la estructura muscular, Brink y col. (1966).

Las 2 muestras tratadas con gas normal y gas ecológico presentaron una textura “poco firme” a diferencia de la muestra control. Esta textura se debe a existido poca actividad de las enzimas endógenas en contra de las proteínas.

c) Color

La muestra sin tratamiento presenta una calificación de color “traslucido”, mientras que las muestras tratadas con gas normal y gas ecológico obtuvieron una calificación de “rojo cereza”. Calificación según Nielsen y col (1992).

Cuadro 15. Calificación y puntaje del color.

Tratamiento	Calificación	Puntaje
Sin tratamiento	Traslucido	1
Gas ecológico	Rojo cereza	4
Gas Normal	Rojo cereza	4

Fuente: Elaboración propia.

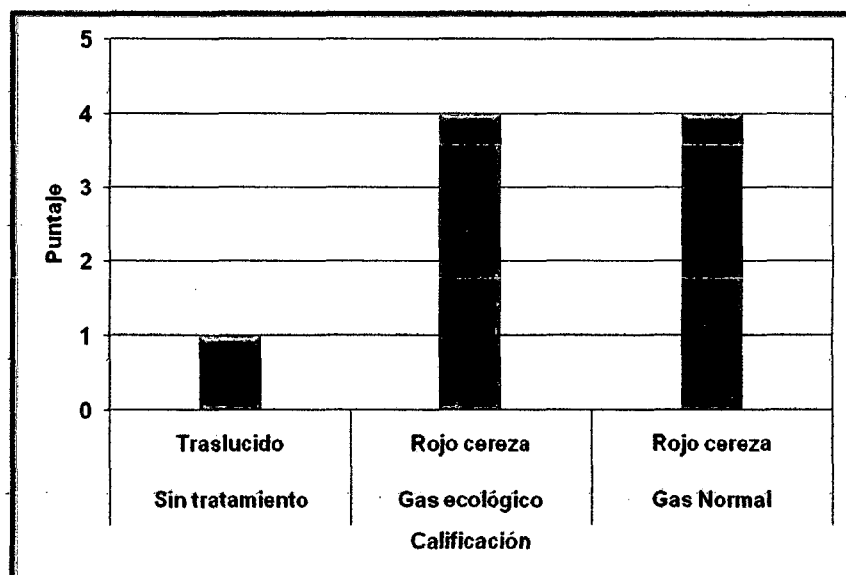


Figura 24. Evaluación del color del filete de perico con y sin tratamiento con atmósfera modificada.

Fuente: Elaboración propia.

La muestra control presento un color traslucido debido a las reacciones de oxidación del ion fierro de las hemo proteínas (hemoglobina y mioglobina) del pescado, obteniendo como producto final la metilmioglobina, que es de color marrón, tal como lo manifiesta Kaneko (2003). (Ver páginas 34 - 35)

Las 2 muestras tratadas con atmosfera modificada presentaron un color “rojo cereza” debido a que el monóxido de carbono (CO) presente en los dos gases se unió al ion fierro de las hemo proteínas (hemoglobina y mioglobina), desplazando al oxígeno y evitando su oxidación, obteniendo como producto final la carboximioglobina que es de color rojo cereza, tal como lo manifiesta Kaneko (2003). (Ver página 34 - 35)

d) Sabor

La calificación del sabor en la muestra sin tratamiento es “neutral”, mientras que las muestras tratadas con gas normal y gas ecológico obtuvieron una calificación de “suculento”. Calificación según Sánchez-Cascado (2005).

Cuadro 16. Calificación y puntaje del sabor.

Tratamiento	Calificación	Puntaje
Sin tratamiento	Neutral	7
Gas ecológico	Suculento	9
Gas Normal	Suculento	9

Fuente: Elaboración propia.

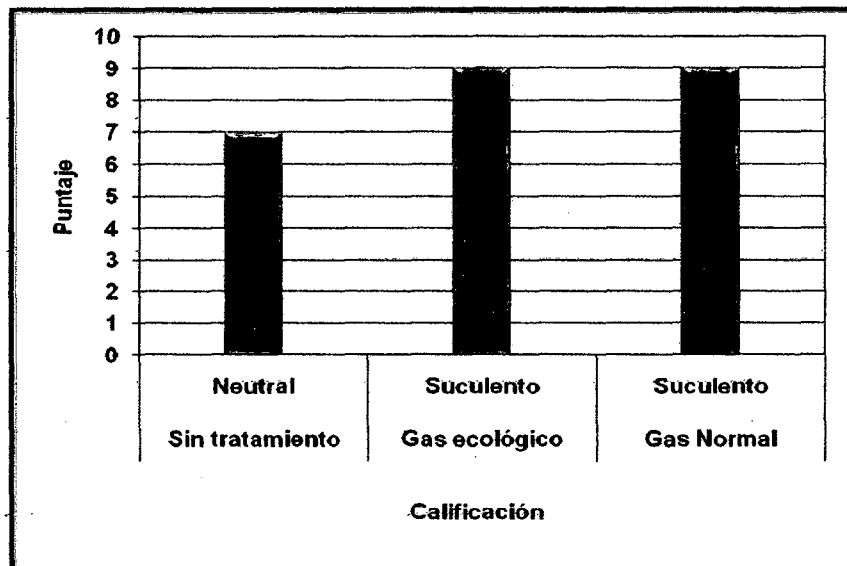


Figura 25. Evaluación del sabor del filete de perico con y sin tratamiento con atmósfera modificada.

Fuente: Elaboración propia.

Brink y col. (1966) manifiesta que el olor y sabor ácido se debe a la presencia del nucleótido hipoxantina, el cual le imparte un olor y sabor ácido o amargo al pescado en proceso de deterioro.

3.1.2 QUÍMICA

Consistió en realizar un análisis de histamina a las muestras para ello se empleo el equipo Veratox para histamina.

Cuadro 17. Análisis de la concentración de histamina del filete de perico con y sin tratamiento en atmósfera modificada.

Concentración de histamina (ppm)	Muestra		
	Sin tratamiento	gas ecológico	gas normal
Inicial	3	3	3
Final	25	6	6

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro 17 se aprecia que la mayor variación en la concentración de histamina fue con la muestra sin tratar en comparación con las muestras tratadas con atmósferas modificadas (gas ecológico y normal), siendo en estas últimas la variación menor. Esta variación refleja que la aplicación del tratamiento con atmósfera modificada produce un efecto en la concentración de histamina.

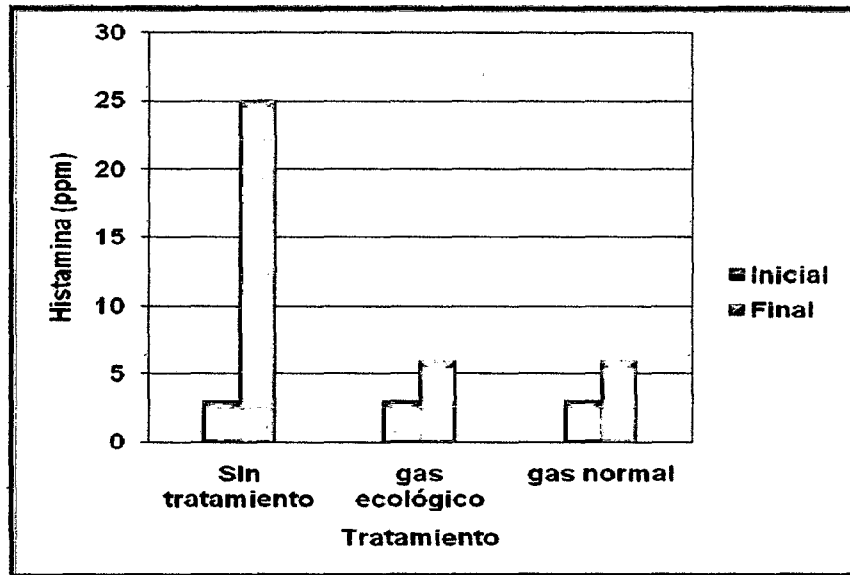


Figura 26. Concentración de Histamina con respecto a los tratamientos.

Fuente: Elaboración propia.

3.1.3 MICROBIOLÓGICO

El análisis microbiológico fue realizado por CERPER (Certificaciones del Perú S.A⁽²⁾).

Cuadro 18. Evaluación microbiológica de la muestra sin tratamiento.

Ensayos	Resultados					
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n ₅	n _x
Salmonella (/25 g)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Recuento en placa de aerobios mesófilos (UFC/g)	42x10 ⁴	32x10 ⁴	28x10 ⁴	23x10 ⁴	31x10 ⁴	31,2 x10 ⁴
Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positiva (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Fuente: Certificaciones del Perú S.A.

n₁, n₂, n₃, n₄ y n₅: muestras. **n_x:** promedio de las muestras.

(2) Laboratorio de análisis acreditado, según registro N° LE 003

Cuadro 19. Evaluación microbiológica de la muestra con gas normal.

Ensayos	Resultados					
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n ₅	n _x
Salmonella (/25 g)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Recuento en placa de aerobios mesófilos (UFC/g)	12x10 ⁴	30x10 ³	11x10 ⁴	18x10 ³	10x10 ⁴	7,6 x10 ⁴
Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positiva (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Fuente: Certificaciones del Perú S.A.

n₁, n₂, n₃, n₄ y n₅ : muestras. n_x : promedio de las muestras

Cuadro 20. Evaluación microbiológica de la muestra con gas ecológico.

Ensayos	Resultados					
	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄	n ₅	n _x
Salmonella (/25 g)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Recuento en placa de aerobios mesófilos (UFC/g)	11 x10 ⁴	2 x10 ⁴	13 x10 ⁴	15 x10 ⁴	20 x10 ⁴	12,2 x10 ⁴
Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positiva (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Fuente: Certificaciones del Perú S.A.

n₁, n₂, n₃, n₄ y n₅ : muestras. n_x : promedio de las muestras.

El recuento de aerobios mesófilos en las 3 muestras (control, gas normal y gas ecológico) no exceden los valores establecidos (10×10^5 - 10×10^6 UFC/g) por la Comisión Internacional de las Especificaciones de Microbiología para los Alimentos (ICMSF) (1985).

En la figura 27 se compara el recuento de aerobios mesófilos (productores de histamina) de las 3 muestras (control, gas normal y gas ecológico).

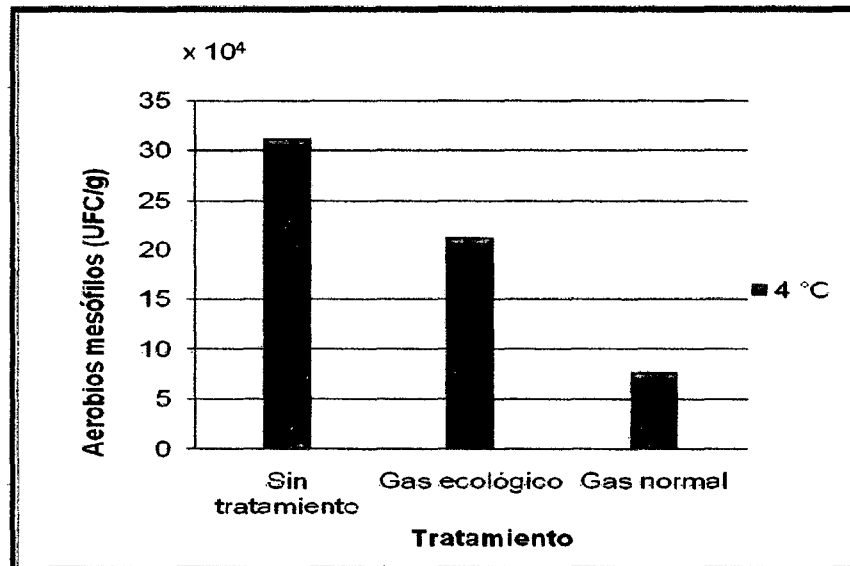


Figura 27. Aerobios mesófilos con y sin tratamiento con atmósfera modificada.

Fuente: Elaboración propia.

Se aprecia que los tratamientos con gas normal y gas ecológico presentan menor cantidad aerobios mesófilos comparados con la muestra control a 4°C.

3.2 EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON ATMÓSFERA MODIFICADA EN EL FILETE DE PERICO (*Coryphaena hippurus*).

3.2.1 TRATAMIENTO CON ATMÓSFERA MODIFICADA EN EL FILETE DE PERICO

Los cuadros 21, 22 y 23 presentan 24 ejecuciones experimentales, realizadas en 3 bloques. En cada cuadro se muestran los números 1, 2 y 3 que corresponden a la primera, segunda y tercera réplica.

Cuadro 21. Histamina con respecto a los factores, primera réplica.

Experimento	Bloque	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Tipo de gas	Densidad óptica (nm)	Histamina (ppm)
1	1	0	10	ecológico	1,3	10
2	1	10	10	ecológico	1,1	18
3	1	0	24	ecológico	1,4	5
4	1	10	24	ecológico	0,88	32
5	1	0	10	normal	1,3	10
6	1	10	10	normal	1,0	20
7	1	0	24	normal	1,4	5
8	1	10	24	normal	1,15	15

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 22. Histamina con respecto a los factores, segunda réplica.

Experimento	Bloque	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Tipo de gas	Densidad óptica (nm)	Histamina (ppm)
9	2	0	10	ecológico	1,1	17
10	2	10	10	ecológico	0,9	30
11	2	0	24	ecológico	1,1	17
12	2	10	24	ecológico	0,85	35
13	2	0	10	normal	1,4	10
14	2	10	10	normal	1,0	20
15	2	0	24	normal	1,48	3
16	2	10	24	normal	1,15	15

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 23. Histamina con respecto a los factores, tercera réplica.

Experimento	Bloque	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Tipo de gas	Densidad óptica (nm)	Histamina (ppm)
17	3	0	10	ecológico	1,0	20
18	3	10	10	ecológico	0,98	25
19	3	0	24	ecológico	1,1	17
20	3	10	24	ecológico	0,8	40
21	3	0	10	normal	1,3	10
22	3	10	10	normal	1,0	20
23	3	0	24	normal	1,4	5
24	3	10	24	normal	0,91	28

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro 24 se presenta los valores promedios de la concentración de histamina de las 3 replicas realizadas. Asimismo la variable respuesta de cada unidad experimental replicada guarda relación.

Cuadro 24. Valores promedios de la histamina con respecto a los factores.

Experimento	T	t _m	θ	H			Promedio
				1	2	3	
1	0	10	ecológico	10	17	20	15,7
2	10	10	ecológico	18	30	25	24,3
3	0	24	ecológico	5	17	17	13,0
4	10	24	ecológico	32	35	40	35,7
5	0	10	normal	10	10	10	10,0
6	10	10	normal	20	20	20	20,0
7	0	24	normal	5	3	5	4,3
8	10	24	normal	15	15	28	19,3

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro 24 se aprecia la variabilidad de la concentración de histamina con respecto a la combinación de niveles de los factores.

Esta variabilidad en la concentración de histamina que va desde 4,3 ppm, tratamiento 7 (menor concentración) hasta 35,7 ppm, tratamiento 4 (mayor concentración), este cambio es ocasionado por los distintos

tratamientos con atmósfera modificada (temperatura del filete, tiempo de reposo y tipo de gas). Estos resultados concuerdan con los presentados por Kristinsson y col. (2006) donde manifiestan que los tratamientos con humo de leña filtrado y con gas al 100% de monóxido de carbono durante 48 h a 4 °C, reducen el computo de microbios aeróbicos y por consiguiente la concentración de histamina.

En los tratamientos 1, 3, 5 y 7 (ver cuadro 24) a 0 °C, los tratados con gas normal presentan menor concentración de histamina comparado con los del gas ecológico, esto demuestra la efectividad del gas normal sobre el gas ecológico. Este resultado difiere de Balaban y col. (2005) donde manifiestan que “el tratamiento con humo filtrado causa mayor reducción de microorganismos en el filete de perico comparado con el tratamiento con un gas al 100% de monóxido de carbono a 4 °C”. Esta diferencia se debe a que el humo filtrado empleado por Balaban y col. (2005) contiene ciertos compuestos volátiles a los que se les atribuye un efecto antibacterial tal como lo manifiestan Kowalski (1999) y Hawaii International (1999), mientras que el gas ecológico (humo insípido) empleado en el presente estudio carece de dichos compuestos debido a su purificación.

Los tratamientos que tuvieron la menor temperatura (0 °C) (1, 3, 5 y 7) (ver figura 28) presentaron menores concentraciones de histamina comparado con los tratamientos que tuvieron la mayor temperatura

(10 °C) (ver figura 29). Esta diferencia es debida a la relacion directa de la temperatura y tiempo de almacenamiento con la formacion de histamina tal como lo manifiesta el FDA (1995), en su código de regulaciones sobre “Procedimientos para el proceso seguro y sanitario e importación de peces y productos de pesquería”, dicha relación queda demostrada en las muestras control tratadas a 0 °C y 10°C (ver figura 28 y 29). Además la temperatura también incide en el factor tipo de gas debido a que la mayor solubilidad del monóxido de carbono (CO) presente en los dos gases (ecológico y normal) se logra a bajas temperaturas tal como los manifiesta Daniel y Getmann (1948).

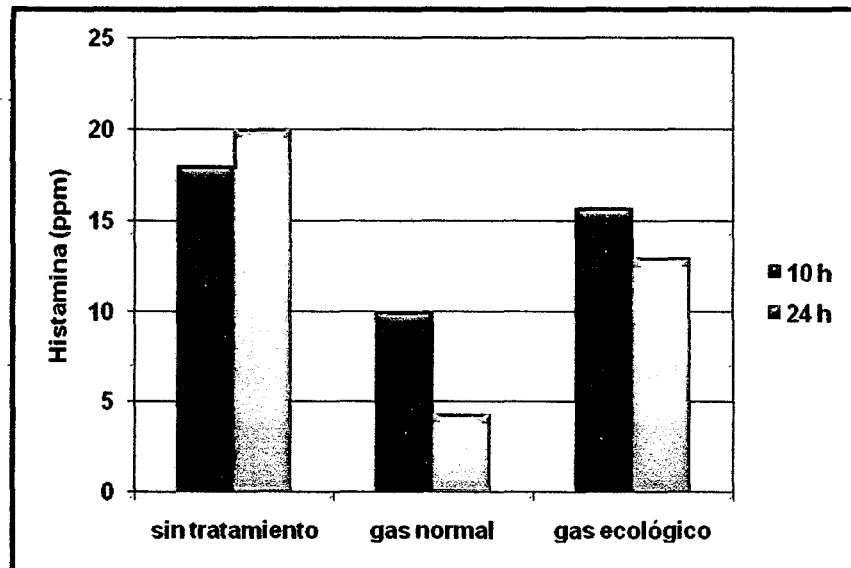


Figura 28. Concentración de histamina del filete de perico con y sin tratamiento en atmósfera modificada a 0°C.

Fuente: Elaboración propia.

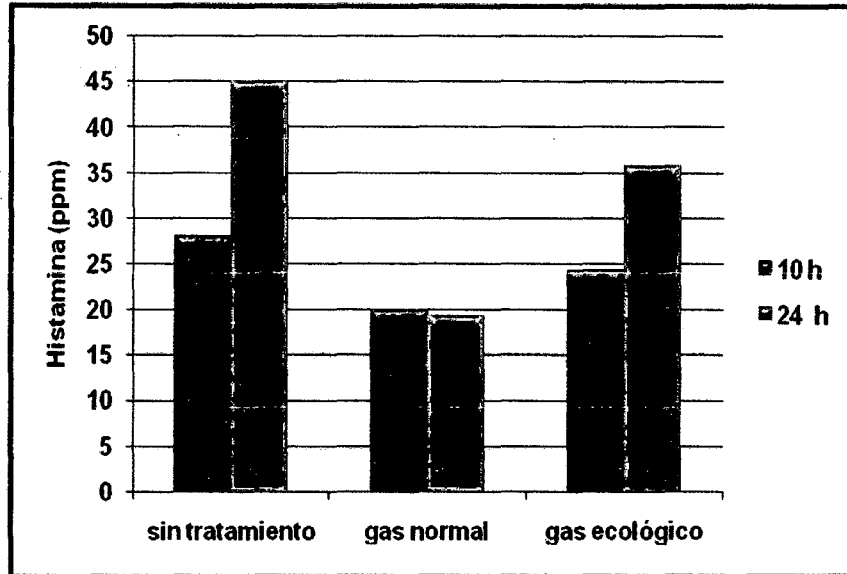


Figura 29. Concentración de Histamina del filete de perico con y sin tratamiento en atmosfera modificada a 10°C.

Fuente: Elaboración propia.

El tiempo de reposo influye en forma indirecta sobre la formación de histamina (ver figura 28) esto quiere decir: “A mayor tiempo de reposo menor es la concentración de histamina” a 0°C, mientras que en los tratamientos a 10 °C esta relación se manifiesta ligeramente en el tratamiento con gas normal mas no así en el tratamiento con gas ecológico. (Ver figura 29)

La relación entre el tiempo de reposo y la concentración de histamina también lo demostró Balaban y col. (2005) que llegó a la conclusión que “a mayor tiempo de almacenamiento con humo filtrado o con 100 % de monóxido de carbono a 4 °C durante 24 y 48 h, se reduce los microorganismos aerobios y por ende formación de histamina en el filete de perico”.

En las figuras 28 y 29 se observa la influencia directa de la temperatura sobre la formación de histamina y en forma indirecta sobre la solubilidad de los gases tal como lo demostró Daniel y Getmann (1948), que manifestó: “temperaturas menores la solubilidad del monóxido de carbono es mayor”.

De acuerdo a Hordur G. Kristinsson y col (2005), obtuvo una ecuación con respecto a concentración de gas en el filete de mahi mahi:

$$\frac{dC(t)}{dt} = \frac{F}{V}(C_{in} - C(t)) \quad (6)$$

Donde: $C(t)$, es la concentración retenida depende del tiempo y F y V con los flujo volumétricos y volumen constantes.

De aquí que se deduce que el factor tiempo tiene una influencia en la adherencia del monóxido de carbono en el filete y estas variables tienen influencia en la concentración de histamina, pero en el presente estudio solo se vio la influencia de variables en la histamina, mas no el comportamiento de la concentración de histamina con respecto a la temperatura y concentración de monóxido de carbono que este a su vez depende del tiempo.

Los 8 efectos del tratamiento con atmosfera modificada y sus respectivas replicas se ve reflejada en la densidad optica de las muestras, con la cual se obtiene la concentracion de histamina como se observa en la siguiente figura 30.

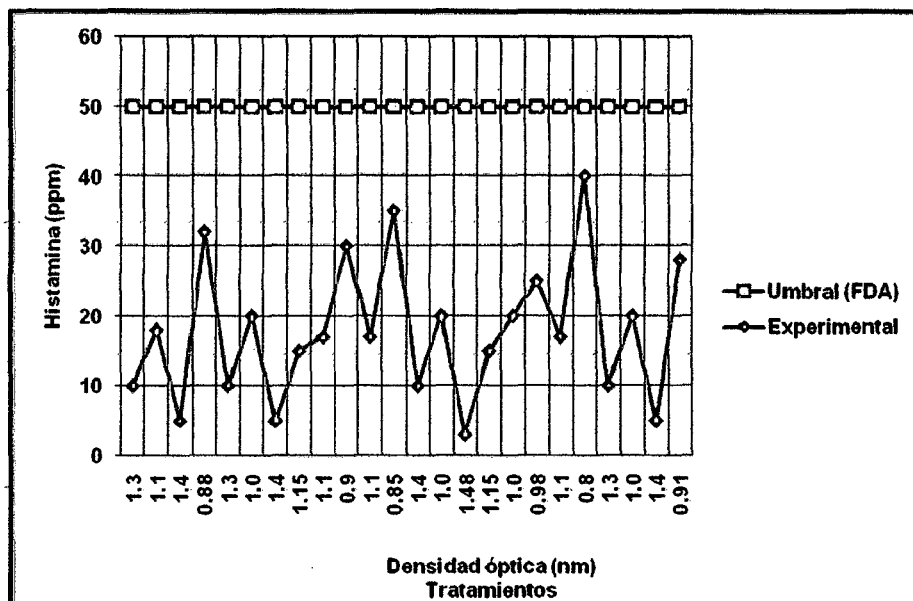


Figura 30. Histamina con respecto a la densidad optica de los 24 tratamientos.

Fuente: Elaboración propia.

De izquierda a derecha, la concentracion de histamina con respecto a los tratamientos, del 1 al 24, que representan la linea azul y la linea roja representa el umbral, establecido por el FDA (1998), como límite máximo superior en la calidad sanitaria del perico. Esto demuestra que el efecto de los tratamientos estan por debajo del limite maximo permitido (50 ppm), entonces estos tratamientos son recomendados.

3.3 ANALISIS ESTADISTICO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ATMÓSFERA MODIFICADA SOBRE LA FORMACION DE HISTAMINA EN EL FILETE DE PERICO (*Coryphaena hippurus*).

3.3.1 ESTRUCTURA ALIAS

Antes de realizar la evaluación del experimento es necesario observar la “estructura alias” que nos indica si los efectos principales de los factores se pueden estimar independientemente o no debido a que se encuentran mezclados con otros efectos. La estructura alias del cuadro 25 nos indica que los efectos principales de las 3 variables se estimaron en forma independiente, puesto que tienen una resolución IV.

Cuadro 25. Estructura alias.

Contraste	Efectos
1	(1)
2	A
3	B
4	C
5	AB
6	AC
7	BC
8	ABC

Fuente: Elaboración propia.

Donde

A : Temperatura del filete

B : Tiempo de reposo

C : Tipo de gas

3.3.2 VALOR Y ERROR DE LOS FACTORES DEL TRATAMIENTO CON ATMÓSFERAS MODIFICADAS EN EL FILETE DE PERICO

El cuadro 26 nos muestra cada uno de los efectos de los factores estimados e interacciones. También se muestra el error normal de cada uno de estos, el cual mide su error de muestreo. Para trazar las estimaciones en orden decreciente de importancia se debe probar con el gráfico de Pareto y se debe probar la significación estadística con el análisis de varianza.

Cuadro 26. Valor y error de los factores de tratamiento con atmósferas modificadas.

Factores	Valor	Error
A: Temperatura (°C)	14,08	+/- 1,63
B: Tiempo de reposo (h)	0,58	+/- 1,63
C: Tipo de gas	-8,75	+/- 1,63
AB	4,75	+/- 1,63
AC	-1,58	+/- 1,63
BC	-3,75	+/- 1,63
ABC	-2,25	+/- 1,63
Bloque 1	1,17	+/- 2,30
Bloque 2	5,67	+/- 2,30
Promedio	17,79	+/- 0,79

Fuente: Elaboración propia.

Los errores estándar están basados en un error total con 15 grados de libertad.

También se debe determinar el promedio de los valores altos y bajos y el promedio de los valores para cada variable, luego se calcula “delta” (Δ), que representa la diferencia entre los valores altos y bajos. (Ver anexo 3).

Cuadro 27. Estimación de los efectos principales.

	T	t_m	θ	
(+1)	24,83	18,08	13,40	Promedio de valores altos
(-1)	10,75	17,50	22,18	Promedio de valores bajos
Δ	14,08	0,58	-8,78	Efecto Δ

Fuente: Elaboración propia.

3.3.3 GRÁFICO DEL PARETO

El gráfico de Pareto visualiza la importancia de los factores del tratamiento con atmosfera modificada del filete con respecto a la formación de histamina. En este sentido la temperatura del filete, tipo de gas, interacción AB (temperatura del filete y tiempo de reposo) y la interacción BC (tiempo de reposo y tipo de gas) parecen tener influencia en la concentración de histamina porque las barras horizontales están por encima del nivel de confianza que representa la línea azul vertical mientras que las interacciones AC (temperatura del filete y tipo de gas) y el tiempo de reposo no parecen tener influencia sobre la concentración de histamina debido a que están por debajo de la línea azul vertical (ver figura 31).

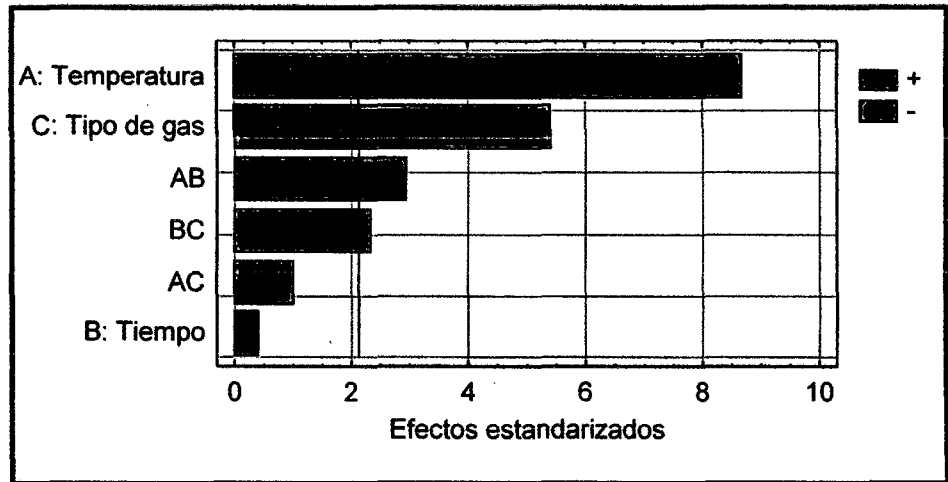


Figura 31. Gráfico de Pareto de los efectos con sus respectivos factores.

Fuente: Elaboración propia.

También se puede observar que las barras horizontales de los factores están distinguidas de dos colores como son el fucsia y rojo, el primero indica que la temperatura del filete, la interacción AB (temperatura del filete y tiempo de reposo) y el tiempo de reposo tienen una dependencia directa con respecto a la concentración de histamina y el segundo indica una dependencia indirecta para el caso de los factores: tipo de gas, interacciones AC (temperatura del filete y tipo de gas) y BC (tiempo de reposo y tipo de gas).

Sin embargo en este gráfico aun no podemos deducir la variable más importante y significativa debido a que no se muestra una evidencia estadística. Esto se realiza mediante al análisis de varianza.

3.3.4 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA CONCENTRACION DE HISTAMINA CON RESPECTO A LOS FACTORES

En el cuadro 28, tiene la suma de factores, grados de libertad, cuadrado medio, p-valor y el estadístico F_0 de los factores que involucran el tratamiento con atmósferas modificadas del filete del perico.

Cuadro 28. Análisis de varianza de la concentración de histamina.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	P-valor	F_0 calculado
A: Temperatura	1190,04	1	1190,04	0,00001	79,71
B: Tiempo	2,04	1	2,04	0,7171	0,14
C: Tipo de gas	459,37	1	459,37	0,0001	30,77
AB	135,37	1	135,37	0,0093	9,07
AC	15,04	1	15,04	0,3325	1,01
BC	84,37	1	84,37	0,0322	5,65
ABC	30,37	1	30,37	0,1757	2,03
Bloques	160,33	2	80,16	0,0186	5,37
Error total	209,00	14	14,93		
Total	2285,96	23			

Fuente: Elaboración propia.

En el análisis se incluyó la falta de ajuste teniendo como valor cero esto indica que $p = 0,00001$. Se utilizó un nivel de confianza de 95 %.

En cuanto al p-valor se obtuvo lo siguiente:

- La temperatura del filete es altamente significativa, debido a que la máxima probabilidad de cometer error (p-valor) es 0,00001; menor que 0,01.

- El tipo de gas es altamente significativo, debido a que la máxima probabilidad de cometer error (p-valor) cuyo valor es 0,0001; menor que 0,01.

- La interacción AB (temperatura del filete y tiempo de reposo) es altamente significativa, debido a que la máxima probabilidad de cometer error (p-valor) es 0,0093 menor que 0,01.

- La interacción de los bloques es probablemente significativo debido a que la máxima probabilidad de cometer error (p-valor) es 0,0186; que oscila entre 0,01 y 0,05.

- La interacción BC (tiempo de reposo y tipo de gas) es probablemente significativo debido a que la máxima probabilidad de cometer error (p-valor) es 0,0322; que oscila entre 0,01 y 0,05.

- La interacción ABC (temperatura del filete, tiempo de reposo y tipo de gas) no es significativo debido a que la máxima

probabilidad de cometer error (p-valor) es 0,1757; mayor que 0,05.

- ❑ La interacción AC (temperatura del filete y tipo de gas) no es significativa debido a que la máxima probabilidad de cometer error (p-valor) es 0,3325; mayor que 0,05.

- ❑ El tiempo de reposo no es significativo, debido a que la máxima probabilidad de cometer error (p-valor) es 0,7171; mayor que 0,05.

También se calculó el estadístico F_0 , de cada uno de los factores con respecto al error total, luego se comparó con F_0 hallado de tablas cuyo valor es 4,60, de aquí se concluye que la temperatura del filete, el tipo de gas, la interacción AB (temperatura del filete y tiempo de reposo) y la interacción de los bloques son significativos al 95 % debido a que estos valores son mayores a 4,60. (Ver anexo 5).

3.3.5 COEFICIENTES DE REGRESIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HISTAMINA

Cuadro 29. Coeficientes de regresión de la concentración de histamina.

Factor	Variable	Coefficiente
Constante	-----	15,81
A: Temperatura	T	0,25
B: Tiempo	t_m	-0,29
C: Tipo de gas	θ	0,97
AB	$T \times t_m$	0,06
AC	$T \times \theta$	-0,16
BC	$t_m \times \theta$	-0,26

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro 29 muestra a los coeficientes de regresión estimados para la concentración de histamina con respecto a los parámetros de operación del tratamiento con atmósfera modificada, esto se refleja en el modelo empírico de primer orden de la siguiente manera:

$$H = 15,81 + 0,25T - 0,29t_m + 0,97\theta + 0,06 T t_m - 0,16 T \theta - 0,26 t_m \theta \quad (7)$$

R-cuadrado : 90,86 %

R-cuadrado (ajustado para g.l.) : 86,86 %

Error estándar de Estimación. : 3,86

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 90,86 % de la variabilidad en la concentración de histamina con respecto a los factores en estudio. El estadístico R-cuadrado ajustado, el cual es más adecuado para la comparación de números diferentes de variables independientes, es 86,86 %. El error estándar de la estimación muestra la desviación de los puntos alrededor de la recta de regresión es 3,86.

3.3.6 ANÁLISIS DE LOS RESIDUALES

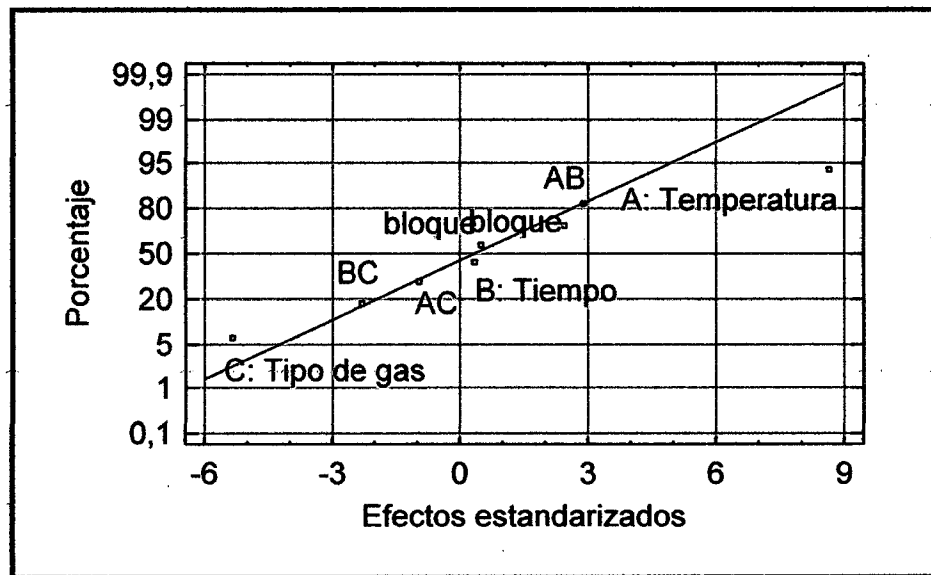


Figura 32. Probabilidad normal de la concentración de histamina en el filete de perico.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 32 vemos la función de la distribución acumulada de los datos de la concentración de histamina observadas, frente a distribución gausiana, estas dos funciones no coinciden en su totalidad, solo coinciden en las interacciones temperatura del filete y

tiempo de reposo (AB), temperatura del filete y tipo de gas (AC) y tiempo de reposo con tipo de gas (BC) mas no con la temperatura del filete, tiempo de reposo, tipo de gas y los dos bloques. Para comprobar el ajuste a la distribución normal se empleo el estadístico Kolgomorov – Smirnov (p-valor) que mide la máxima probabilidad que hay entre las curvas en mención, Walpole y Myers (1992), cuyo valor es cero y por ende se cumple el supuesto de normalidad.

Se empleo el estadístico Durbin - Watson que examina los residuos para determinar si hay cualquier autocorrelación significativa basada en el orden en el que se suceden en el fichero de datos, Walpole y Myers (1992), cuyo valor es 1,28 ($p = 0,028$) que prueba la posible ausencia de autocorrelación. El p – valor oscila entre 0,01 y 0,05, entonces hay indicios de una posible correlación de serie. Dado el siguiente análisis se cumple el supuesto de independencia de los errores.

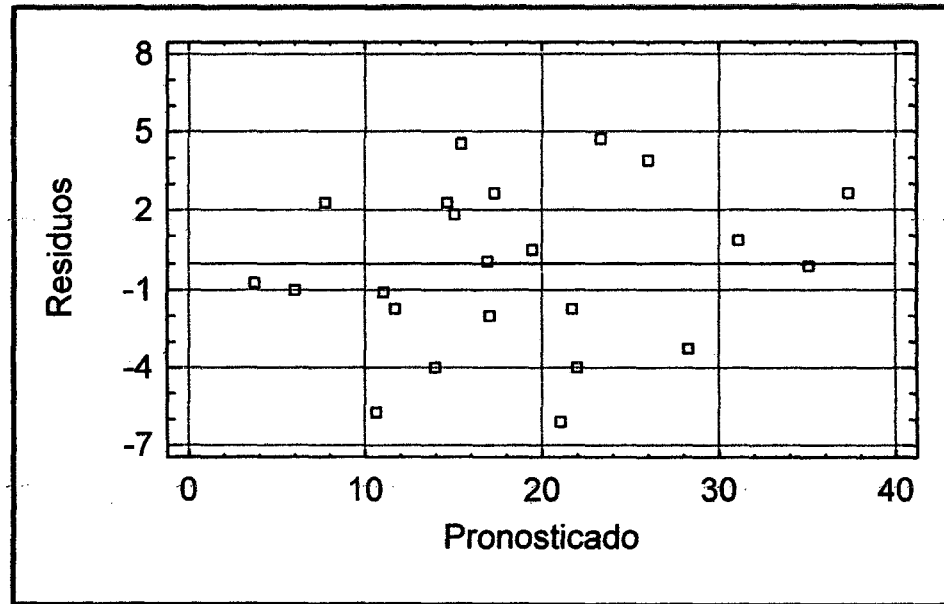


Figura 33. Gráfico de residuos para la concentración de histamina.

Fuente: Elaboración propia.

La figura 33 se observa que no existe un patrón en los valores pronosticados. Los puntos están dispersos alrededor del 0 en los residuales, por lo que se puede concluir que los datos satisfacen el supuesto de linealidad y homocedasticidad (igualdad de varianzas).

Dado a los supuestos de normalidad, independencia, linealidad y homocedasticidad se cumplen queda garantizado la validez del modelo.

3.3.7 CONCENTRACIÓN DE HISTAMINA CON RESPECTO A LOS FACTORES

En la figura 34 se presenta los efectos principales con los valores promedios obtenidos, donde se puede observar la tendencia de los efectos de cada factor sobre la formación de histamina que está representada por la concentración de histamina.

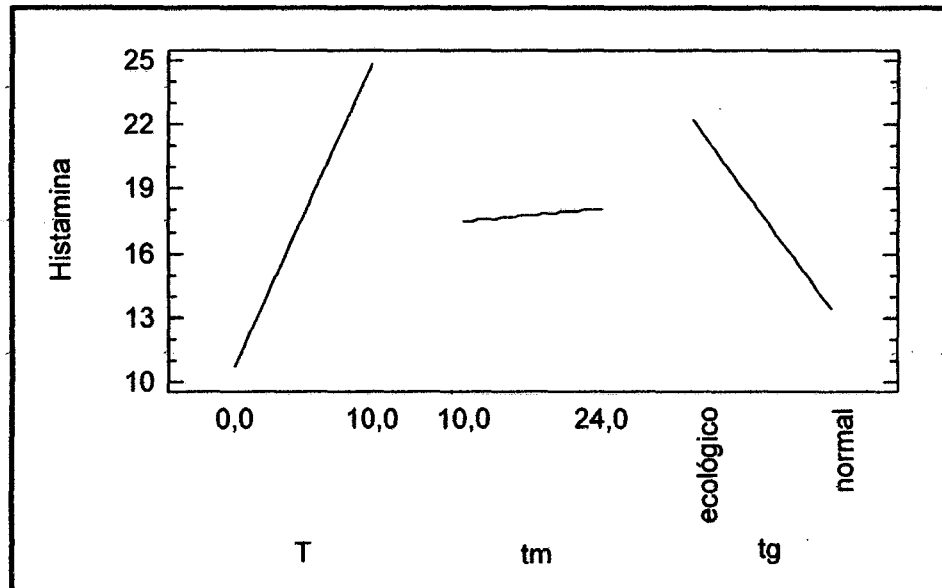


Figura 34. Concentración de Histamina con respecto a los factores.

Fuente: Elaboración propia.

La temperatura del filete y tiempo de reposo varían proporcionalmente con la concentración de histamina muy por lo contrario ocurre con el tipo de gas (que son diferentes concentraciones de monóxido de carbono) que varía inversamente. La pendiente en la temperatura del filete es más pronunciada que en el tiempo de reposo, lo que indica que la temperatura del filete tiene una fuerte influencia

en la formación de histamina, lo mismo ocurre con el tipo de gas. De tal modo que los efectos de los factores sobre la concentración de histamina se interpretan de la siguiente manera:

- ❑ Si se aumenta la temperatura del filete de 0 a 10 °C, entonces la concentración de histamina aumenta en 14,08 +/- 1,63.
- ❑ Si se aumenta el tiempo de reposo de 10 a 24 h, entonces la concentración de histamina aumenta en 0,58 +/- 1,63.
- ❑ Si se aumenta la concentración de monóxido de carbono de 25 a 70 % en el tipo de gas, entonces la concentración de histamina disminuye en 8,75 +/- 1,63.

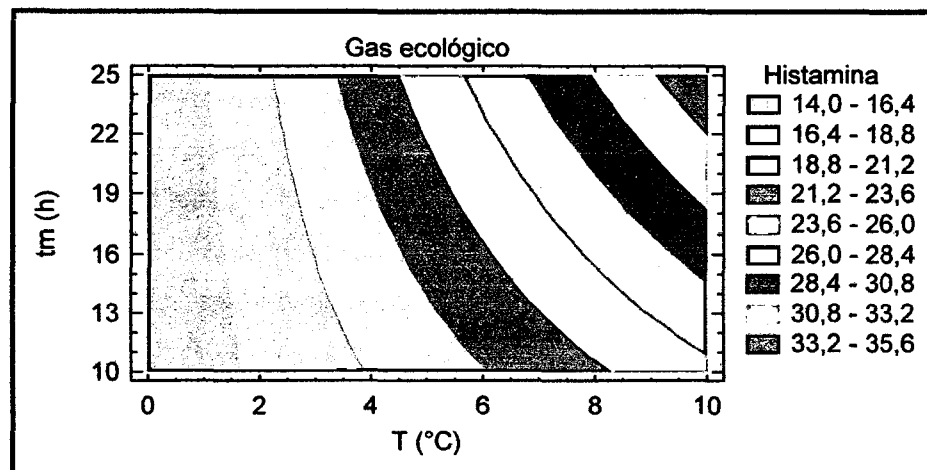


Figura 35. Concentración de histamina con respecto a temperatura del filete y tiempo de reposo con gas ecológico constante, en 2 dimensiones.

Fuente: Elaboración propia.

La figura 35, relaciona al tiempo de reposo (t_m), en el eje de las ordenadas, con respecto a la temperatura de filete (T), en el eje de las

abscisas, se mantiene constante al gas ecológico (25 % CO) en el tratamiento, las áreas pintadas de colores representan la concentración de histamina, que disminuye a medida que se reduce la temperatura del filete, cuyos valores inferiores que oscilan entre 14,0 y 16,4 ppm. La concentración de histamina tiene una tendencia en forma cuadrática a medida que aumenta la temperatura del filete y el tiempo de reposo cuyos valores oscilan entre 33,2 a 35,6 ppm.

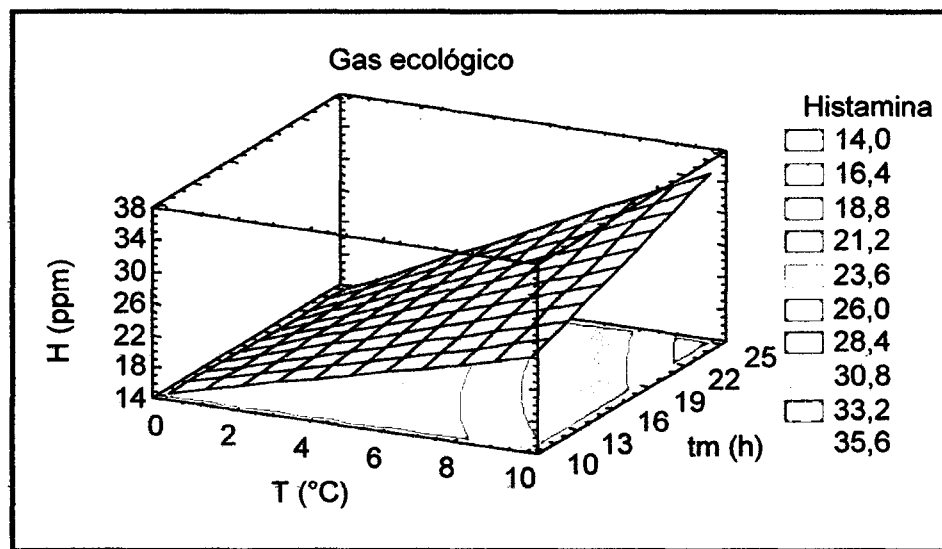


Figura 36. Concentración de histamina con respecto a temperatura del filete y tiempo de reposo con gas ecológico constante, en 3 dimensiones.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 36 se observa el comportamiento de la histamina en forma de malla, de color fuxia, con respecto al tiempo de reposo y la temperatura del filete, manteniendo constante al gas ecológico (25 % CO), el comportamiento de la histamina con respecto a estas dos

variables es de forma lineal solo en los parámetros de operación establecidos y el comportamiento general es otra figura que podría ser una “silla de caballo” tipo hipérbola.

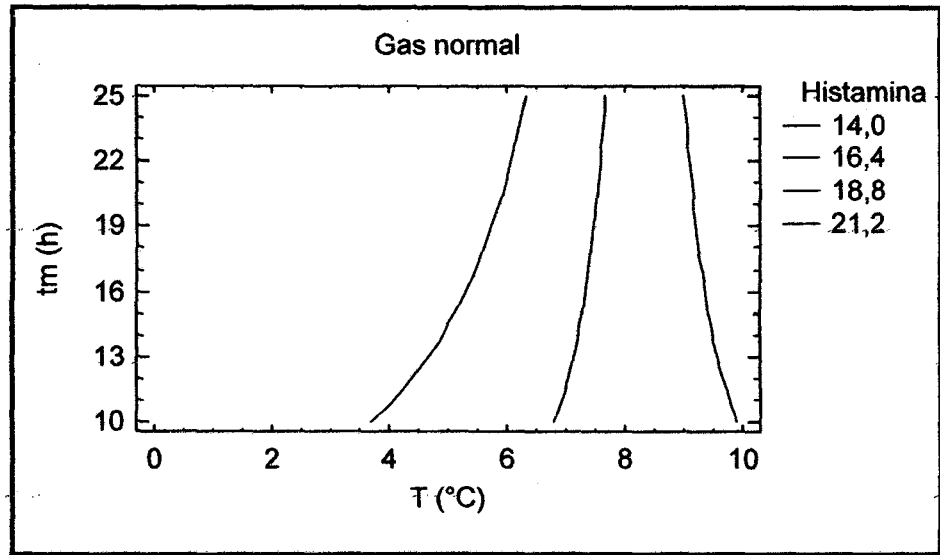


Figura 37. Concentración de histamina con respecto al tiempo de reposo y temperatura del filete con gas normal constante, en 2 dimensiones.

Fuente: Elaboración propia.

La figura 37, relaciona al tiempo de reposo (t_m), en el eje de las ordenadas, con respecto a la temperatura de filete (T), en el eje de las abscisas, se mantiene en forma constante al gas normal (70 % CO) en el tratamiento, las líneas de colores representan la concentración de histamina, que disminuye a medida que se reduce la temperatura del filete, asimismo también se observa el comportamiento cuadrático de la concentración de histamina con respecto al tiempo de reposo y temperatura del filete.

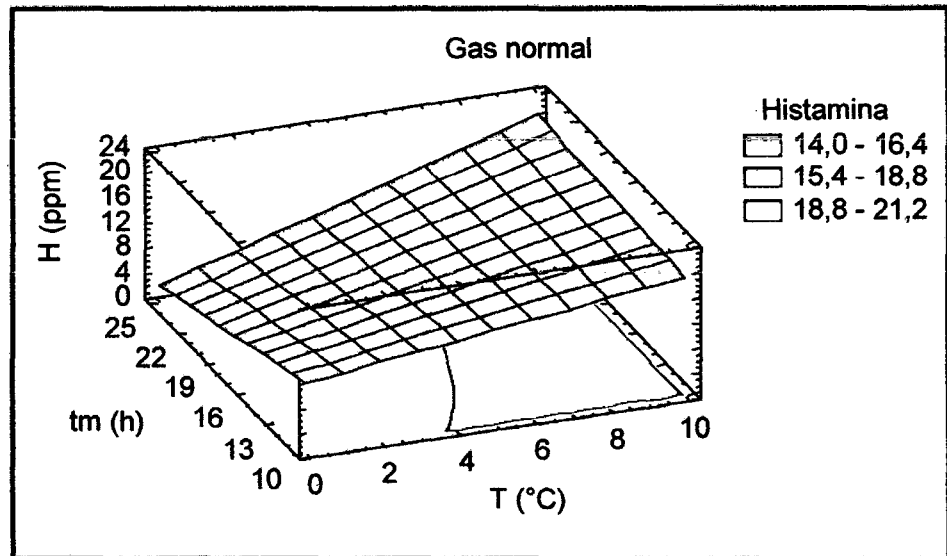


Figura 38. Histamina con respecto al tiempo de maduración y temperatura del filete con gas normal constante, en 3 dimensiones.

Fuente: Elaboración propia.

La figura 38, relaciona la concentración de histamina con respecto al tiempo de reposo (t_m) y la temperatura del filete (T), manteniendo constante el tipo de gas normal (70 % CO), cuyos valores inferiores van de 14,0 a 16,4 ppm y obedecen a un comportamiento cuadrático de tipo hiperbólico, esto se refleja en la sombra que está por debajo del manto fuxia, que representa el comportamiento de la concentración de histamina con respecto a la temperatura del filete y tiempo de reposo.

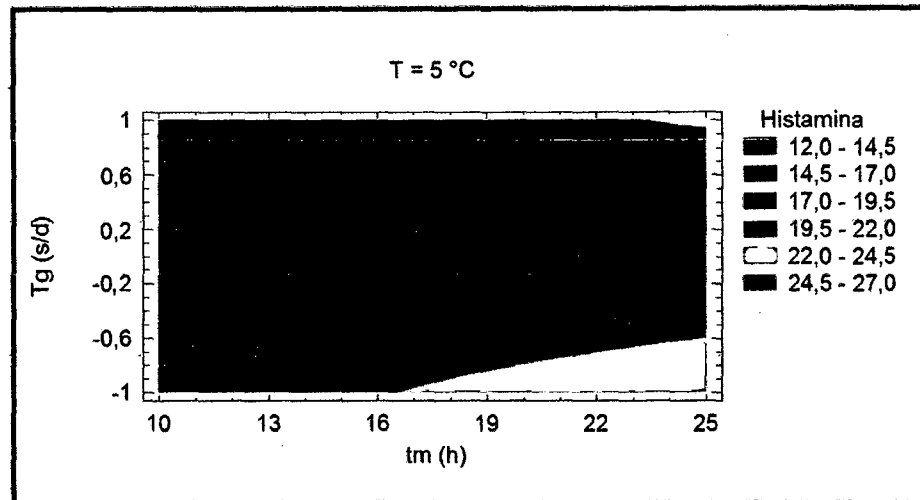


Figura 39. Concentración de histamina con respecto al tipo de gas y tiempo de reposo con temperatura del filete constante, en 2 dimensiones.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 39 se aprecia el comportamiento de la concentración de histamina con respecto al tipo de gas y tiempo de reposo, manteniendo constante la temperatura del filete, la concentración de histamina disminuye cuando se incrementa de gas ecológico a normal y se mantiene en forma casi constante cuando varía el tiempo de reposo dentro de la región (-1 a +1) y tiene un comportamiento cuadrático fuera de este rango.

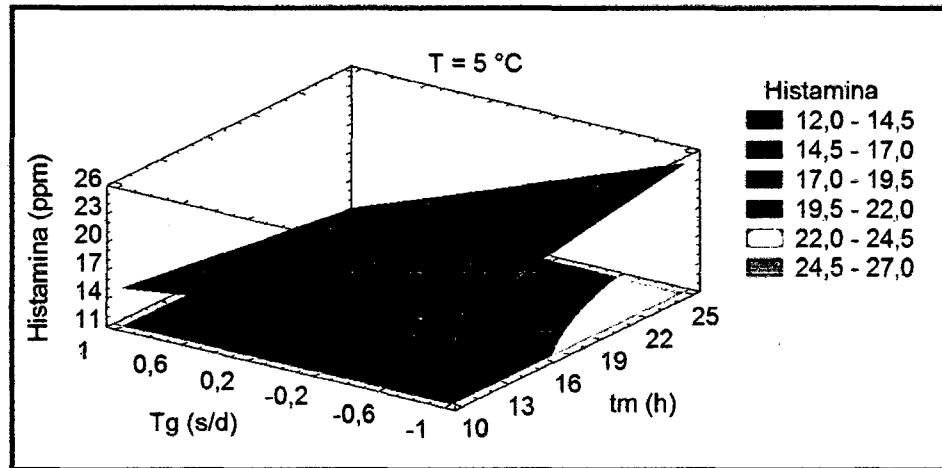


Figura 40. Concentración de histamina con respecto al tipo de gas y tiempo de reposo con temperatura del filete constante, en 3 dimensiones.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 40 se puede apreciar la forma lineal aproximada de la concentración de histamina con respecto al tipo de gas y tiempo de reposo con una temperatura del filete constante de 5 °C, a medida que aumenta el tipo de gas y tiempo de reposo disminuye la concentración de histamina, la sombra que refleja este manto, es el comportamiento real que puede pertenecer a la forma de una hipérbola.

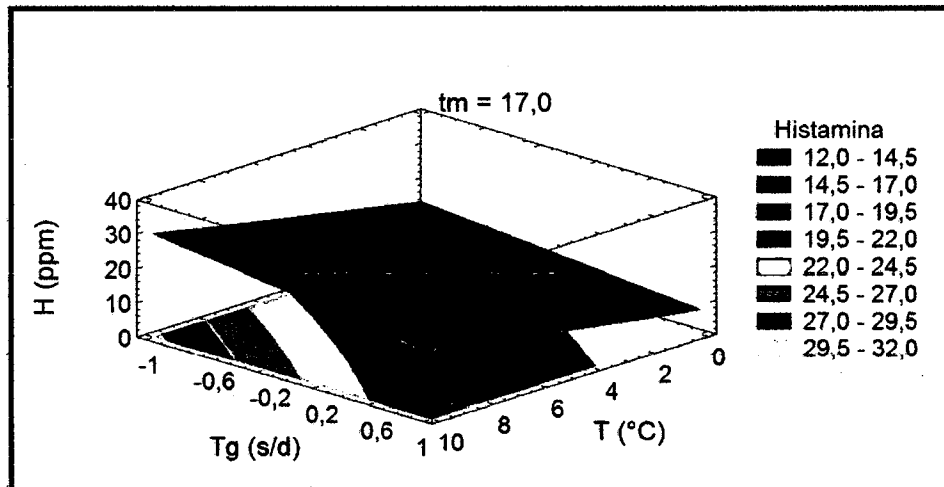


Figura 41. Concentración de histamina con respecto al tipo de gas y temperatura del filete con tiempo de reposo constante, en 3 dimensiones.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 41 se puede apreciar la forma lineal aproximada de la concentración de histamina con respecto al tipo de gas y temperatura del filete con tiempo de reposo constante de 17 h, a medida que aumenta el tipo de gas y la temperatura del filete, también aumenta la concentración de histamina, la sombra que refleja este manto, es el comportamiento real de esta variable se le puede atribuir a una forma cuadrática.

3.3.8 VALORES RECOMENDADOS PARA EL TRATAMIENTO CON ATMÓSFERAS MODIFICADAS

Los valores recomendados para el tratamiento con atmósferas modificadas se aprecian en el cuadro 30.

Cuadro 30 Valores recomendados del tratamiento con atmósferas modificadas.

Factor	Valor recomendado
Temperatura del filete (T)	0
Tiempo de reposo (T_m)	24
Tipo de gas (θ)	Normal
Histamina (ppm)	4,3 ppm

Fuente: Elaboración propia.

CONCLUSIONES

- ❑ El efecto de los factores del tratamiento con atmósfera modificada en el procesamiento del filete de perico (*coryphaena hippurus*) congelado es alto, cuando estos adquieren valores de 0 °C, 24 h y gas normal que dan como consecuencia 4,3 ppm en histamina y de esta forma estandarizar la calidad del producto para exportación.
- ❑ El tratamiento con monóxido de carbono en el filete perico otorga mayor vida útil en comparación que el filete sin tratamiento, esto se corrobora en el olor fresco (3), textura poco firme (3), color rojo intenso (4), sabor succulento (9), histamina 6 ppm y aerobios mesófilos $9,9 \times 10^4$ UFC/g mientras que el filete sin tratamiento presentó olor neutral (2), textura blanda (1), color translucido (1), sabor neutral (7), histamina 25 ppm y $31,2 \times 10^4$ UFC/g en aerobios mesófilos.
- ❑ El rango de concentraciones de histamina determinada en el presente estudio va de 4,3 ppm a 35,7 ppm cuando los efectos de los factores del tratamiento con atmósfera modificada en el procesamiento del filete de perico (*coryphaena hippurus*) congelado oscilan entre: 0 a 10 °C, 10 a 24 h, gas normal (70 % CO) y ecológico (20 % CO).
- ❑ El grado de correlación de la concentración de histamina con respecto a los factores del tratamiento con atmósfera modificada en el procesamiento del filete de perico (*coryphaena hippurus*) congelado es de 90.86 %, considerado como excelente,

fuerte y de forma lineal que garantiza la propuesta del modelo empírico planteado en el presente trabajo de investigación.

SUGERENCIAS

- ❑ Se recomienda utilizar otra evaluación física sensorial exclusiva para especies pelágicas como las propuestas por la Comunidad Europea (CEE), donde clasifican a la especie en 3 tipos: A (extra), B (bueno) y E (no aceptable).

- ❑ El comportamiento pronosticado de la histamina solo es un rango de operación parametrizado en el presente estudio, análogamente se recomienda optimizar el tratamiento con atmósfera modificada empleando la metodología superficie respuesta 3^k de tal modo que se pueda conocer el verdadero comportamiento de la concentración de histamina en diversos rangos de operación.

- ❑ Se recomienda utilizar otros parámetros de operación tales como el espesor del músculo y difusividad de los gases empleados.

BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR-PALOMINO, B., GALVÁN-MAGAÑA, F., ABITIA-CARDENAS, L.A., MUHLIA-MELO, A. y RODRÍGEZ – ROMERO, J. Aspectos alimentarios del dorado (*Coryphaena hippurus*) en Cabo San Lucas, Baja California Sur, México. Ciencias Marinas. 24(3):253-265. 1998.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 1982. 107-108p.

ARAUJO, M. A., GANDUR, M. P. Manual del STATGRAPHICS. Junio del 2008 [Citado el 15 de noviembre del 2008]. Formato pdf. Disponible en:
<http://www.fce.unal.edu.co/uifce/newuifce/conf/documentos/STATGRAPHICS.pdf>

BALABAN, M.O., KRISTINSSON, H.G. AND OTWELL, W.S. Evaluation of color parameters in a machine vision analysis of carbon monoxide-treated fish. Part I: Fresh tuna. Journal of Aquatic Food Product Technology. 14 (1): 5–24, 2005.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for quality and human health. Trends Food Sci and Tech, 6 (1): 341-346. 1995.

BEUTLING, D. In: Biogenic amine in nutrition (Biogene Amine in der Ernährung). Springer-Verlag. Berlín, Germany. 1996, 59-67.

BRINK, B., DAMIRIK, C., JOOSTEN, H. M. L. J., HUIS IN'T VELD, J. H. J.
Occurrence and formation of biologically active amines in foods. Journal Food Microbiol.
11 (1): 73-84, 1990.

CANAHUA, L. H. Diseños experimentales en medio ambiente. Primera edición.
Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna. Perú. 2006. 23 – 30, 40p.

CASTRO, J., SERNA J.M., MACIAS, D. AND MEJUTO, J. Preliminary scientific
estimates of by-catch landings by the spanish surface long line fleet in 1997 and 1998.
ICCAT Col. Vol. Sci. Pap., XLVI (4):1882-1894. 1999.

CHEN, C. M., WEI, C. I., KOBURGER, W. S., OTWELL, W. S., MARHALL, M. R.
Comparison of four agar media for detection of histamine producing bacteria in tuna.
Journal Food Protect. 52 (1): 808-813, 1989.

CHOW, C. J., LIU, S. M., AND TSAI, M. L. Characteristics of reaction between carbon
monoxide gas and myoglobin in tuna flesh. Journal Food Drug Analysis. 5 (3): 199-206,
1997.

CHOW, C. J., HSIEH, P. P., TSAI, M. L., AND CHU, Y. J. Quality changes during
iced and frozen storage of tuna flesh treated with carbon monoxide gas. Journal Food Drug
Analysis. 6 (3):615–623. 1998.

CHYTIRI, S., PALEOLOGOS, E., SAVVAIDIS, I., KONTOMINAS, M. G. Relation of Biogenic amines with Microbial and Sensory changes of whole and filleted Freshwater rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored on ice. Journal Food Protect, 67 (5): 960-965, 2004.

COMUNIDAD ECONÓMICA EUROPEA, CEE/493/91. Directiva 493. Normativa para la producción y comercialización de productos de la pesca. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, Europa, 1991. 15-34. L-286.

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/DOCSAL4691.doc>

DANIELS, F., GETMAN, F.H. Outlines of Physical Chemistry. Wiley. New York.1948.

DANYALI, N. The Effect of Carbon of Monoxide and Filtered Smoke on Quality and Safety of Yellowfin Tuna. Thesis (Master of Science). Florida, US. University of Florida, Gainesville. 2004. 121 p.

DEMIR, N., KRISTINSSON, H.G., BALABAN, M.O., AND OTWELL, W.S. Quality changes in mahimahi (*Coryphaena hippurus*) fillets treated by different carbon monoxide concentrations and filtered smoke as assessed by color machine vision and lipid oxidation. In: Annual Meeting Book of Abstracts. IFT 2004. Chicago, IL, US. Institute of Food Technologists. 2004. 152 p.

DU, W. X., LIN, C. M., PHU, A. T., CORNELL, J. A., MARSHALL, M. R. AND WEI, C. I. Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): Effect

of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. Journal Food Science, 67 (1): 292-301, 2002.

ESPARZA E. Y BERMEJO A. Pesca. Worldwide circulation magazine. Agosto del 2010 N° 110 w-07/10. Disponible en:
http://issuu.com/revistapesca/docs/revista_pesca_agosto_2010

FERNÁNDEZ, J. A. Control de la producción de histamina durante el deterioro del pescado. 2002. Citado en:
<http://tarwi.lamolina.edu.pe/~leojeri/control%20histamina%20pescado.doc>

GARNER, K. The Effect of Carbon Monoxide on Muscle Quality of Spanish Mackerel. Thesis (Master of Science). Florida, US. University of Florida, Gainesville. 2004. 84 p.

HALÁSZ, A., BARÁTH, A., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. Biogenic amine and their production by microorganisms in food. Trends Food Science Tech, 5: 42-49, 1994.

HERNÁNDEZ-HERRERO, M., ROIG-SAGUÉS, A. X., RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J., MORA-VENTURA, M. T. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). Journal Food Science, 62 (5): 509-514, 1999.

HINTLIAN, C.B. AND HOTCHKISS, J.H. The safety of a modified atmosphere packaging: a review. Food Technology, 40(12): 70-76, 1986.

HSIEH, P. P., CHOW, C. J., CHU, Y. J., AND CHEN, W. L. Change in color and quality of tuna during treatment with carbon monoxide. Journal Food Drug Analysis. 6 (3): 605-613, 1998.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Microorganismos de los alimentos. Vol. II. Metodo de muestreo para el análisis microbiológico. 2^{da} edición. Zaragoza-España. Editorial Acribia. 1985. 3-14p.

INSTITUTO TECNOLÓGICO PESQUERO DEL PERÚ. Compendio: Biología tecnológica de los principales especies hidrobiológicas del Perú. Callao. Perú. 2005. 20 – 25 p.

KANEKO, J. The use of carbon monoxide in fish processing: Commercial concerns [en línea]. Honolulu: PacMar, Diciembre del 2003 [citado el 25 de diciembre del 2008].

Formato pdf. Disponible en:

<http://sst.ifas.ufl.edu/25thAnn/file11.pdf>

KOUTSOUMANIS, K. AND NYCHAS, G. J. E. Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean boque (*Merluccius merluccius hubbsi*)

stored aerobically at 0, 3, 7 and 10 degree C. *Appl Environ Microbiol*, 65 (2): 698-706, 1999.

KRISTINSSON, H. G. Use of CO in meat/fish. Aquatic Food Products Program, Department of Food Science and Human Nutrition, University of Florida, Gainesville, FL. 2007.

KRISTINSSON, H.G., MONY, S., DEMIR, N., BALABAN, M.O., AND OTWELL, W.S. The effect of carbon monoxide and filtered smoke on the properties of aquatic muscle and selected muscle components. In: Proceedings of the First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference. TAFT 2003. Reykjavik, Iceland. Icelandic Fisheries Laboratories. 2003. 27–29 p.

LARSEN, E.; HELDBO, J.; JESPERSEN, C. M.; NIELSEN, J. (1992). Development of a method for quality assessment of fish for human consumption based on sensory evaluation. *Quality assurance in the Fish Industry*: 351-358.

LINARES PADIERNA, M.B. , VERGARA PÉREZ, H. Y BERRUGA FERNÁNDEZ, M.I. Uso del monóxido de carbono para conservar carne de cordero: efecto en la oxidación lipídica y color” Albacete, España. 2005. 44 p.

MIETZ, J. L., KARMAS, E. Chemical quality index of canned tuna as determined by HPLC. *Journal Food Science*, 42: 155-158, 1977.

MILLÁN, R., IZQUIERDO, P., ALLARA, M., TORRES, G., GARCÍA, A., BARBOZA, Y. Efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la calidad microbiológica y la producción de histamina en la lisa (*Mugil curema*). Revista Científica. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Luz. 3 (5): 339-346, 2003.

MONTGOMERY, D. C., RUNGER, G. C. Diseño y Análisis de Experimentos. Segunda Edición. Estados Unidos de América. Editorial Limusa. (2002). 468-498.

NEOGEN CORPORATION. Guía rápida para la determinación de histamina. Noviembre del 2008 [citado el 16 de diciembre del 2008]. Formato htm. Disponible en:
<http://seafood.ucdavis.edu/pubs/histamine.htm>

NIELSEN, J., HANSEN, T. K., JONSDOTTIR, S., LARSON, E. P. Development of methods for quality index of fresh fish. FAR Meeting, Noordwijkerhort, Netherlands. 1992.

ORO, M. El Dorado. Diciembre del 2000 [Citado el 22 de noviembre del 2008]. Formato html. Disponible en:
<http://www.pesca.org.mx/articulos/dorado1.html>

PALEOLOGOS, E. K., SAVVAIDIS, I. N., KONTOMINAS, M. G. Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Food Microbiol. 21 (1): 549-557, 2004.

PARRY, T. Introducción en envasado de alimentos en atmósfera modificada. Madrid (España). Ed. A. Madrid Vicente. 1995. 14-22 p.

PASCUAL ANDERSON, M. R. Microbiología alimentaria. Metodología para alimentos y bebidas. Editorial Díaz de Santos, S. A., 2ª edición. Madrid. 2000. 441 p.

ROSS, P.M. The Influence of Exposure to Carbon Monoxide on the Quality Attributes for Yellowfin Tuna Muscle. Thesis (Master of Science). University of Florida, Gainesville. 2000. 95 p.

SÁNCHEZ CASCADO, S. P. Estudio de alternativas para la evaluación De la frescura y la calidad del *Engraulis encrasicolus* y sus derivados. Barcelona. 2005. 29 p.

SOLANO, A., TRESEIRA A., GARCIA V., DIOSES T., MARIN W., SANCHEZ C. Y WOSNITZA C. Biología y pesquería del perico (*Coryphaena hippurus*). [en línea]. Instituto del Mar del Perú. Callao, 2008. Disponible en:
http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe_inform_blgia_y_pesqueria_perico.pdf

TAYLOR, S. L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. CRC Critical Reviews in toxicology, 17 (2): 91-128. 1986.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Procedures for the safe and sanitary Processing and importing of fish and fishery products. 21 CFR Parts 123 and 1240. Code Federal Regulations. DHHS/PHS/FDA/Office of Seafood, Washington, D.C. 1995.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Foodborna Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. DHHS/PHS/FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington, D.C, 1997.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Fish and Fishery Products. Hazard and Control Guide. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Appendix 5. FDA and EPA Guidance levels. 12-29p.1998.

VECIANA-NOGUÉS, M. T., MARINÉ-FONT, A. AND VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines and organoleptic changes. Journal Agric Food Chem, 45 (1): 2036-2041, 1997.

WALPOLE, R. E. y MYERS, R. H. Probabilidad y estadística. Cuarta edición. McGraw Hill. 1992. 599 – 638 p.

WITTFOGEL, L. El pescado y sus Productos. España. Editorial Acribia, Zaragoza. 1987. 35 p.

ANEXOS

ANEXO 1. CONCEPTOS FUNDAMENTALES

1. Intoxicación histamínica

Es una intoxicación alimentaria producida por la ingestión de alimentos con cantidades elevadas de histamina, Taylor (1986). Este trastorno está especialmente relacionado al consumo de pescado que pertenece a las familias Scomberesocidae y Scombridae.

Entre las bacterias productoras de histamina se pueden mencionar a grupos de *Enterobacteriaceae*, ciertos *Vibrio* sp., *Clostridium* y *Lactobacillus* sp. Estas bacterias se desarrollan en un amplio rango de temperaturas pero la mayoría son mesófilas (*M. morganii*).

Las enterobacterias se han descrito como grandes formadores de histamina en pescado, Chen y col. (1989); Beutling (1996) dentro de esta familia, los géneros *Proteus* (Du y col. (2002)) y *Klebsiella* (Hernández-Herrero y col. (1999)) son los que más se han relacionado con la capacidad de descarboxilación de la histidina.

ANEXO 2 ANÁLISIS DE VARIANZA

El análisis de varianza se inicia planteando la siguiente ecuación que representa a la variabilidad total de los datos en sus partes componentes:

$$SS_{Total} = SS_{Efectos} + SS_{Error} + SS_{Bloques} \quad (A.1)$$

donde:

SS_{Total}	:	Suma total de cuadrados
$SS_{Efectos}$:	Suma de cuadrados debida a los efectos
SS_{Error}	:	Suma de cuadrados debido al error
$SS_{Bloques}$:	Suma de cuadrados de los bloques

Las variables mencionadas en la ecuación (A.1) se pueden calcular de la siguiente manera:

$$SS_{Efectos} = \frac{\left(\sum_{i=1}^N X_{ij} Y_j \right)^2}{Nr} \quad (A.2)$$

$$SS_{Error} = \sum_{i=1}^{n_o} (Y_i^o - \bar{Y}^o)^2 \quad (A.3)$$

$$SS_{Curvatura} = \frac{Nn_o (\bar{Y} - \bar{Y}^o)}{N + n_o} \quad (A.4)$$

Para el análisis de la varianza de un diseño factorial donde hay varias réplicas en los puntos del diseño, la suma total de los cuadrados viene definido por:

$$SS_{Total} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^r Y_{ijk}^2 - \frac{Y^2}{N \cdot r} \quad (A.5)$$

donde:

N : Número de réplicas experimentales.

r : Número de réplicas en el diseño.

SS_{Total} : Es la suma de las respuestas elevadas al cuadrado por el número total de experimentos por el número de réplicas efectuadas.

A través del cálculo del efecto Δ , la manera precisa y estadística de medir la importancia de una variable es por el teorema de Cochran, que se resume en la siguiente expresión:

$$F_0 = \frac{MS_{Efectos}}{MS_{Error}} \quad (A.6)$$

donde:

F_0 : Estadístico F.

$MS_{Efectos}$: Suma de los cuadrados de los efectos.

MS_{Error} : Suma de los cuadrados del error.

A su vez estas expresiones están definidas de la siguiente manera:

$$MS_{Efectos} = \frac{SS_{Efectos}}{g|_T} \quad (A.7)$$

$$MS_{Error} = \frac{SS_{Error}}{g|_E} \quad (A.8)$$

donde :

$g|_T$: Grados de libertad de los efectos e interacciones, igual a 1 en los diseños factoriales a dos niveles ($2-1=1$).

$g|_E$: Grados de libertad de la suma de cuadrados del error igual a:

$$\sum_{i=1}^{n_r} n_{r_i} - 1 \quad (\text{A.9})$$

Esto es la sumatoria del número de réplicas menos 1.

$$F_o > F(\alpha, g|_T, g|_E) \quad (\text{A.10})$$

ANEXO 3 CÁLCULO DE EFECTOS DE LAS VARIABLES OPERATIVAS DEL TRATAMIENTO CON ATMÓSFERA MODIFICADA EN LA CONCENTRACIÓN DE HISTAMINA.

De acuerdo al cuadro 24 del capítulo III, considerando las variables codificadas de los factores, el promedio de las réplicas respectivamente tenemos:

Cuadro 31 Histamina experimental y promediada con respecto a los factores principales codificados

Experimento	T	t _m	θ	H			Promedio
				1	2	3	
1	-1	-1	-1	10	17	20	15,7
2	+1	-1	-1	18	30	25	24,3
3	-1	+1	-1	5	17	17	13,0
4	+1	+1	-1	32	35	40	35,7
5	-1	-1	+1	10	10	10	10,0
6	+1	-1	+1	20	20	20	20,0
7	-1	+1	+1	5	3	5	4,3
8	+1	+1	+1	15	15	28	19,3

Fuente: Elaboración propia

Para determinar los efectos de cada una de las variables se utilizó el promedio de los valores altos y el promedio de los valores bajos para cada variable.

Reemplazando tenemos:

$$(+1)_r = \frac{24,3 + 35,7 + 20 + 19,3}{4} = 24,83$$

$$(-1)_r = \frac{15,7 + 13 + 10 + 4,3}{4} = 10,75$$

$$(+1)_{t_m} = \frac{13+35,7+4,3+19,3}{4} = 18,08$$

$$(-1)_{t_m} = \frac{15,7+24,3+10+20}{4} = 17,50$$

$$(+1)_{\theta} = \frac{10+20+4,3+19,3}{4} = 13,40$$

$$(-1)_{\theta} = \frac{15,7+24,3+13+35,7}{4} = 22,18$$

Los datos fueron recopilados en el cuadro 27 del capítulo III.

Cuadro 32 Estimación de los efectos principales

	T	t _m	θ	
(+1)	24,83	18,08	13,40	Promedio de valores altos
(-1)	10,75	17,50	22,18	Promedio de valores bajos
Δ	14,08	0,58	-8,78	Efecto Δ

Fuente: Elaboración propia.

Cabe indicar que el efecto Δ, es una diferencia entre los promedios altos y bajos.

ANEXO 4 CÁLCULO DE LA SUMA DE CUADRADOS

Para calcular la suma de los cuadrados de los efectos

Para los puntos alrededor. De acuerdo al siguiente cuadro:

Cuadro 33 Histamina promediada con respecto a los factores codificados.

Experimento	T	t _m	θ	Y
1	-1	-1	-1	15,7
2	+1	-1	-1	24,3
3	-1	+1	-1	13,0
4	+1	+1	-1	35,7
5	-1	-1	+1	10,0
6	+1	-1	+1	20,0
7	-1	+1	+1	4,3
8	+1	+1	+1	19,3

Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo a la ecuación A.5:

$$SS_{Total} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^r Y_{ijk}^2 - \frac{Y^2}{Nr}$$

donde:

$$N = 8, r = 3$$

$$SS_{Total} = \left(10^2 + 18^2 + 5^2 + 32^2 + 10^2 + 20^2 + 5^2 + 15^2 + 17^2 + 30^2 + 17^2 + 35^2 + 10^2 + 20^2 + 3^2 + 15^2 + 20^2 + 25^2 + 17^2 + 40^2 + 10^2 + 20^2 + 5^2 + 28^2\right) - \frac{(10+18+5+32+10+20+5+15+17+30+17+35+10+20+3+15+20+25+17+40+10+20+5+28)^2}{8 \times 3}$$

$$SS_{Total} = 2285,96$$

Para el cálculo de la suma de cuadrados de cada uno de los efectos se requiere el siguiente cuadro:

Cuadro 34 Multiplicación de la histamina con los factores codificados.

$T \times Y$	$t_m \times Y$	$\theta \times Y$	$T \times t_m$	$T \times \theta$	$t_m \times \theta$	$T \times t_m \times \theta$
-15,7	-15,7	-15,7	+15,7	+15,7	+15,7	-15,7
+24,3	-24,3	-24,3	-24,3	-24,3	+24,3	+24,3
-13,0	+13,0	-13,0	-13,0	+13,0	-13,0	+13,0
+35,7	+35,7	-35,7	+35,7	-35,7	-35,7	-35,7
-10,0	-10,0	+10,0	+10,0	-10,0	-10,0	+10,0
+20,0	-20,0	+20,0	-20,0	+20,0	-20,0	-20,0
-4,3	+4,3	+4,3	-4,3	-4,3	+4,3	-4,3
+19,3	+19,3	+19,3	+19,3	+19,3	+19,3	+19,3

Fuente: Elaboración propia.

De tal modo que se halla la suma de cuadrado debido a cada variable, según el teorema de Yates:

$$SS_T = 3 \times \frac{(-15,7 + 24,3 - 13 + 35,7 - 10 + 20 - 4,3 + 19,3)^2}{8 \times 1} = 1188,63$$

$$SS_{t_m} = 3 \times \frac{(-15,7 - 24,3 + 13 + 35,7 - 10 - 20 + 4,3 + 19,3)^2}{8 \times 1} = 1,98$$

$$SS_{\theta} = 3 \times \frac{(-15,7 - 24,3 - 13 - 35,7 + 10 + 20 + 4,3 + 19,3)^2}{8 \times 1} = 462,00$$

$$SS_{T_m} = 3 \times \frac{(15,7 - 24,3 - 13 + 35,7 + 10 - 20 - 4,3 + 19,3)^2}{8 \times 1} = 136,80$$

$$SS_{T\theta} = 3 \times \frac{(15,7 - 24,3 + 13 - 35,7 - 10 + 20 - 4,3 + 19,3)^2}{8 \times 1} = 14,88$$

$$SS_{t_m\theta} = 3 \times \frac{(15,7 + 24,3 - 13 - 35,7 - 10 - 20 + 4,3 + 19,3)^2}{8 \times 1} = 85,50$$

$$SS_{T_m\theta} = 3 \times \frac{(-15,7 + 24,3 + 13 - 35,7 + 10 - 20 - 4,3 + 19,3)^2}{8 \times 1} = 31,05$$

Entonces la suma total de los efectos principales e interacciones es:

$$SS_{Efectos} = 1188,63 + 1,98 + 462,00 + 136,80 + 14,88 + 85,50 + 31,05 = 1920,84$$

De acuerdo al Teorema de Yates, se obtiene la suma total de los bloques, el cual es:

$$SS_{Bloques} = 160,33$$

Para calcular la suma total del error

Para determinar la suma de cuadrados del error total se aplica la ecuación A.3:

$$SS_{Error} = \sum_{i=1}^{n_0} (Y_i^o - \bar{Y}^o)^2$$

Cuadro 35 Suma de cuadrados del error de histamina.

	H_i	H_i^o	$(H_i^o - \bar{H}^o)$	$(H_i^o - \bar{H}^o)^2$
1	10	15,7	-5,70	32,49
2	18	24,3	-6,30	39,69
3	5	13,0	-8,00	64,00
4	32	35,7	-3,70	13,69
5	10	10,0	0,00	0,00
6	20	20,0	0,00	0,00
7	5	4,3	0,70	0,49
8	15	19,3	-4,30	18,49
9	17	15,7	1,30	1,69
10	30	24,3	5,70	32,49
11	17	13,0	4,00	16,00
12	35	35,7	-0,70	0,49
13	10	10,0	0,00	0,00
14	20	20,0	0,00	0,00
15	3	4,3	-1,30	1,69
16	15	19,3	-4,30	18,49
17	20	15,7	4,30	18,49
18	25	24,3	0,70	0,49
19	17	13,0	4,00	16,00
20	40	35,7	4,30	18,49
21	10	10,0	0,00	0,00
22	20	20,0	0,00	0,00
23	5	4,3	0,70	0,49
24	28	19,3	8,70	75,69
			Suma	369,35

Fuente: Elaboración propia.

Entonces la suma de cuadrados del error es:

$$SS_{Error} = 369,35$$

Para calcular los grados de libertad

De acuerdo al siguiente cuadro:

Cuadro 36 Ecuaciones para determinar los grados de libertad de los factores, bloques y error.

Factores	Grados de libertad
T	$n - 1$
t_m	$n - 1$
θ	$n - 1$
T x t_m	$n - 1$
T x θ	$n - 1$
t_m x θ	$n - 1$
T x t_m x θ	$n - 1$
Bloques	$n(n-1)$
Error	$n_e = (n_0 - 1) - 7(n-1) - n(n-1)$
Total	$n_t = n_0 - 1$

Fuente: Elaboración propia.

Teniendo en cuenta: $N = 8$, $n_0 = 24$ y $n = 2$

Reemplazando valores tenemos:

Cuadro 37 Grados de libertad de los factores, bloques y error con valores numéricos.

Factores	Grados de libertad	
T	$n - 1$	$2 - 1 = 1$
t_m	$n - 1$	$2 - 1 = 1$
θ	$n - 1$	$2 - 1 = 1$
$T \times t_m$	$n - 1$	$2 - 1 = 1$
$T \times \theta$	$n - 1$	$2 - 1 = 1$
$t_m \times \theta$	$n - 1$	$2 - 1 = 1$
$T \times t_m \times \theta$	$n - 1$	$2 - 1 = 1$
Bloques	$n(n-1)$	$2(2 - 1) = 2$
Error	$n_e = (n_0 - 1) - 7(n-1) - n(n-1)$	$(24 - 1) - 7(2 - 1) - 2(2-1) = 14$
Total	$n_t = n_0 - 1$	$23 - 1 = 23$

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 5 CÁLCULO DE LOS CUADRADOS MEDIOS, F_0 CALCULADO y F_0 TABULADO

Para calcular el estadístico F se utilizó la ecuación (A.6).

$$F_0 = \frac{MS_{Efectos}}{MS_{Error}}$$

La suma de los cuadrados medios está definida por las ecuaciones A.7 y A.8

$$MS_{Efectos} = \frac{SS_{Efectos}}{gl_T}$$

$$MS_{Error} = \frac{SS_{Error}}{gl_E}$$

Se conoce: $gl_T = 1$, $gl_{tm} = 1$, $gl_\theta = 1$, $gl_{Txm} = 1$, $gl_{Tx\theta} = 1$, $gl_{tmx\theta} = 1$, $gl_{Bloques} = 2$ y $gl_E =$

14

Entonces para cada factor se determinó su correspondiente F_0 calculado así tenemos:

$$F_{o(T)} = \frac{1190,04 / 1}{209,0 / 14} = 79,71$$

$$F_{o(t_m)} = \frac{2,04 / 1}{209,0 / 14} = 0,14$$

$$F_{o(\theta)} = \frac{459,37 / 1}{209,0 / 14} = 30,77$$

$$F_{o(Tx_m)} = \frac{135,37 / 1}{209,0 / 14} = 9,07$$

$$F_{o(Tx\theta)} = \frac{15,04 / 1}{209,0 / 14} = 1,01$$

$$F_{o((t_m \times \theta))} = \frac{84,37 / 1}{209,0 / 14} = 5,65$$

$$F_{o(Txt_m \times \theta)} = \frac{30,37 / 1}{209,0 / 14} = 2,03$$

$$F_{o(Bloques)} = \frac{160,33 / 2}{209,0 / 14} = 5,37$$

De acuerdo a la pág. 736, Apéndice estadístico F_0 , del libro “Probabilidad y Estadística”, según Walpole / Myers (1992), considerando un 95 % de nivel de confianza, $gl_{tratamientos} = 1$ y $gl_E = 14$ el valor de F (tabulado) es 4,60.

ANEXO 6 ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO DEL PESCADO

Cuadro 38 Características físicas y organolépticas del pescado, con calificación y puntaje respectivo.

Características físicas	Calificación	Puntaje
SUPERFICIE Y CONSISTENCIA		
Superficie lisa brillante; color luminoso, mucílago claro y transparente. Consistencia firme y elástico bajo la presión de los dedos.	Firme	4
Superficie aterciopelada y sin brillo; color pálido, mucílago lechoso y opaco. Consistencia un poco relajada y elasticidad disminuida.	Poco firme	3
Superficie granulosa; mucílago gris, amarillento y denso. Consistencia clara relajada, escamas fácilmente separables de la piel.	Relajada	2
Superficie muy granulosa; color sucio e impreciso, mucílago turbio amarillento o marrón rojizo, grumoso. Consistencia blanda se quedan impresos los dedos.	Blanda	1
OJOS		
Globo ocular hinchado y abombado, córnea clara y brillante, pupila negro oscuro.	Hinchado	4
Globo ocular plano, córnea apalecente, pupila opaca.	Plano	3
Globo ocular luminoso, córnea acuosa u turbia, pupila gris lechosa.	Luminoso	2
Globo ocular contraído, córnea turbia, pupila opaca, cubierta de mucílago turbio gris amarillento.	Contraído	1
BRANQUIAS		
Color rojo sanguíneo, mucílago claro transparente y filamentoso.	Rojo sanguíneo o cereza	4
Color rosa pálido, mucílago opaco.	Rosa pálido	3

Color rojo grisáceo y acuoso, mucílago claro turbio y denso.	Rojo grisáceo	2
Color sucio marrón rojizo, mucílago turbio gris y grumoso.	Marrón	1
CAVIDAD ABDOMINAL Y ÓRGANOS		
Superficie de corte de los lóbulos ventrales con color natural sin decoloración, peritoneo liso y brillante, firme riñones, restos orgánicos (excepto partes del estómago e intestinos) así como sangre aórtica, rojo profundo.	Liso y brillante	4
Superficie de corte de los lóbulos ventrales aterciopelados y sin brillo igual que los lóbulos ventrales mismos, zona rojiza a lo largo de la espina central, riñones y restos orgánicos rojo pálido como laca.	Sin brillo	3
Superficie de corte de los lóbulos ventrales amarillentos, peritoneo granuloso; áspero separable del cuerpo, riñones, restos orgánicos y sangre marrón rojizo.	Amarillentos	2
Superficie de sección de los lóbulos ventrales turbia y pegajosa, peritoneo fácilmente separable; riñones y restos orgánicos turbios y pastosos, sangre acuosa de color marrón sucio con tono violeta.	Turbia y pegajosa	1
OLOR		
Practicado en la superficie, branquias, cavidad abdominal frescos como el agua de mar.	A mar	4
Ya no como el agua de mar pero fresco y específico.	Fresco	3
Olor neutral o ligeramente ácido, parecido al de la cerveza.	Neutral	2
Olor pesado o rancio, violento a pescado, de trimetilamina.	Rancio	1

fuente: Witffogel (1987).

Donde:

<u>PUNTAJE</u>	<u>CALIFICACIÓN</u>
4	17 - 20 : Excelente
3	13 - 16 : Muy bueno
2	09 - 12 : Bueno
1	08 a menos : Malo

ANEXO 7 CALIFICACIÓN Y PUNTUACIÓN DEL COLOR DEL FILETE DE PERICO.

Cuadro 39 Calificación y puntuación del color en el filete de perico.

Características	Puntuación
Decolorada	1
Aspecto céreo con tonalidades rosadas	2
Aspecto céreo, removida, más oscura y roja	3
Rojo cereza	4

Fuente: Nielsen y col (1992)

ANEXO 8 CALIFICACIÓN Y PUNTUACIÓN DEL SABOR DEL FILETE DE PERICO.

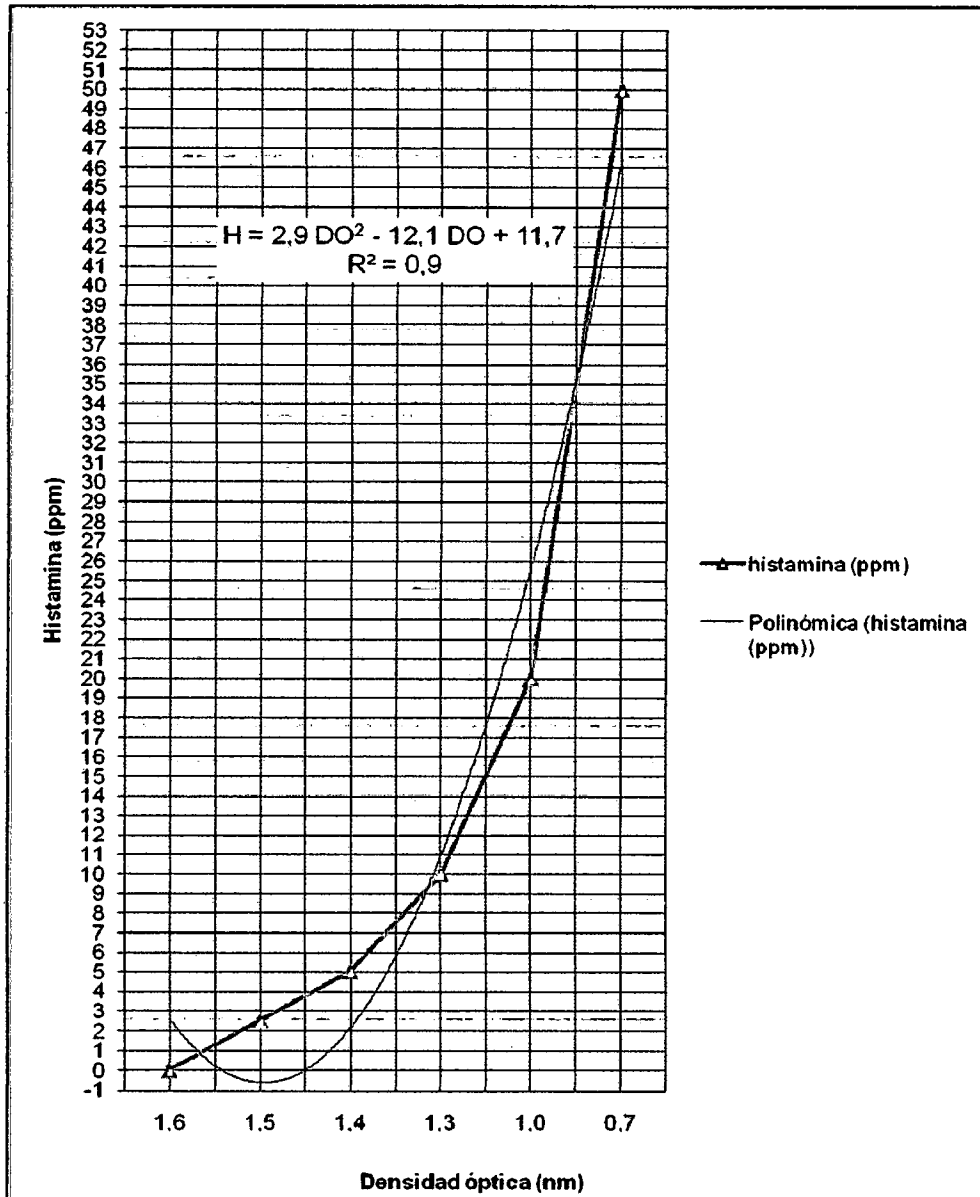
Cuadro 40 Calificación y puntuación del sabor en el filete de perico.

Calificación	Puntuación
Amoniaca	3
Amargo	4
Agrio	5
Dulce	6
Neutral	7
Característico	8
Menos succulento	9
Muy succulento	10

Fuente: Sofia Pons (2005)

ANEXO 9 CÁLCULO DE LA CONCENTRACION DE HISTAMINA CON RESPECTO A LA DENSIDAD ÓPTICA.

Figura 42 Ecuación cuadrática de la concentración histamina con respecto a la densidad óptica de las muestras de control.



Fuente: Elaboracion propia.

ANEXO 10 PROTOCOLO TECNICO DEL GAS NORMAL APLICADO AL FILETE DE PERICO



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N° 0003

PRODUCTO : MEZCLA DE GASES

NOMBRE QUÍMICO : - NITRÓGENO 30 %
 - MONÓXIDO DE CARBONO 70 %

PRESENTACIÓN : Cilindros por 6 m³

N° DE CILINDRO : Se anexa relación

LOTE : 00130038

FECHA DE PRODUCCIÓN : 30 - 01 - 09

FECHA DE ANALISIS : 30 - 01 - 09

FECHA DE EXPIRACIÓN : NO PERESIBLE

PARÁMETROS	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	Gas incoloro, inodoro insípido.	Gas incoloro, inodoro insípido.
IDENTIFICACION: Válvula Presión	Conforme Conforme	CGA 350 2000 psi
COMPONENTES Nitrógeno Monóxido de carbono	30.02 % 69.80 %	30.00 % 70.00 %

Comentarios

Análisis efectuado mediante cromatografía gaseosa.

Identificación de los cilindros en base a las indicaciones de la norma ISO 448.

Almacenaje y manipuleo de todos nuestros cilindros cumplen con las especificaciones y normas de control de calidad y las indicaciones de la norma ISO 11625.

Prueba hidrostática de acuerdo a las indicaciones de la DOT: Department of transportation de los EE UU. y la norma ISO 6406.

Los protectores de válvula y el precinto de llenado están de acuerdo a las indicaciones de la CGA.



ANEXO 11 PROTOCOLO TECNICO DEL GAS ECOLOGICO APLICADO AL FILETE DE PERICO



PROTOCOLO DE ANALISIS N° 0004

PRODUCTO : MEZCLA DE GASES
NOMBRE QUÍMICO : - DIÓXIDO DE CARBONO 25 %
 - MONÓXIDO DE CARBONO 25 %
PRESENTACIÓN : Cilindros por 6 m³
N° DE CILINDRO : Se anota relación
LOTE : 00130031
FECHA DE PRODUCCIÓN : 30 - 01 - 09
FECHA DE ANALISIS : 30 - 01 - 09
FECHA DE EXPIRACIÓN : NO PERESIBLE

PARÁMETROS	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS	Gas incoloro, inodoro insípido.	Gas incoloro, inodoro insípido.
IDENTIFICACIÓN: Válvula Presión	Conforme Conforme	SDA 350 2000 psi
COMPONENTES Dióxido de carbono Monóxido de carbono Oxígeno y nitrógeno Metano Fenoles aromáticos	25.06 % 25.08 % 45.03 % 4.03 % 15,6 ppb	25.00 % 25.00 % 45.00 % 4.00 % 15,6 ppb

Comentarios

Análisis efectuado mediante cromatografía gaseosa.

Identificación de los cilindros en base a las indicaciones de la norma ISO 448.

Almacenaje y manipuleo de todos nuestros cilindros cumplen con las especificaciones y normas de control de calidad y las indicaciones de la norma ISO 11625.

Prueba hidrostática de acuerdo a las indicaciones de la DOT: Department of transportation de los EE UU. y la norma ISO 6406.

Los protectores de válvula y el precinto de llenado están de acuerdo a las indicaciones de la CGA.