

*Estudio del efecto de la inclusión de Fucus spiralis  
liofilizado en un envase biodegradable de gelatina, sobre  
la calidad de caballa conservada en refrigeración a 4°C*

## Modalidad INVESTIGACIÓN

### *Trabajo Final de Máster Nutrición y Salud*

-Autor: Pedro Nozal Cantarero.

-Dirección y coordinación:

Prof. Dr. Santiago Aubourg Martínez. IIM-CSIC-Vigo.

-Directora: María José Alonso Osorio

1er semestre 2019/20



Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada  
(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/deed.es>)

## Tabla de contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>4</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>5</b>
<b>Metodología .....</b>	<b>6</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>19</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>30</b>
<b>Agua y Lípidos totales.....</b>	<b>30</b>
<b>Oxidación lipídica .....</b>	<b>31</b>
<b>Microbiología .....</b>	<b>32</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>33</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>34</b>

## Resumen

Como resultado de la creciente demanda de productos marinos frescos de calidad, la tecnología de alimentos ha desarrollado una gran diversidad de estrategias novedosas de refrigeración que han contribuido al desarrollo continuo y a la innovación en el sector. Entre las soluciones tecnológicas propuestas, se encuentra el empleo de algas como potenciales elementos antimicrobianos y antioxidantes. Algunos trabajos recogen ya resultados esperanzadores a partir de diversas especies, muy abundantes en las costas gallegas debida a la acción de sus componentes (terpenos, polifenoles, y florotaninos). En este proyecto hemos intentado comprobar si existen diferencias significativas en la degradación del músculo de caballa (*Scomber scombrus*), una vez conservada en refrigeración en un biofilm biodegradable incluyendo distintas concentraciones de *F. spiralis* liofilizado. Puede abrir nuevos campos de investigación en la misma dirección y ser una solución sostenible para el transporte, conservación y exposición de los productos marinos.

## Palabras clave

Investigación, *Fucus spiralis*, refrigeración, pescado, actividad microbiana, antioxidantes, gelatina, biofilm.

## Abstract

As a result of the growing demand for quality fresh marine products, food technology has developed a great diversity of innovative refrigeration strategies that have contributed to continued development and innovation in the sector. Among the proposed technological solutions is the use of algae as potential source of antimicrobial and antioxidant elements. Some works already have encouraging results from different species, very abundant in the Galician coast due to the action of their polyphenolic components, etc. In this project we have tried to verify if there are significant differences in the degradation of mackerel muscle (*Scomber scombrus*) when preserved in a biofilm including lyophilized *Fucus spiralis* with different. The development of such strategy can open new research fields in the same direction and be a sustainable solution for the transport, conservation and exposure of marine products.

## Keywords

Research, *Fucus spiralis*, refrigeration, fish, microbial activity, antioxidants, gelatin, biofilm.

## Introducción

En los últimos años, ha crecido la demanda de productos marinos frescos de alta calidad. Para ello, la tecnología de los alimentos, ha desarrollado una gran diversidad de estrategias novedosas de refrigeración, combinada con productos naturales biodegradables, que han contribuido al desarrollo y a la innovación en el sector<sup>1</sup>.

Uno de esos posibles sistemas de conservación sería mantener el pescado refrigerado rodeado de un “biofilm”<sup>2</sup>, consistente en un “envoltorio” de glicerina con alginato, que le proporcionaría la suficiente elasticidad para rodear al pescado fresco y mantenerlo relativamente aislado del entorno. En esas láminas se ha integrado previamente un liofilizado de *F. spiralis* en distintas concentraciones<sup>3</sup>.

Las algas han sido consideradas, en los últimos años, potenciales elementos antimicrobianos y antioxidantes<sup>4</sup>. Algunos trabajos recogen ya resultados esperanzadores a partir de diversas especies, muy abundantes en las costas gallegas. Su actividad se concretaría en su alto contenido en terpenos, polifenoles, y florotaninos oligoméricos (Miranda et al)<sup>1</sup>. Se preparó un “biofilm” impregnado del nombrado liofilizado de “*F. spiralis*” liofilizado, bien homogeneizado, que le podría dar las características que reducirían su enranciamiento o degradación, dificultando, además el ataque de microorganismos, fundamentalmente de origen bacteriano. El alga liofilizada se obtuvo de una empresa gallega dedicada al trabajo y comercialización de algas marinas y se homogenizó con gelatina y alginato para obtener unas láminas flexibles<sup>3</sup> donde “empaquetar” el músculo de pescado a estudiar y analizar<sup>5</sup>.

Diversos estudios en Galicia y fuera de España han precedido este trabajo que nos anima a seguir esa línea, con la finalidad de seguir avanzando en la mejora de la capacidad de conservación del pescado con productos naturales biodegradables que eviten la necesidad de utilizar polímeros no biodegradables, aditivos sintéticos y exceso de tratamientos en frío con los que el producto pierde, entre otras cualidades, partes de sus atributos organolépticos<sup>5,6</sup>. En este proyecto intentaremos comprobar si existen diferencias significativas en la degradación, con el paso del tiempo, en el músculo de caballa, empleando diversas concentraciones de alga liofilizada.

Podría abrir nuevos campos de investigación en la misma dirección y una solución sostenible para el transporte, conservación y exposición de los productos marinos.

## Objetivos

### Objetivo general del proyecto:

Estudiar la mejora de la calidad del pescado refrigerado a 4°C como consecuencia de la adición de *F. spiralis* liofilizado al biofilm.

### Objetivos específicos:

1. Elaborar un protocolo lo más sencillo posible en el laboratorio, para obtener películas de gelatina con inclusión de *F. spiralis* liofilizado en diversas concentraciones: 0% (control), 5%, y 20%.
2. Comprobar la inhibición de la hidrólisis lipídica de origen enzimático con distintas concentraciones de *F. spiralis* liofilizado, incluido en láminas de gelatina, sobre el músculo de pescado refrigerado.
3. Comprobar la inhibición de la actividad microbiana con distintas concentraciones de *F. spiralis* liofilizado, incluido en láminas de gelatina, sobre el músculo de pescado refrigerado.
4. Comprobar la inhibición de la oxidación lipídica de distintas concentraciones de *F. spiralis* liofilizado, incluido en láminas de gelatina, sobre el músculo de pescado refrigerado.
5. Realizar análisis microbiológicos que nos indiquen la capacidad de inhibir la actividad microbiana, en el músculo de pescado refrigerado, en diversos períodos de tiempo y concentraciones de *F. spiralis* liofilizado.
6. Intentar sugerir el modo de convertir las láminas de gelatina con *F. spiralis* liofilizado, en *láminas* biodegradables comerciales, susceptibles de emplearse como envoltorio del pescado, reemplazando a los plásticos, para la conservación, transporte y exposición del pescado.

## Metodología

**Diseño y tipo de estudio:** El objetivo primero, como indicamos arriba, es verificar las supuestas propiedades antidegradantes contra la actividad de los enzimas endógenos y los microorganismos (bacterias), utilizando liofilizados del alga, *F. spiralis*. Para ello, describiremos en primer lugar la preparación de las láminas o *biofilms*, con *F. spiralis* liofilizado. A continuación, detallaremos los procedimientos analíticos realizados en el laboratorio. Lo relativo al estudio microbiológico lo hemos dejado reservado a los microbiólogos especialistas de la facultad de veterinaria de Lugo.

### 1. Preparación de las láminas definitivas incluyendo el alga

#### 1.1 Preparación de las láminas contenedoras:

Lo primero que nos planteamos es como preparar el “*biofilm*” (en adelante *lámina*) de origen biológico (gelatina, más alginato, más extracto de *F. spiralis*), y el número de láminas necesario para envolver todas las muestras. Es una opción que se plantea en los estudios de nuevos envoltorios biodegradables para uso comercial<sup>7</sup>. Para ello, en primer lugar, hemos de preparar del hidrogel de alginato oxidado, gelatina y *F. spiralis* liofilizado<sup>8</sup>.

#### 1.2 Preparación del hidrogel

Preparamos el alginato liofilizado, como se indica en la Figura 1: Seguimos la técnica de Balakrishnan (2005)<sup>9</sup>.

A continuación, preparamos el “envoltorio” de glicerina con alginato, conteniendo diversas concentraciones de *F. spiralis* liofilizado, que supusimos proporcionaría a las muestras la suficiente protección y elasticidad para cubrir el músculo del pescado fresco refrigerado y mantenerlo relativamente aislado del entorno<sup>10</sup>. Las láminas de gelatina con alginato las hemos preparado en el laboratorio del centro. Se elaboraron incluyendo 50 g de gelatina (al 10%), en 475 ml de NaOH 0,01 M (con el objetivo de darle un ligero carácter básico), La disolución contiene glicerol y alginato que proporcionan cierta elasticidad al biofilm, evitando su fragmentación. Se tomaron muestras los días 0, 2, 6 y 9 del músculo de caballa refrigerada.

Otro aspecto a considerar eran las concentraciones de extracto liofilizado de *F. spiralis* que impregnarían los biofilms para analizar las muestras. El *F. spiralis* liofilizado ha sido proporcionado por una empresa gallega comercializadora de algas. Se aplicó a la gelatina en diversas concentraciones: 0% (control); 5% (muestras 2) y 20% (muestras 3).<sup>11</sup>

## SÍNTESIS DE ALGINATO OXIDADO (Balakrishnan, 2005)

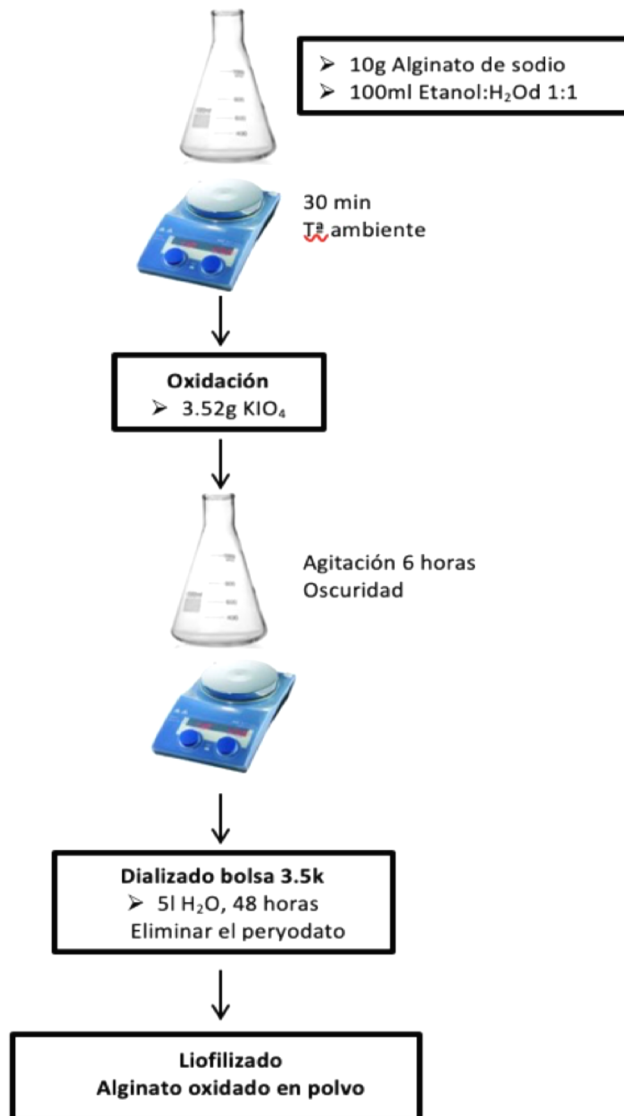


Figura 1: Procedimiento y técnica de síntesis de alginato oxidado. (Balakrishnan, 2005)

## PREPARACIÓN BIOFILM

**Observaciones:** Cantidades calculadas para preparar una solución de gelatina de 1000ml para 4 bandejas de ≈250ml cada una

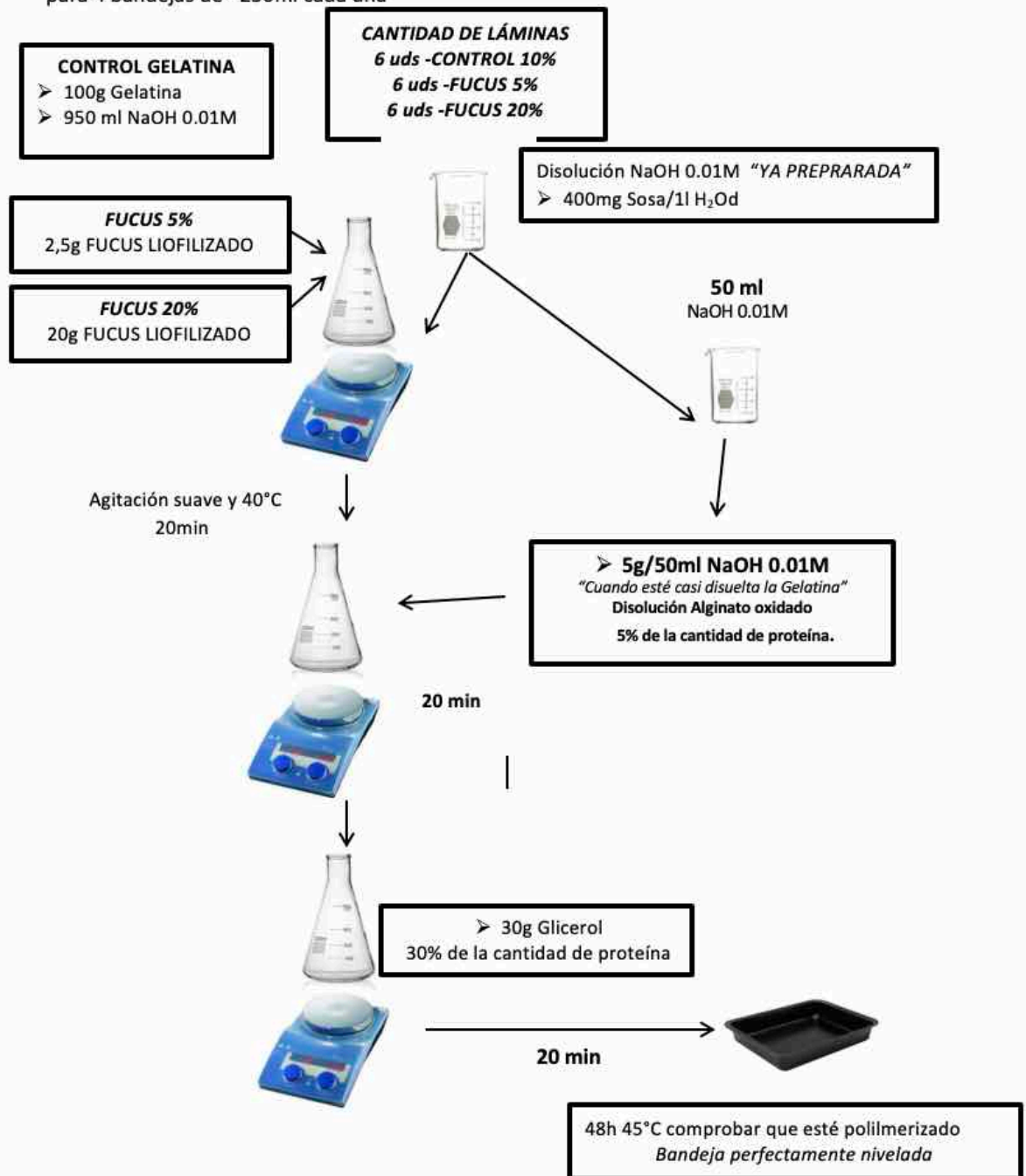


Figura 2: Preparación de Láminas de Gelatina + Alginato con Fucus.

### 1.3. Preparación de las láminas:

Para hacer los biofilms necesitamos *alginato oxidado*. Este evitará en la disolución final que los biofilms, al evaporarse el agua de las bandejas, queden adheridos al fondo de la bandeja.



Para cada bandeja necesitamos aproximadamente 1,25 g de *alginato oxidado*.

10 g de *alginato de sodio* permiten preparar 8 biofilms (8 bandejas):

Disolvemos 10 g de *Alginato de sodio* en una disolución de 100ml de etanol en agua destilada (1:1). En un vaso de precipitados.

Agitamos (agitador) 30 min a temperatura ambiente.

A continuación, añadimos a la solución 3,25 g de *periodato potásico* ( $KIO_4$ ). Es el que va a provocar la oxidación de la disolución. Se agita en oscuridad (todo el vaso recubierto de papel de aluminio) entre 4 y 6 horas. A continuación, se distribuye la disolución en *bolsas de diálisis* que se introducen en agua destilada, en un vaso de 2,5 litros. Las membranas de diálisis de las bolsas son de 3,5 kDa (kilodalton). Con esto eliminamos el peryodato potásico. Se dejan 48 h con agitador y con el vaso cubierto de papel de aluminio tapando la boca. Al cabo de 48 h, el dializado que queda en las bolsitas de diálisis se pasa a tubos de *liofilización*. Se introduce en cámara de congelación a  $-70^{\circ}C$ .

A las 24 h se llevan los tubos de liofilización al *liofilizador* que debe estar preparado con su presión negativa y temperatura de congelación. El liofilizador después de 48 h deja en los tubos (al extraer el congelado del tubo) el *Alginato oxidado liofilizado* (en polvo).

Hemos obtenido en teoría 10 g de Alginato oxidado. En la práctica suele quedar reducido a 8 g. que nos permitirá usarlo para obtener unos 6 biofilms ( $8/6= 1,3$  g).

Preparamos primero el control, disolviendo 100 g de gelatina en una disolución de sosa 0,01 M (400 mg de sosa en 1 l de  $H_2O$ ).

Homogeneizamos.

#### **1.4. Preparación de disoluciones problema para láminas con *F. spiralis***

Repartimos en dos matraces de 500 ml NaOH 0,01 M, previamente preparada, añadiendo en uno 25 g de *F. spiralis* liofilizado y en otro 100 g, quedándonos las dos disoluciones respectivamente al 5% y al 20%.

Homogeneizamos a  $40^{\circ}C$  durante 20 minutos.

Una vez disuelta la gelatina, añadimos la disolución de alginato oxidado liofilizado al 10% m/v y homogeneizamos durante 20 min.

A continuación, se vierte la solución en las bandejas (unos 250 ml por bandeja). Se dejan es estufa 48 horas a 45°C hasta comprobar que todo esté polimerizado.

Ya tenemos listas las láminas para envolver las muestras de músculo de pescado en ellas: 3 muestras en cada lámina o *biofilm*. Para ello, necesitaremos, al menos, preparar 20 láminas.

En la tabla 1 se exponen estos datos:

MUESTREOS	FECHAS	LÁMINAS	TOTAL 18						
									3 muestras estériles Lugo 2 caballas
INICIAL	10/9/19	Martes							3 muestras estériles Vigo 2 caballas
			Control	5%	20%				
			1 Lugo con 3 muestra	1 Lugo con 3 muestra	1 Lugo con 3 muestras				
DÍA 2 (segundo)	12/9/19	Jueves				6 LÁMINAS			
			1 Vigo con 3 muestra	1 Vigo con 3 muestra	1 Vigo con 3 muestras				
			1 Lugo con 3 muestra	1 Lugo con 3 muestra	1 Lugo con 3 muestras				
DÍA 6 (sexto)	16/9/19	Lunes				6 LÁMINAS			
			1 Vigo con 3 muestra	1 Vigo con 3 muestra	1 Vigo con 3 muestras				
			1 Lugo con 3 muestra	1 Lugo con 3 muestra	1 Lugo con 3 muestras				
DÍA 9 (noveno)	19/9/19	Jueves				6 LÁMINAS			
			1 Vigo con 3 muestra	1 Vigo con 3 muestra	1 Vigo con 3 muestras				
			1 Lugo con 3 muestra	1 Lugo con 3 muestra	1 Lugo con 3 muestras				
				6	54	TOTAL			
				6 iniciales	54 muestras	60 muestras o filetes			
				2 muest 1 caballa	Total:	TOTAL			
						30 caballas			

**Tabla 1**

**Tabla 1: Biofilms utilizados y número de muestras**

## 2. Pescado “problema”:

El pescado elegido fue caballa (*Scomber scombrus*) capturada en las cercanías de la ría de Vigo. Fue adquirida el mismo día de preparación de las muestras, en la lonja del puerto pesquero. Necesitábamos utilizar 60 muestras para los distintos análisis a realizar. Cada muestra era un filete de caballa, tres en cada lámina. El fileteado se hizo a mano el día 0 (martes 10 de septiembre), obteniéndose 3 filetes por cada ejemplar de caballa. Como explica la tabla 1, son 6 muestras en la fecha 0, sin tratamiento. De ellas 3 se envían al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de Lugo, donde se realiza el análisis microbiológico. Otras 3 se quedan en nuestro laboratorio para los análisis bioquímicos. Para cada muestreo de los días 2, 6 y 9 se necesitan 3 de para Lugo y 3 para Vigo (Control; *F. spiralis* al 5% y *F. spiralis* al 20%); en total 18 muestras por día de muestreo. Al ser 3 días de muestreo, el total son 54 muestras, que más las 6 iniciales hacen 60.

### 3. Analíticas realizadas

#### 3.1 Humedad:

El contenido de agua del músculo se estimó por diferencia de pesada entre el músculo intacto y el músculo deshidratado durante 24 h, en una estufa a 97 °C. Este procedimiento está basado en el método oficial de la AOAC (1985).

#### Materiales:

Balanza de precisión (0,001 mg),

Estufa de desecación.

Desecador con silicagel.

Muestra de músculo de pescado

#### Procedimiento:

Se pesaron cápsulas de papel de aluminio libres de humedad, y en cada una de ellas se incorporaron 0,7-1,0 g de músculo, anotando el peso exacto. Las cápsulas se mantuvieron en una estufa a 97 °C durante al menos 24 h, período necesario para que la muestras alcancen peso constante. Las cápsulas se dejaron enfriar en un desecador y posteriormente se pesaron. La humedad, o contenido de agua, se calculó mediante la diferencia de peso del músculo antes y después de haber sido deshidratado.

El contenido de agua se expresó como los gramos de agua por cada 1000 g de músculo.

#### Cálculo:

Contenido de humedad (tanto por mil) =  $1000 \left( \frac{(B-A) - (C-A)}{(B-A)} \right)$

Donde:

A = Peso del contenedor (papel de aluminio) g.

B = Peso del contenedor más muestra húmeda.

C = Peso del contenedor más muestra seca.

## **3.2 Análisis de lípidos.**

### **3.2.1 Lípidos totales:**

“Extracto de Bligh and Dyer<sup>11</sup>: Con él, obtuvimos un extracto de lípidos a partir del músculo de caballa: Así pudimos determinar los lípidos totales en músculo, además de, poder trabajar con extractos de lípidos, a partir del músculo.

#### Disolventes y reactivos:

Diclorometano  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Normapur-Analar Prolabo)

Metanol  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Normapur-Analar Prolabo)

Sulfato sódico anhidro  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Normapur-Analar Prolabo): Higroscópico: se utiliza como desecante.

En la figura 3 se detalla el procedimiento.

# EXTRACTO Bligh and Dyer

## DISOLVENTES

- Diclorometano  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Normapur-Analar Prolabo)
- Metanol  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Normapur-Analar Prolabo)
- Sulfato Sódico Anhidro  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (Normapur-Analar Prolabo)

## PROCEDIMIENTO:

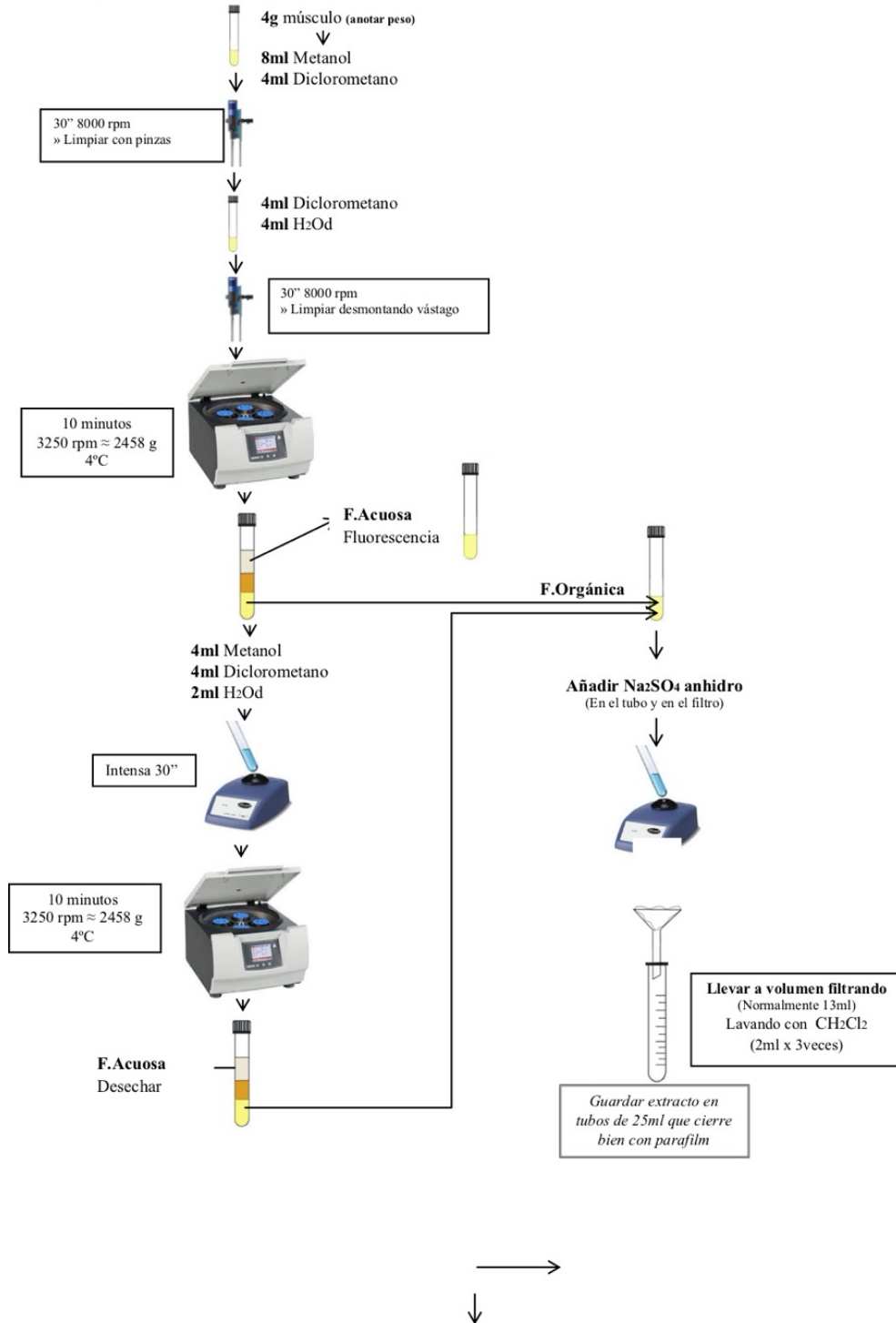


Figura 3: Obtención del extracto de Bligh and Dyer

### 3.2.2 Ácidos grasos libres en músculo<sup>12</sup>

Cuantificar la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos en músculo y membranas a partir de las lipasas y fosfolipasas endógenas y microbianas. Se midió por la formación de ácidos grasos libres<sup>13</sup>. Con estos métodos se empleó espectrofotometría visible y ultravioleta.

### 3.2.3 Índice de peróxidos (oxidación primaria)<sup>14, 15</sup>

Se siguió el modelo de Piedrahita Márquez, citado, que actualiza el original (Chapman y Mackay)<sup>16</sup>.

El contenido de peróxidos, producto de la reacción entre las grasas presentes en el aceite y el oxígeno, define su estado de oxidación primaria y nos da por tanto un parámetro de su tendencia al enranciamiento. Las causas principales del enranciamiento de una grasa, en condiciones normales, son la exposición prolongada al aire (O<sub>2</sub>), unida a temperaturas elevadas y a la acción directa de la luz solar.

Cuando se realiza el método oficial, la muestra problema, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con una disolución de yoduro potásico saturada. El yodo liberado se valora con una disolución de tiosulfato sódico hasta el viraje del almidón.

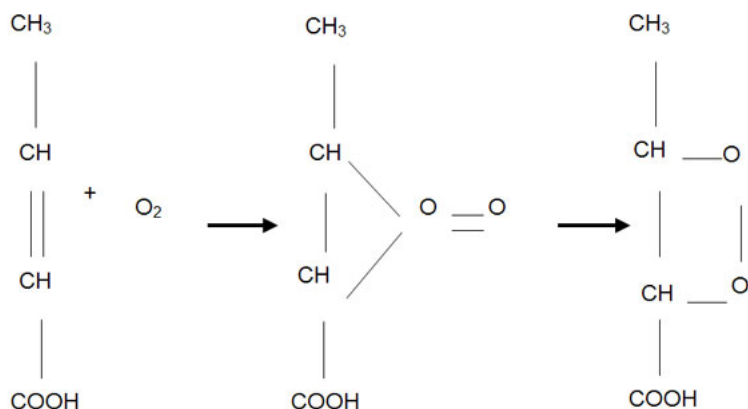


Figura 4: Formación de peróxidos. (Fuente Rodríguez et al., 2010)

### 3.2.4 Índice del ácido tiobarbitúrico (i-TBA) (oxidación secundaria por determinación de aldehídos)<sup>17, 18</sup>.

Resultado de la descomposición de los peróxidos en aldehídos (malondialdehído), cetonas, ácidos, etc. resulta la oxidación secundaria.

Para determinar el daño oxidativo de los lípidos, el método Vyncke (1970) es el más comúnmente utilizado. El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de bajo peso molecular,

formados por la descomposición de ciertos productos de peroxidación lipídica primaria y secundaria. A bajo pH y temperatura elevada, el MDA participa con facilidad en la reacción de adición nucleófila, con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), generando un rojo fluorescente aducto 1:2 MDA:TBA de color rosado intenso. Los “aductos” cromógenos de MDA-TBA son muy estables y se pueden cuantificar por espectrofotometría de absorción visible, en absorbancia a 532 nm. Utilizamos un extracto de músculo de 10 g en 50 ml de TCA al 5%. Tomamos una alícuota del extracto de 5 ml (m/v) + 5 ml de reactivo TBA 0,02 M. (Recta de calibrado patrón: Tetraetoxipropano + 5 ml TCA 5% (m/v)).

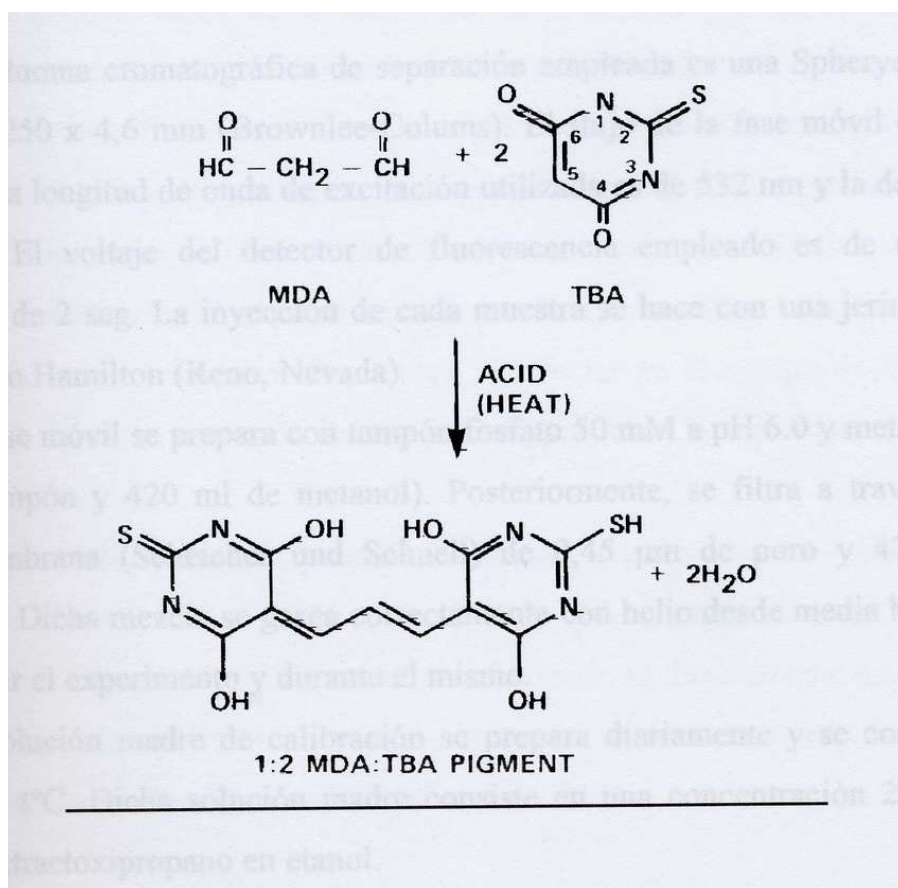
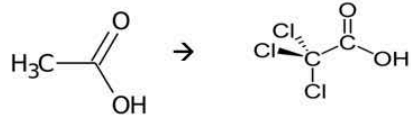


Figura 5: Malondialdehído + TBA. (Fuente: Researchgate: uploaded by Emilio González-García)

**Extracto con TCA (ácido tricloroacético):** Muy utilizado en **bioquímica** por su propiedad de **precipitar macromoléculas**, como **proteínas**, ácido **desoxirribonucleico** (ADN) y ácido **ribonucleico** (ARN).

Deriva del ácido acético al reemplazar los 3 H por 3 átomos de Cl.



**DISOLVENTES:** 5 g de TCA en 100 ml de agua destilada.

**PROCEDIMIENTO:**

1. 10 g de músculo picado se añade a vaso de precipitados con 30 ml de TCA al 5% y se mantiene en hielo.
2. Se homoginiza en ultraturrax 45" ULTRA-TURRAX:

*(Instrumento de dispersión de alto rendimiento para volúmenes de 1 a 2.000 ml (H<sub>2</sub>O) con indicador digital de velocidad. Ofrece un amplio rango de velocidades de 3.000 a 25.000 rpm que permite a los usuarios trabajar a velocidades circunferenciales elevadas. Su función la homogeneización de muestras).*



3. Se enfría en el congelador a -20°C durante 15 min.
4. Se lava el vaso con TCA Frío hasta enrasar a volumen de 50 ml.

**Figura 6: Obtención del extracto de ácido tricloroacético. Fuente: Vyncke, W. 1970**



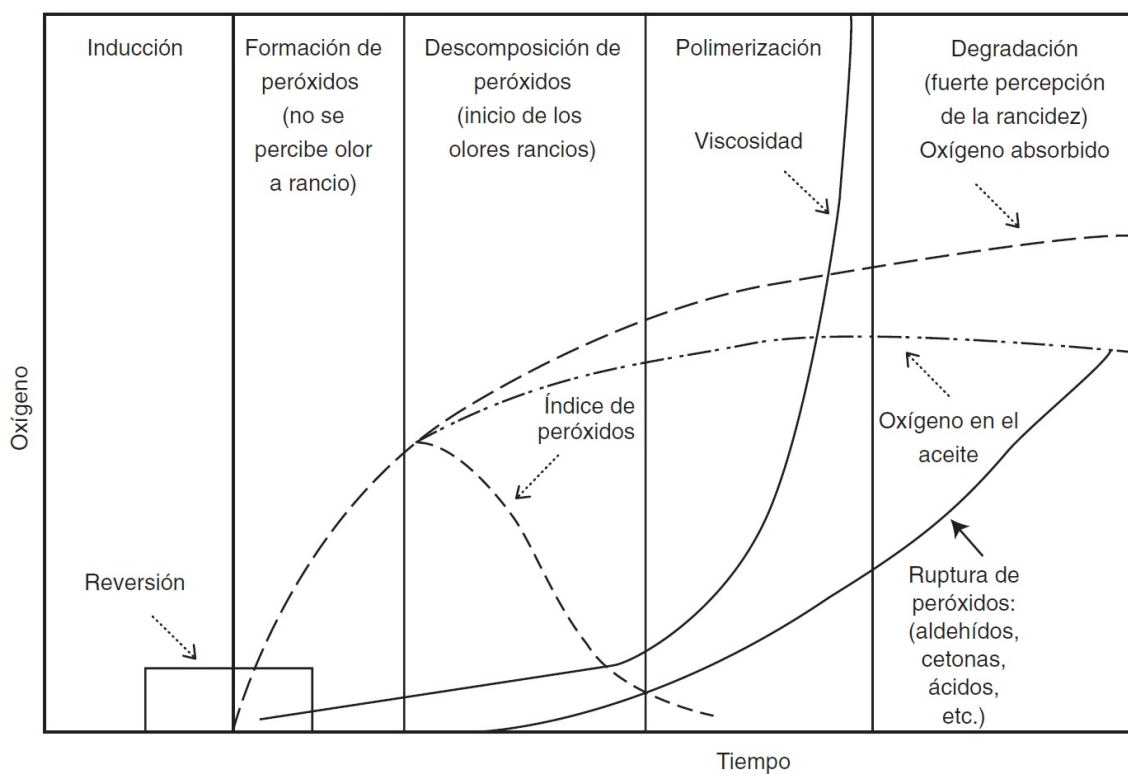


Figura 7: Oxidación lipídica primaria y secundaria (Badui 2006. Ver nota 29).

### 3.2.5 Compuestos de interacción entre productos de oxidación lipídica y compuestos nucleófilos (oxidación terciaria)<sup>19, 20, 21</sup>

Son compuestos de interacción entre lípidos oxidados y restos proteicos.

El método tiene como fundamento la medida de los compuestos fluorescentes<sup>23,24</sup> resultantes de la interacción de los productos de oxidación lipídica con los compuestos que tienen grupos aminos libres (Aubourg, 1999). La interacción de los aldehídos con los grupos aminos de las proteínas origina complejos de interacción que son solubles en medios acuosos.

El contenido de los compuestos fluorescentes se midió en la fase acuosa obtenida durante el proceso de extracción de los lípidos totales, descrito anteriormente, siguiendo el procedimiento indicado antes (Bligh, W. J. Dyer, 1959).

Se midieron con espectrofotometría de fluorescencia<sup>23, 24</sup>. (Perkin ± Elmer LS 3B).

#### **4. Análisis microbiológicos:**

Se llevaron a cabo en los laboratorios de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela (Campus de Lugo). Las distintas muestras fueron sometidas a análisis microbiológicos para dilucidar los efectos de los tratamientos empleados, sobre la microbiota presente. Se estudiaron:

Aerobios mesófilos.

Psicótrofos.

Proteolíticos.

Lipolíticos.

Anaerobios.

## Resultados

### A-Análisis físicoquímicos

#### A-1 Humedad: Determinación del contenido en agua en músculo de caballa refrigerada y conservada bajo distintas condiciones de envasado

Agua ( $\text{g kg}^{-1}$  músculo)

Muestra	Tiempo de refrigeración (días)			
	0	2	6	9
Control	742.2 (18.1)	610.1 (9.51)	556.7 (81.69)	438.7 (31.97)
Diluída		616.0 (11.8)	553.3 (25.2)	501.1 (27.5)
Concentrada		645.8 (25.4)	592.98 (12.9)	553.1 (18.9)

Tabla 2: gramos de agua/Kg de músculo de pescado

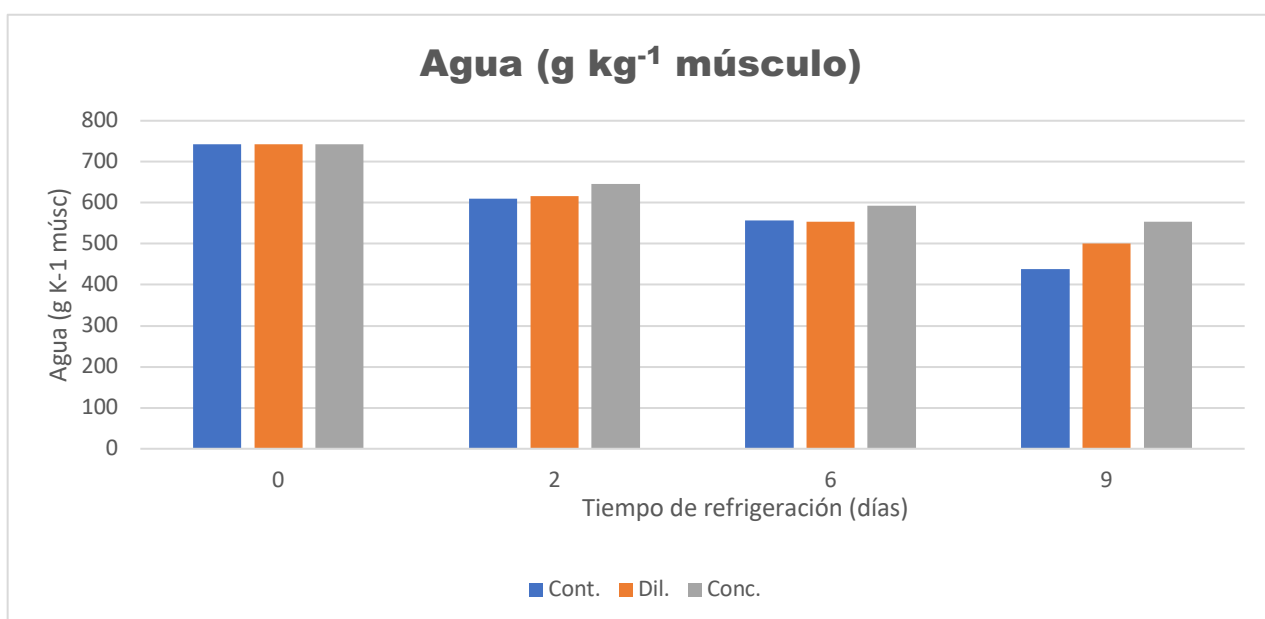


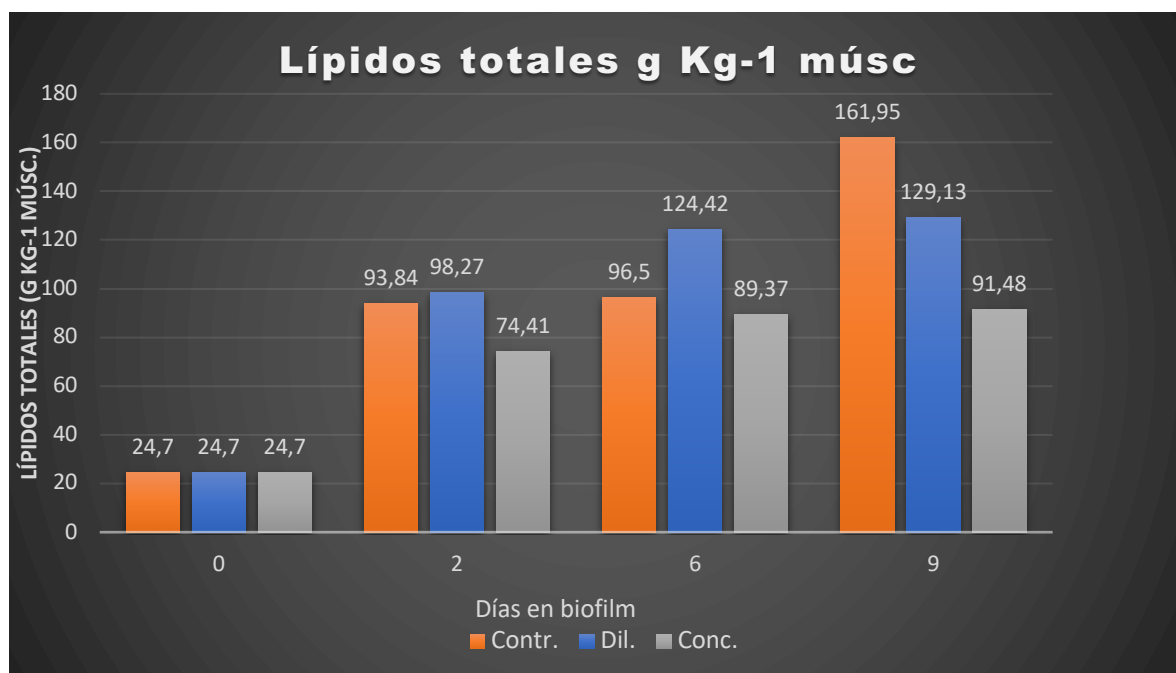
Fig. 8. Humedad: Determinación del contenido en agua en músculo de caballa refrigerada y conservada bajo distintas condiciones de envasado. (Fuente propia. IIM Vigo)

**A-2 Lípidos totales: Determinación del contenido en lípidos en músculo de caballa refrigerada y conservada bajo distintas condiciones de envasado**

Líps (g kg<sup>-1</sup> musc)

Muestra	Tiempo (días)			
	0	2	6	9
Control		93.84 (45.4)	96.50 (65.95)	161.95 (15.07)
Dil	24.77 (16.80)	98.27 (16.76)	124.42 (44.53)	129.13 (23.75)
Conc		74.41 (8.20)	89.37 (33.17)	91.48 (55.01)

**Tabla 3: Determinación del contenido en lípidos en músculo de caballa refrigerada y conservada bajo distintas condiciones de envasado**



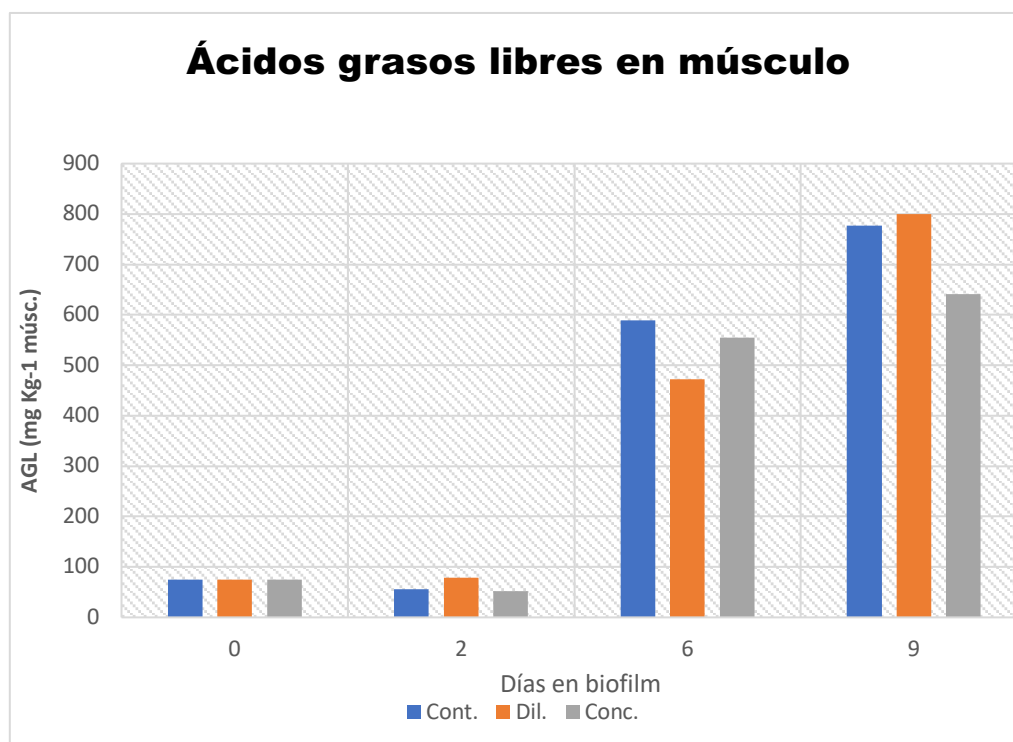
**Fig. 9. Lípidos totales: Determinación del contenido en lípidos en músculo de caballa refrigerada y conservada bajo distintas condiciones de envasado. (Fuente: Idem que figura anterior)**

**A-3 Evolución del contenido en ácidos grasos libres en músculo de caballa refrigerada y conservada bajo distintas condiciones de envasado**

AGL (mg kg<sup>-1</sup> musculo)

Muestra	Tiempo (días)			
	0	2	6	9
Control	74.4 (40.32)	56.28 (0.45)	588.65 (231.00)	777.12 (18.12)
Dil		78.64 (6.72)	472.72 (35.60)	800.42 (45.03)
Conc		52.08 (0.82)	554.28 (166.00)	640.5 (165.00)

*Tabla 4: Ácidos grasos libres en músculo (mg kg<sup>-1</sup> musc)*

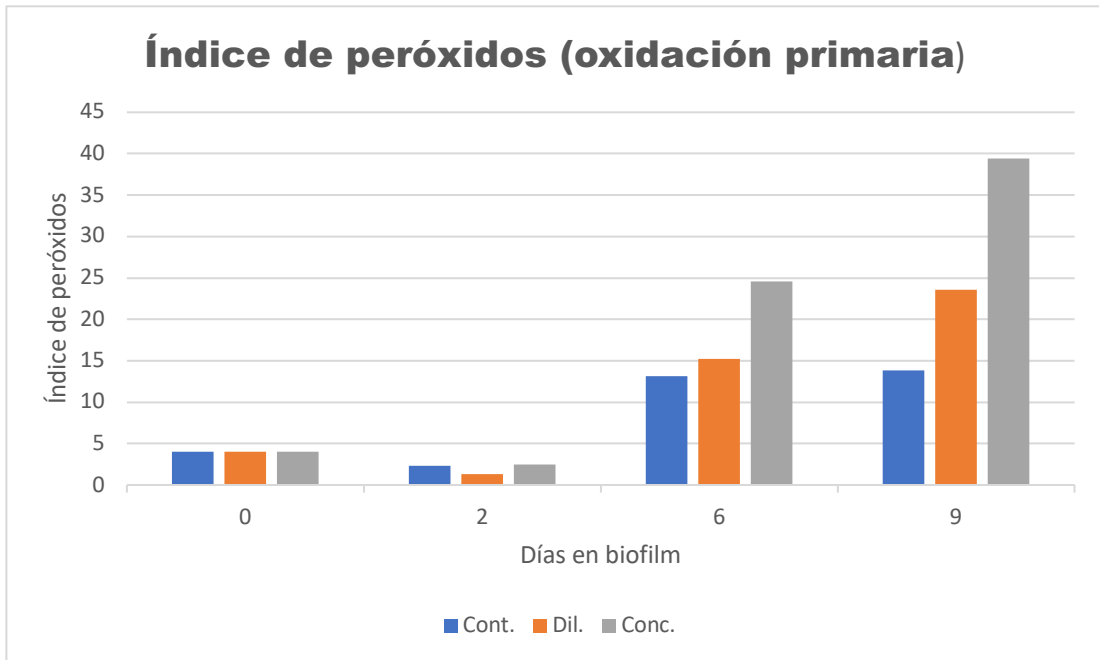


**Figura 10: Evolución del contenido en ácidos grasos libres en músculo de caballa refrigerada y conservada bajo distintas condiciones de envasado. (Fuente: Idem que figura anterior)**

**A-4 Evolución del índice de peróxidos (oxidación primaria) en músculo de caballa refrigerada y conservada bajo distintas condiciones de envasado**

Muestra	Tiempo (días)			
	0	2	6	9
Control		2.34 (0.41)	13.14 (5.40)	13.87 (3.68)
Dil	3.99 (3.61)	1.31 (0.63)	15.26 (7.33)	23.60 (6.39)
Conc		2.44 (0.45)	24.56 (6.36)	39.38 (24.13)

*Tabla 5: Índice de peróxidos*

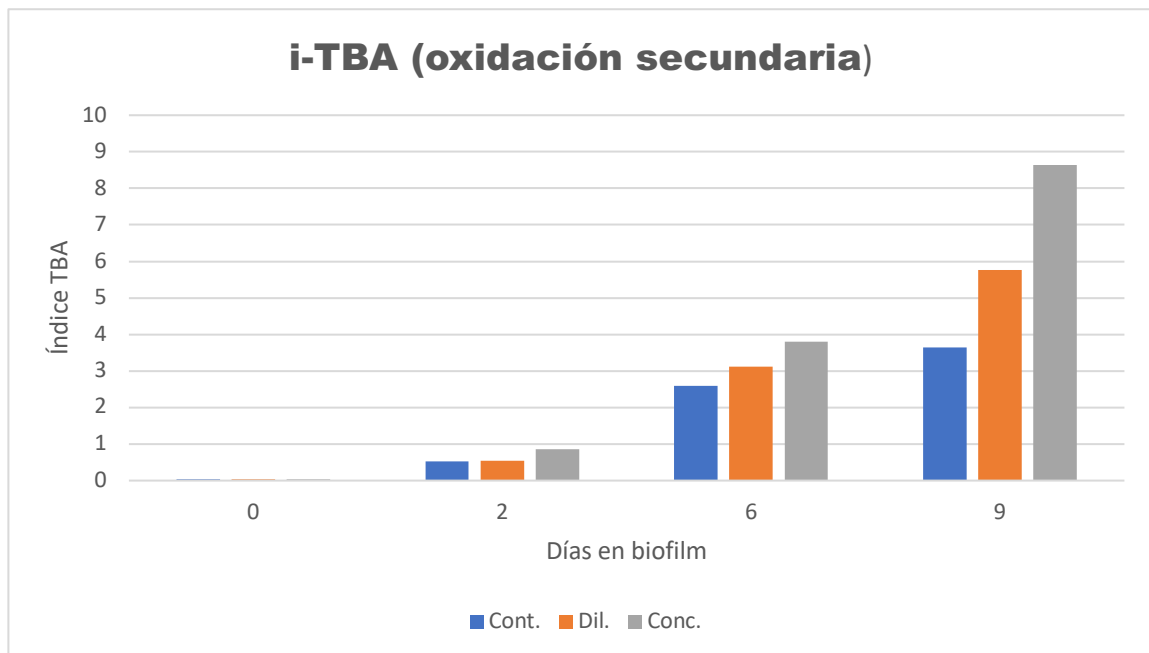


**Figura 11. Evolución del índice de peróxidos (oxidación primaria) en músculo de caballa refrigerada y conservada bajo distintas condiciones de envasado. (Fuente : Idem que Figura anterior)**

**A-5 Evolución del índice del ácido tiobarbitúrico (oxidación secundaria) en músculo de caballa refrigerada y conservada bajo distintas condiciones de envasado**

Muestra	Tiempo (días)			
	0	2	6	9
Control	0.03 (0.03)	0.52 (0.38)	2.59 (0.28)	3.65 (0.70)
Dil		0.55 (0.03)	3.11 (1.03)	5.76 (1.12)
Conc		0.86 (0.20)	3.81 (0.47)	8.64 (1.01)

*Tabla 6: Índice del ácido tiobarbitúrico*



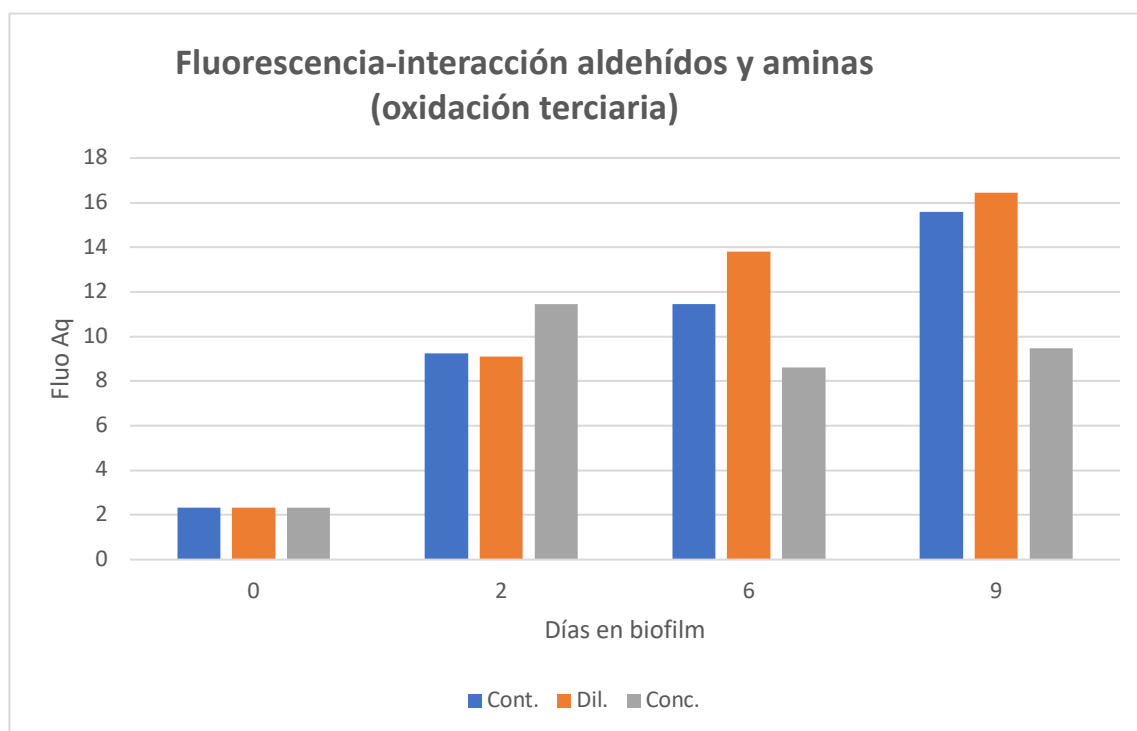
**Figura 12. Evolución del índice del ácido tiobarbitúrico (oxidación secundaria) en músculo de caballa refrigerada y conservada bajo distintas condiciones de envasado. (Fuente : Idem que Figura anterior)**

**A-6 Compuestos de interacción entre productos de oxidación lipídica y compuestos nucleófilos (oxidación terciaria), medidos por fluorescencia**

Fluo aq

Muestra	Tiempo (días)			
	0	2	6	9
Control		9.24 (3.50)	11.46 (5.27)	15.59 (5.94)
Dil	2.34 (0.90)	9.11 (4.92)	13.82 (5.72)	16.45 (3.27)
Conc		11.45 (4.96)	8.60 (4.01)	9.48 (1.03)

*Tabla 7: Fluorescencia fase acuosa*



**Figura 13. Compuestos de interacción entre productos de oxidación lipídica y compuestos nucleófilos (oxidación terciaria), medidos por fluorescencia. (Fuente : Idem que Figura anterior)**



## B. Análisis microbiológicos

### B-1 Aerobios mesófilos.

Mesof

Muestra	Tiempo (días)			
	0	2	6	9
Control	2.91 (0.54)	2.74 (0.24)	2.16 (0.28)	3.87 (0.51)
Dil		2.16 (0.28)	2.46 (0.15)	3.07 (0.40)
Conc		2.36 (0.32)	2.56 (0.54)	2.97 (0.35)

Tabla 8: UFC: Aerobios mesófilos

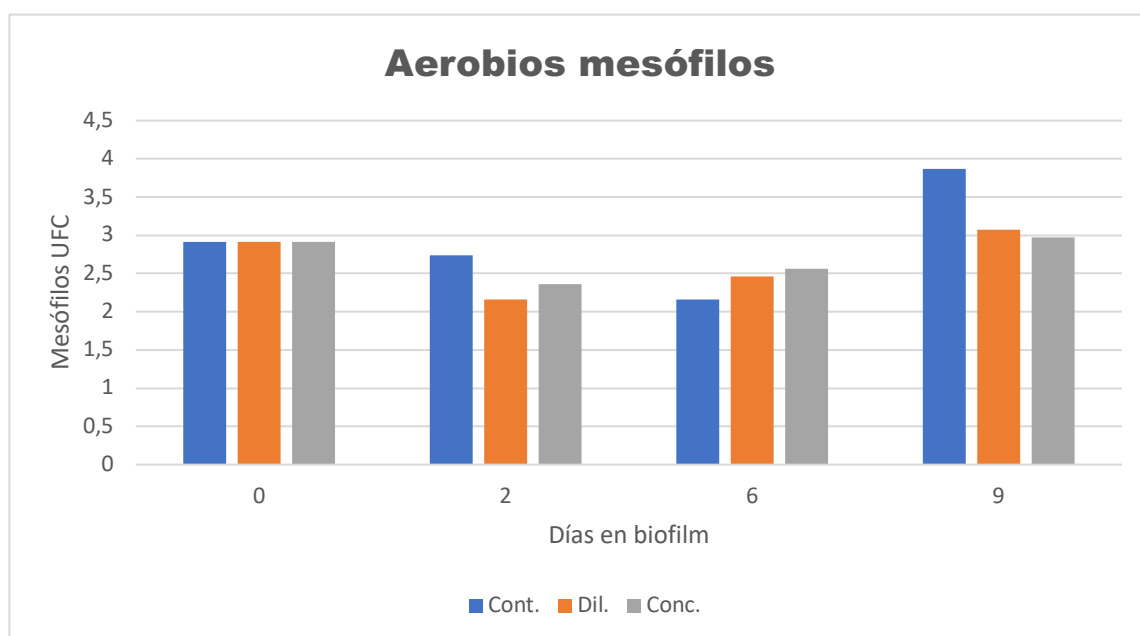


Figura14. Aerobios mesófilos. (Fuente Dpto. Microbiología. Fac. Veterinaria. UDC)

## B-2 Psicótrofos

Psicrotrs

Muestra	Tiempo (días)			
	0	2	6	9
Control	2.56 (0.24)	2.78 (0.16)	2.00 (0.00)	3.08 (0.19)
Dil		2.30 (0.30)	2.10 (0.17)	2.71 (0.13)
Conc		2.43 (0.23)	2.16 (0.28)	2.65 (0.15)

Tabla 9: UFC: Psicótrofos

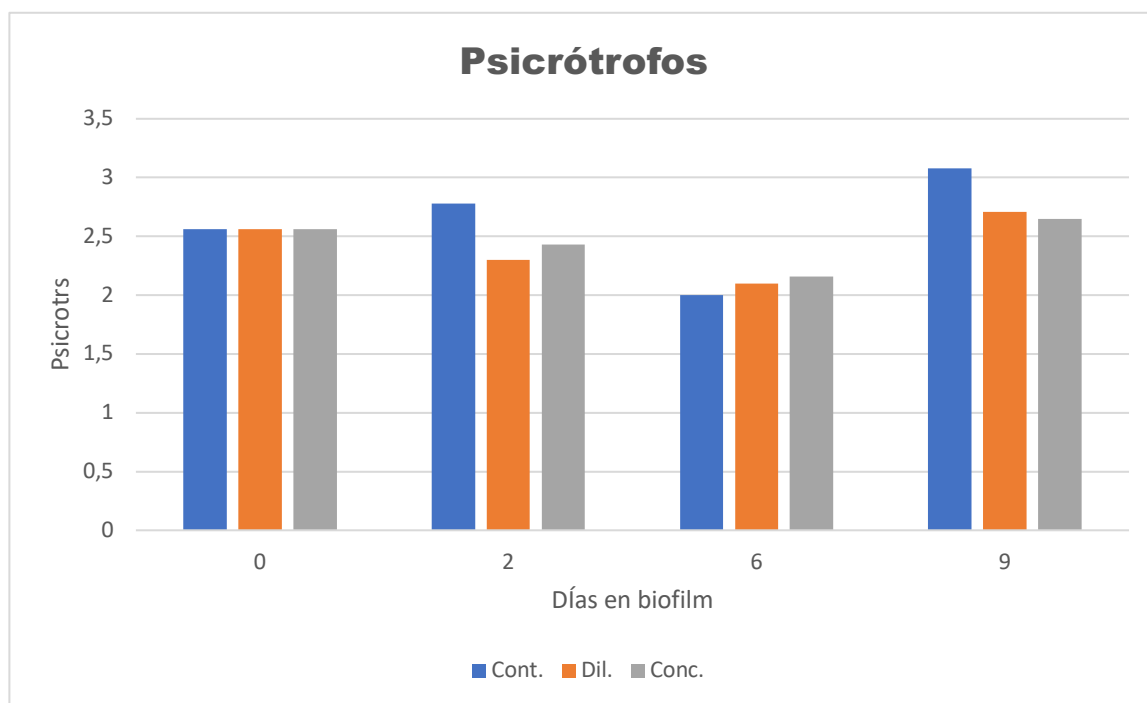


Figura 15 . Psicótrofos. (Fuente : Idem que Figura anterior)

### B-3 Proteolíticos

Proteols

Muestra	Tiempo (días)			
	0	2	6	9
Control	2.00 (0.00)	2.16 (0.28)	2.00 (0.00)	3.53 (0.68)
Dil		2.33 (0.58)	2.00 (0.00)	2.72 (0.10)
Conc		2.10 (0.17)	2.00 (0.00)	3.15 (0.83)

Tabla 10: UFC: Proteolíticos

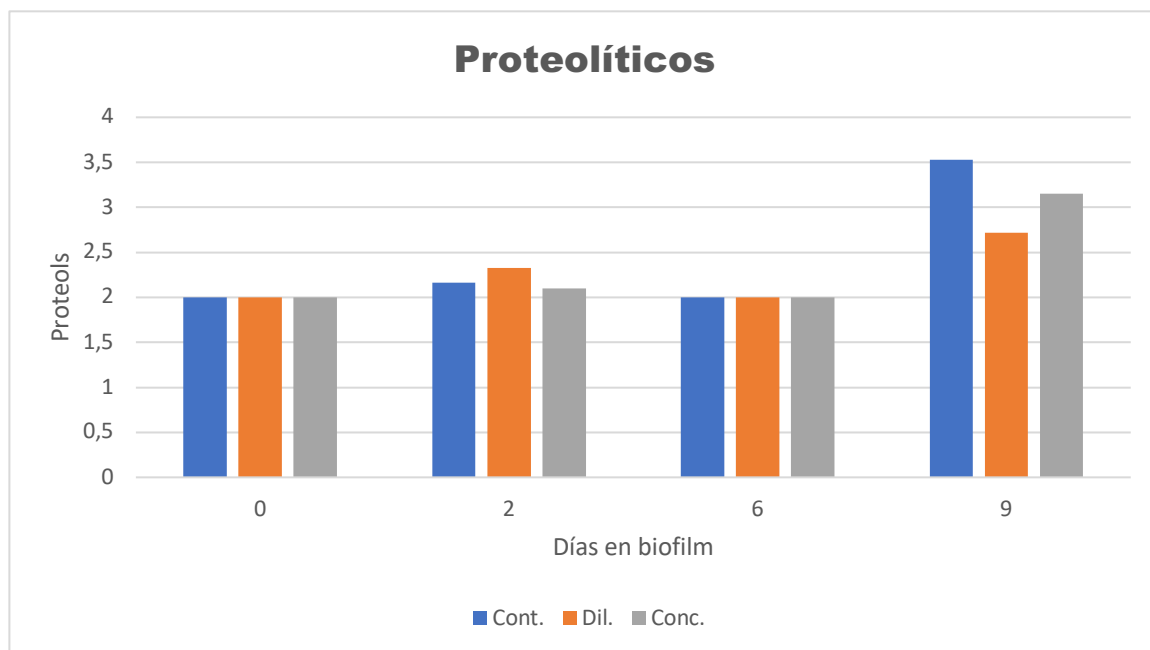


Figura16. UFC: Proteolíticos. (Fuente : Idem que Figura anterior)

## B-4 Lipolíticos

Lipolits

Muestra	Tiempo (días)			
	0	2	6	9
Control	2.00 (0.00)	2.00 (0.00)	2.00 (0.00)	3.13 (0.31)
Dil		2.00 (0.00)	2.00 (0.00)	2.72 (0.10)
Conc		2.00 (0.00)	2.00 (0.00)	2.74 (0.13)

Tabla 11: UFC: Lipolíticos

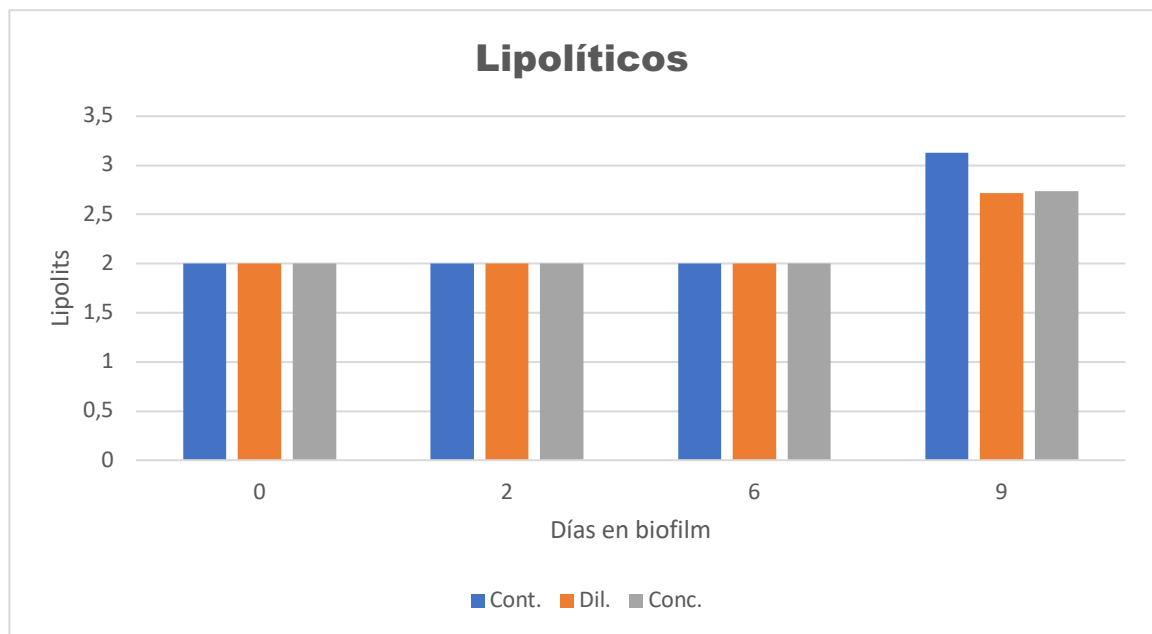


Figura 17. Lipolíticos. (Fuente: Idem que Figura anterior)

## B-5 Anaerobios

Anaerobs

Muestra	Tiempo (días)			
	0	2	6	9
Control	2.62 (0.28)	2.42 (0.39)	2.36 (0.39)	2.92 (0.35)
Dil		2.39 (0.35)	2.30 (0.30)	2.60 (0.21)
Conc		2.30 (0.00)	2.46 (0.56)	2.52 (0.24)

Tabla 12: UFC: Anaerobios

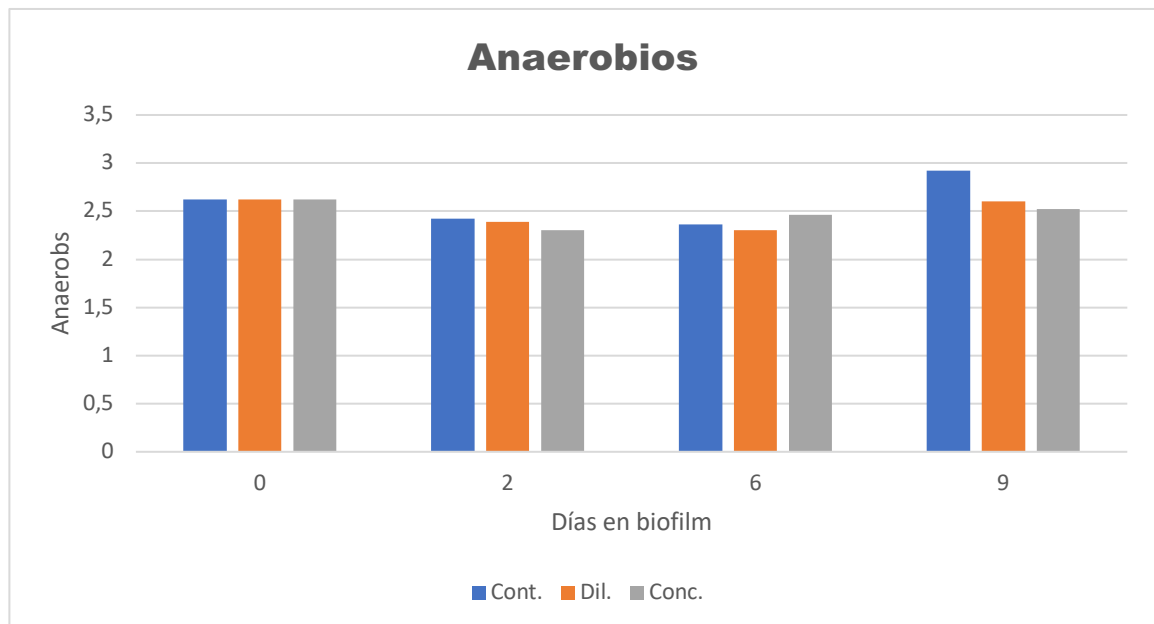


Figura 18: Anaerobios. (Fuente: Idem que Figura anterior)

## Discusión

Para analizar mejor los resultados hemos expresado los resultados, además de en tablas, en gráficos que nos permitan ver mejor la evolución de los distintos parámetros:

### Agua y Lípidos totales

El porcentaje de grasa y agua constituyen normalmente el 80% del filete, por lo que se acepta que entre los contenidos de estos constituyentes existe una proporcionalidad que puede ser utilizada para saber de forma aproximada el porcentaje de lípidos en función del contenido de agua (García Soto, B. 2015,<sup>27</sup>). Comprobamos, efectivamente, que sumando ambos valores, nos aproximamos, en todos los casos, al 80% del total (Figuras 8 y 9).

Los lípidos totales en origen, varían según la época del año, alimentación y las condiciones fisiológicas del pescado, pero, como vemos en los gráficos, manteniendo esa relación con el contenido de agua (Araneda, M. 2018,<sup>26</sup>),(García Soto, B. 2015,<sup>27</sup>)

Existen dos grupos de lípidos que destacan por su abundancia en los pescados óseos: Los fosfoglicéridos, o lípidos estructurales componentes de la membrana celular y los triglicéridos con la misión de ser almacén de energía en forma de depósitos de grasa. En el caso de la caballa, al ser pescado graso, se acumulan, además de en el hígado, como en los magros, en células grasas por todo el cuerpo, en especial en el tejido subcutáneo de los músculos del vientre, aletas y cola (García Soto, B. 2015,<sup>27</sup>).

Los valores de lípidos totales manifiestan una reducción notable en las muestras de mayor contenido en *F. spiralis* (Figura 9). La causa es la disminución de su contenido en agua. Las cantidades en las muestras tras los nueve días en biofilm mantienen las proporciones lipídicas encontradas en la bibliografía (Pereda et al. 2019,<sup>25</sup>).

Los componentes lipídicos son los que sufren una mayor variación estacional, con ácidos grasos, que, a diferencia de los mamíferos, son de cadena larga con alto grado de insaturación (Huss,<sup>28</sup>). Son el resultado de la hidrólisis lipídica (triglicéridos y fosfoglicéridos) causada por las lipasas y fosfolipasas endógenas y microbianas. Esta hidrólisis es síntoma claro de degradación en el almacenamiento (Aubourg, 1999<sup>10</sup>). Cuando se produce la muerte del organismo, dichas enzimas pasan a realizar su actividad de forma más fácil, pudiendo dividirse esta actividad en hidrolítica y oxidativa (García Soto et al,<sup>2</sup>). La actividad hidrolítica de las lipasas y fosfolipasas, originan ácidos grasos libres, fundamentalmente ácidos grasos poliinsaturados ( $\omega$ -3 y  $\omega$ -6), los denominados (PUFA's - Poly-Unsaturated Fatty Acids-), que son fácilmente oxidables, y, por tanto susceptibles de ser deteriorados, como luego veremos.

Además se originan otros productos de hidrólisis como diglicéridos, monoglicéridos, bases aminadas, etc. Estas moléculas son muy reactivas, pudiendo interactuar con otros constituyentes del músculo, como por ejemplo proteínas, facilitando su desnaturalización y produciendo incluso un descenso del valor nutricional (García Soto et al,<sup>2</sup>).

En nuestro caso, se aprecia un incremento importante de los AGL a partir del día sexto. En cualquier caso se aprecia la menor incidencia de la actividad lipolítica, en el pescado con mayor concentración de *F. spiralis* (Figura 10).

### Oxidación lipídica

El desarrollo de la oxidación lipídica se midió a través de tres parámetros: índice de peróxidos, ácido tiobarbitúrico, y fluorescencia de interacción aldehídos-aminas, correspondientes a la oxidación primaria, secundaria, y terciaria, respectivamente. Los tres índices reflejan un incremento progresivo como resultado del avance del tiempo de conservación en todas las muestras (Figuras 11, 12 y 13). Es notable el incremento de la oxidación primaria y secundaria a partir del día sexto (Fig. 11-12) en correspondencia con el aumento comentado de AGL (Fig. 7).

En los dos primeros casos, oxidación primaria y secundaria, los resultados no coinciden con lo esperado, dado que es, precisamente, en las láminas de mayor concentración de *F. spiralis* donde se refleja un mayor índice de oxidación (Fig. 11 y 12). Sin embargo esto contrasta con los resultados de la oxidación terciaria, en los que se manifiesta una clara disminución de la misma en los biofilms de *F. spiralis* concentrado (Figura 13). Según Badui, (Badui, 2006<sup>29</sup>), la prueba del índice de peróxidos sólo es representativa en las primeras etapas de la oxidación de grasas, sin que se manifieste el enranciamiento. Por ello podríamos considerar excluido este parámetro en una primera aproximación. Dado que el grado de oxidación terciaria debería ser mayor, consecuencia de la oxidación primaria y secundaria, y la bibliografía sostiene que es el elemento más eficaz para determinar la oxidación (García-Soto, B. et al. 2015)<sup>2</sup>, podemos interpretar que este resultado de fluorescencia acuosa son los resultados de oxidación más fiables, (oxidación terciaria), que reflejan la disminución en la oxidación de las muestras con *F. spiralis*.

Asimismo, los resultados obtenidos inducen a pensar que la presencia del alga en el biofilm ha favorecido la no descomposición de los productos de oxidación primaria y secundaria, con lo que sus contenidos han sido mayores y por tanto la presencia del alga ha favorecido una menor formación de compuestos de interacción (compuestos fluorescentes). Este resultado es muy interesante ya que se evitará parcialmente la alteración de compuestos con funciones

nucleófilas de tipo amínico o sulfhídrica, como la lisina y la metionina, que son importantes aminoácidos esenciales.

## Microbiología

Los recuentos de bacterias mesófilas son de escaso valor a la hora de predecir la vida útil de un alimento conservado en refrigeración, ya que muchos microorganismos mesófilos no crecen a temperaturas por debajo de los 5°C.

A pesar de eso, se incrementan con el paso del tiempo. Sin embargo, en las láminas con *F. spiralis* (en ambas concentraciones) se mantienen igual que el día cero. En el caso de láminas control se incrementan notablemente, a pesar de estar almacenadas a la misma temperatura. Queda de manifiesto la eficacia de la acción antimicrobiana del *F. spiralis*.

En los psicrótrofos, cuya temperatura de crecimiento es posible entre 0 y 5°C, como en nuestras muestras, se percibe igualmente la actividad antimicrobiana del *F. spiralis*. Las UFC en el día 9 sólo crecen con notoriedad en las muestras control sin *F. spiralis*. En las muestras con *F. spiralis*, y especialmente en las de más concentración, se mantienen casi constantes. En este caso sí que volvemos a valorar la eficacia del alga en la inhibición del crecimiento microbiano.

Las bacterias proteolíticas Gram negativas suelen provocar un metabolismo desequilibrado de las proteínas resultando sustancias potencialmente tóxicas (aminas, amoniaco, escatol, etc.). Hasta el día sexto permanecen en niveles controlados en nuestras condiciones de conservación. En el día noveno el crecimiento de UFC es ya mayor, pero siempre en menor cantidad en bacterias conservadas en *F. spiralis* (Figura 16).

Como en los casos anteriores, y de acuerdo con la bibliografía (Miranda, J, et al)<sup>1</sup> se observa la mejoran la conservación de aquellas muestras conservadas en *F. spiralis*, tanto de lipolíticos como de anaerobios.



## Conclusiones

Como conclusiones podemos destacar los siguiente:

1. En el caso de agua, lípidos totales y ácidos grasos libres los resultados manifiestan los mejores resultados en la conservación el biofilms con *F. spiralis*. Se mantiene mejor la humedad, y la concentración de lípidos totales y ácidos grasos libres es menor.
2. En relación a la oxidación lipídica la prueba más determinante citada por la bibliografía es la de fluorescencia acuosa, que en nuestro caso coincide con ser la que manifiesta menor crecimiento en los biofilms con *F. spiralis*.
3. En relación con la actividad microbiana, en todos los casos, los resultados de los análisis de la actividad antimicrobiana manifiestan mejores resultados con las láminas con *F. spiralis*.
4. Quizá podemos destacar la necesidad de mejorar la “calidad” de los biofilms, en relación con su consistencia y elasticidad para mejorar su futuro manejo en el transporte y almacenamiento del pescado.
5. En conclusión, podemos afirmar, como decíamos en la introducción, que las investigaciones realizadas en estudios anteriores, pueden confirmarse con nuestro trabajo. Sería importante seguir estas líneas de investigación, para que, mejorando las técnicas progresivamente, se vayan confirmando y mejorando los resultados.

## Bibliografía

- 1 M. Miranda, J, García-Soto, B., Quitral, V., Trigo, M., López, M., Barros Velázquez, J. y Santiago P. Aubourg. “Aplicación de hielo incluyendo conservantes naturales para la mejora de la calidad de especies marinas refrigeradas”. *Inv.: Cult. Cienc. Y Tecn.* [internet]. 2015. [consultado el 10-9-19]; 7 (14): 18-23. Disponible en: <https://docplayer.es/51553887-Aplicacion-de-hielo-incluyendo-conservantes-naturales-para-la-mejora-de-la-calidad-de-especies.html>
- 2 García-Soto, B., Sanjuás, M., BarrosVelázquez, J., Fuertes-Gamundi, R. & Aubourg, S. “Preservative effect of an organic acidifying system on chilled fish lipids”. *European Journal of Lipid Science and Technology*. [internet]. [Tesis doctoral]. Universidad de Santiago de Compostela. 2015) 2011, 113, 487–496”. [consultado el 10-9-19]. (Citado en García Soto, B. 2015. “Evaluación de metodologías avanzadas de conservación de especies marinas capturadas por la flota gallega de caladeros comunitarios). Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=121606>
- 3 Bastioli C. “Global Status of the Production of Biobased Packaging Materials.” *Starch-Starke*. [internet]. . August, 2001. [consultado el 10-9-19]. 53 (8): 351-5. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/229918898\\_Global\\_Status\\_of\\_the\\_Production\\_of\\_Biobased\\_Packaging\\_Materials](https://www.researchgate.net/publication/229918898_Global_Status_of_the_Production_of_Biobased_Packaging_Materials)
- 4 Trigo, M., López, M., Gallardo, J.M., Aubourg, S. (2013). “Quality enhancement of chilled fish by employing an icing medium including edible marine algae (*Ascophyllum nodosum* and *Gracilaria gracilis*) extracts”. Póster presented in 43rd WEFTA Conference, 9-11 October 2013, Tromso, Norway.
- 5 *Ibidem*.
- 6 Cabrini L., Landi L., Stefanelli C., Barzanti V., Sechi A.: “Extraction of lipid and lipophilic antioxidants from fish tissues: A comparison among different methods.” *Comp. Bioch.y and Physiol. B. Bioch. and Mol. Biol.* [internet]. 1992. [consultado el 10-9-19] 101: 383–386. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1582177>
- 7 Bastioli C. “Global Status of the Production of Biobased Packaging Materials.” *Starch-Starke*. [internet]. *Bios. Nutr. Biom.* 53 (8): 351-5. August, 2001. [consultado el 15-9-19]. Disponible en: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1521-379X\(200108\)53:8%3C351::AID-STAR351%3E3.0.CO;2-R](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1521-379X(200108)53:8%3C351::AID-STAR351%3E3.0.CO;2-R)

- 8 Balakrishnan B1, Mohanty M, Umashankar PR, Jayakrishnan A. "Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin". PubMed 2005 Nov. [Internet]. [consultado el 24/12/19]. 26(32):6335-42. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15919113>
- 9 Ibidem
- 10 Aubourg, S. "Lipid damage detection during the frozen storage of an underutilized fish species." Food Res. Int. [internet]. 1999. [consultado el 10-9-19]. Vol. 32, 497-502. Disponible en: [https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/lipid-damage-detection-during-the-frozen-storage-of-an-underutilized-Z5o0CFJPLP?impressionId=5d33350aac0e0&i\\_medium=docview&i\\_campaign=recommendations&i\\_source=recommendations](https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/lipid-damage-detection-during-the-frozen-storage-of-an-underutilized-Z5o0CFJPLP?impressionId=5d33350aac0e0&i_medium=docview&i_campaign=recommendations&i_source=recommendations)
- 11 E. G. Bligh, W. J. Dyer. "A rapid method of total lipid extraction and purification". Can. Jour. of Bioch. and Physiol. [internet]. 1959. [consultado el 24/12/19]. 37:911-917. Disponible en: <https://doi.org/10.1139/y59-099>
- 12 Miguel Ángel Landines Parra & Jorge Andrés Zambrano Navarrete. [internet]. "La oxidación lipídica en la cadena de producción acuícola". RIAA 0 [internet]. 2009: [consultado el 24-12-19]. 13-22. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/277275405\\_La\\_oxidacion\\_lipidica\\_en\\_la\\_cadena\\_de\\_produccion\\_acuicola](https://www.researchgate.net/publication/277275405_La_oxidacion_lipidica_en_la_cadena_de_produccion_acuicola)
- 13 Lowry, R.R., Tinsley, I.J., "Rapid colorimetric determination of free fatty Acids." Journ. of the Amer. Oil Chem. Soc. [internet]. 1976. [consultado el 24-12-19]. 53(7):470-2. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02636814>
- 14 Ibidem
- 15 David Guillermo Piedrahita Márquez, et al. "Control de la oxidación lipídica en filetes de pescado utilizando recubrimientos comestibles a base de aceite de naranja". Rep. Cend. [internet] . 2015. [consultado el 24-12-19]. Disponible en: <http://repositorio.colciencias.gov.co/handle/11146/21717>
- 16 Chapman R, McKay J. "The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method". J. Amer. Oil Chem. Soc. [internet]. 1949. [consultado el 24-12-19]. 26, 360-363. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02651444>

- 17 Vyncke, W. "Direct Determination of the Thiobarbituric Acid Value in Trichloroacetic Acid Extracts of Fish as a Measure of Oxidative Rancidity". *Fette Seifen Anstrichmitteln*, [internet]. 1970. [consultado el 25-12-19]. 72: 1084–1087. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lipi.19700721218>
- 18 Losada, V., Rodriguez, O., Miranda, J.M., Barros-Velazquez, J. & Aubourg, S.P. "Development of different damage pathways in Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored under different chilling systems". *Journal of the Science of Food and Agriculture*. [internet]. 2006. [consultado el 30-11-19.] 86, 1552–1558. Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/51012>
- 19 Aidos, I, A Vander Padt, RM Boom & JB Luten. 2003a. "Quality of Crude Fish Oil Extracted from Herring byproducts of Varying States of freshness". *Journal of Food Science*. [internet]. 2006. [consultado el 30-11-19]. 68: 458-465. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05694.x>
- 20 Lowry, R.R., Tinsley, I.J., "Rapid colorimetric determination of free fatty Acids." *Journal of the American Oil Chemists' Society*. [internet]. 1976. [consultado el 30-11-19]. 53(7):470-2. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02636814>
- 21 Aubourg, S. "Lipid damage detection during the frozen storage of an underutilized fish species." *Food Res. Int.* [internet]. 1999. [consultado el 10-9-19]. Vol. 32, 497-502. Disponible en: <https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/lipid-damage-detection-during-the-frozen-storage-of-an-underutilized-Z5o0CFJPLP?impressionId=5d33350aac0e0Nielsen, H.; P.; F. and Hurrell, R. Reactions of proteins with oxidizing lipids. 1. Analytical measurements of lipid oxidation and of amino acid losses in a whey protein methyl linoleate model system. Brit. J. Nutr., 1985, 53, 75-86.>
- 22 *Ibidem*.
- 23 AA.VV. *Food authenticity and traceability*. [internet]. Ed. Michèle Lees. Boca Ratón. USA. 2003. [consultado el 25/12/19]. Disponible en: Woodheat.Publishing Limited.
- 24 Abood S. Quality of improvement initiative in nursing homes. *Am J Nurs*. [Internet]. 2002 [Consultado 22 Nov 2012]; 102(6). Disponible en: <http://www.nursingworld.org>.
- 25 Ricardo Pereda, Reyna Modesta, Salazar García, Esther Vanessa. Comparación del valor nutritivo entre el pescado fresco y enlatado de *Scomber scombrus* "Caballa" que se

comercializa en el Distrito de Cajamarca. Repositorio Upagu. [internet]. 2019. [consultado el 3-1-20]. Disponible en: <http://repositorio.upagu.edu.pe/>

- 26 Araneda, m. Pescados y mariscos. composición y propiedades. Edualimentaria.com.[internet]. 2018. [consultado el 3-1-20]. Disponible en: <http://www.edualimentaria.com/pescados-y-mariscos-composicion-y-propiedades>
- 27 García-Soto, B., Evolución de metodologías avanzadas de conservación de especies marinas capturadas por la flota gallega en caladeros comunitarios. Tesis doctoral, Dpto. de Química Analítica. USC. [internet]. 2015. [consultado el 3-1-2020]. Disponible en: [https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&ved=2ahUKEwjv1YvAsefmAhWkyYUKHbgpAoQQFjAGegQIARAC&url=http%3A%2F%2Fdigital.csic.es%2Fbitstream%2F10261%2F121796%2F1%2FTESIS\\_Bibiana\\_GS.pdf&usg=AOvVaw3biCG4YbedmfnfP9f-xYEKQ](https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&ved=2ahUKEwjv1YvAsefmAhWkyYUKHbgpAoQQFjAGegQIARAC&url=http%3A%2F%2Fdigital.csic.es%2Fbitstream%2F10261%2F121796%2F1%2FTESIS_Bibiana_GS.pdf&usg=AOvVaw3biCG4YbedmfnfP9f-xYEKQ)
- 28 Hans Henrik Huss. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. FAO-DANIDA, nº 29. [internet]. Roma 1988. [consultado el 4-1-20]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/v7180s/v7180s00.htm>
- 29 Badui, S. Química de los alimentos. Cuarta edición. Pearson Educación, México. [internet]. 2006. [Consultado el 5-1-20]. Disponible en: [https://www.google.es/search?source=hp&ei=48YRXofKMZzkgwLs7-IDQ&q=+Badui%2C+S.%2C+%282006%29+Qu%C3%ADmica+de+los+alimentos%2C+Pearson+education%2C&oq=+Badui%2C+S.%2C+%282006%29+Qu%C3%ADmica+de+los+alimentos%2C+Pearson+education%2C&gs\\_l=psy-ab.12...2514.2514..3659...0.0..0.102.102.0j1.....0.....2j1..gws-wiz.OCE1rTKsQVg&ved=0ahUKEwjHx8alrOzmAhUc8uAKHcvcvZD9EQ4dUDCAs](https://www.google.es/search?source=hp&ei=48YRXofKMZzkgwLs7-IDQ&q=+Badui%2C+S.%2C+%282006%29+Qu%C3%ADmica+de+los+alimentos%2C+Pearson+education%2C&oq=+Badui%2C+S.%2C+%282006%29+Qu%C3%ADmica+de+los+alimentos%2C+Pearson+education%2C&gs_l=psy-ab.12...2514.2514..3659...0.0..0.102.102.0j1.....0.....2j1..gws-wiz.OCE1rTKsQVg&ved=0ahUKEwjHx8alrOzmAhUc8uAKHcvcvZD9EQ4dUDCAs)