UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA FRESCURA Y ESTUDIO DE LA FLORA ALTERATIVA DEL CALAMAR (*Illex argentinus*)

“por”

FRANCA MENDEZ Alejandro

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección, Control y tecnología de los Alimentos de Origen Animal

MODALIDAD: Estudio de caso

MONTEVIDEO
URUGUAY
2014

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:

Presidente de mesa: _____

Cristina Friss de Kereki

Segundo Miembro (Tutor): _____

José Pedro Dragonetti

Tercer Miembro _____

Ana María Maquieira

Cuarto miembro (co-tutor): _____

Giorella Pinnacchio

Fecha:

Autor: _____

Br: Alejandro Franca Méndez

Agradecimientos:

A todos los docentes y no docentes de Facultad, en especial al Instituto de ,QYHVWLJDFLRQHV3HVTXHUDV3URIU9tFWRU%HUWXOORSRUFRPSDUWLUXV conocimientos y facilitarme las instalaciones para realizar este trabajo.

A Giorella y José Pedro por tiempo y paciencia dedicada durante todo el proceso de realización y redacción del trabajo.

A Ana María Maquieira, como a todo el departamento de Microbiología del LATU por permitirme realizar la preparación de medios, como por la colaboración recibida por su parte

A mis padres por la toda la ayuda recibida durante la carrera. A mi prima Daniela por bancarme gran parte de esos años.

A mis amigos de siempre y todos los que se han sumado durante esos años

A todas las personas que de una u otra forma, colaboraron y participaron en la elaboración de esta tesis, muchas gracias.

Tabla de contenido

Página

3ÈL$52%&,Ï«

(',&$25,&

$&,0,(1726« « 3

LISTA DE CUADRO6«« 5

5(680(1« 6

Summary «

INTRODUCCIÏL«

HVFULSFLyQGHODHVSHFLH« 9

Distribución de Illex argentinus « 10

Modalidad de Captura« «

Desembarques y exSRUWDFLyQ«

EVALUACION SENSORIAL DE LA FRESCURA«

CARCTERÍSTICAS DEL D(7(5,252«

Parámetros objetivos..... 15

$L6,60,&52%,2/2*&2« «

Pseudomonas « « « « « « « « « « « « « « « « « « «

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Descripción

Página

Cuadro 1 Composición química del Illex argentinus expresada en porcentaje 8

Cuadro 2 Sistema de clasificación y puntuación para la evaluación organoléptica del calamar (Illex argeninus) « «

Cuadro 3 Sistema representativo para la clasificación y puntuación organoléptica«

Cuadro 4 Evaluación sensorial de Illex argentinus « « « « « « « « « « «

Cuadro 5 Resultados obtenidos en los recuentos para Pseudomona spp. Expresado en ufc/g«

Cuadro 6 Resultados obtenidos en BNVT . Expresado en mg/100g de músculo« «

Figura 1 Esquema del calamar «

Figura 2 Área de distribución GHOFDODPDUGHFDODPDU«

Figura 3 3ODTXHDGRGHPHGLRVGHFXOWLYR« 25

Figura 4 Resultados de la evaluación sensorial«

Figura 5. Registro fotográfico de los aributos evaluados« 28

Figura 6 Fluorescencia en Pseudomona spp « « « « « « « « « «..«

Gráfico 1 Crecimiento obtenido de Pseudomona spp durante la refrigeracióQ«

Gráfico 2 BNVT« «

Gráfico 3 Evolución de Pseudomona spp. Y BNVT« «

RESUMEN

El calamar es un molusco cefalópodo clasificado dentro de los decápodos, son invertebrados protóstomos celomados, triblásticos con simetría bilateral no segmentada, de cuerpo blando, desnudo o protegido por una concha. Dentro de estos; Illex argentinus es la única especie capturada y exportada por nuestro país según datos de la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos.

Actualmente para la evaluación de frescura de Illex argentinus se utilizan los mismos parámetros que para pescado (olor, color, elasticidad) con la salvedad que se trata de dos grupos zoológicos distintos: vertebrados e invertebrados; por lo que se deben considerar que ambos grupos se comportan de distinta manera. En este trabajo se evalúa la variación en el tiempo de los parámetros sensoriales y su comportamiento en condiciones de refrigeración. Paralelamente se realizó la determinación de bases nitrogenadas volátiles totales (BNVT) por el método de micro difusión de Conway; y el recuento en placa de Pseudomona spp; y Photobacterium phosphoreum; con siembra en superficie manejando distintas diluciones según el comportamiento de los microorganismos, como medios específicos para cada uno.

Para el caso de la evaluación sensorial se observó que si bien los cambios que se producen no son notorios, salvo el color de la piel y del músculo; cuando lo son es porque el producto ya está en franca descomposición; igualmente sigue siendo esta la mejor medida para la evaluación de la frescura, ya que tanto la determinación de bases nitrogenadas volátiles totales, como los análisis microbiológicos no registran cambios significativos hasta más avanzada la descomposición.

Summary

The squid is a cephalopod mollusk classified within the decapod, invertebrates are protostomes coelomates, triploblasty with bilateral symmetry unsegmented, soft-bodied, naked or protected by a shell. Among these; Ilex argentinus is the only captured and exported species by our country according to the Dirección Nacional de Recursos Acuáticos

Currently when it comes to evaluating the freshness of the Illex argentinus, parameters used for evaluating the quality are the same as for fish, (odor, color, elasticity) except they are two different zoological groups: vertebrates and invertebrates; so it should be considered that both groups behave differently. This paper evaluates the variation in time of sensory parameters and their behavior under refrigeration. The determination of total volatile nitrogenous bases (TVBN) by Conway micro diffusion method was performed; and plate count of Pseudomonas spp; and Photobacterium phosphoreum; dealing with different dilutions seeding according to the behavior of microorganisms, as specific means for each one.

In the case of sensory evaluation we found that changes are not noticeable, except the color of the skin and muscle; when they are it is because the product already shows spoilag signs; this also remains the best measure for evaluation of freshness, as both the determination of total volatile nitrogen bases such as microbiological analysis reported no significant changes until later decomposition.

Introducción:

En los últimos años se ha recomendado ampliamente la inclusión de alimentos de origen marino en la dieta, lo cual se debe básicamente a que representan uno de los grupos de alimentos más saludables y completos que existen.

Los recursos pesqueros de mayor importancia a nivel mundial y naional son los peces, inmediatamente detrás de éstos se encuentran los moluscos cefalópodos y dentro de éstos los decápodos (Ocaño H

Cuadro 1. Composición química del *Illex argentinus* expresada en porcentaje de porción comestible

Nutriente	%
Proteínas bruta	18.2
Materia grasa	2.03
Cenizas	1.71
Humedad	78.80

Adaptado de: Bertullo (1976)

Distribución del *Illex argentinus en el Uruguay*

Es una especie nerítico-oceánica que ha sido encontrada desde los 54° S Hasta los 23°S, y su presencia es frecuente entre los 52°S y los 35°S (Figura 2) (Ivanovic y Brunetti, 1994).

Figura 2. Área de distribución

Fuente: Brunetti *et al*., 1999

Es un molusco pelágico-oceánico migratorio que habita en toda la columna de agua, con un rango de temperatura que oscila entre los 8ºC y los 11ºC. Tienen un ciclo de vida breve, de poco más de un año, y una alta tasa de crecimiento. Presenta migraciones tanto latitudinales como batimétricas, en donde las concentraciones durante las diferentes épocas del año están regidas por la alimentación, la maduración sexual y el desove (http://www.dinara.gub.uy/index.php?option=com_multicategories&view=article&id=41:calamar&catid=20&Itemid=202)

Illex argentinus, es un predador oportunista, su dieta se basa en organismos pelágicos de distinto tamaño (Ivanovic y Brunetti, 1994). Posee un régimen alimentario eminentemente carnívoro, actúa como consumidor secundario, terciario y cuaternario (Leta, 1981).

Se ha observado que dentro de la alimentación se encuentran peces Diaphus dumerilii, Maurolicus muelleri y Merluccius hubbsi, entre los más frecuentes, aunque también forman parte de la dieta cefalópodos como I. argentinus, Loligo sanpaulensis, Spirula spirula, Semirossia tenera y Eledone gaucha, como también crustáceos; Oncaea mediay Euphausia sp. Se observa canibalismo en todas las etapas, lo que puede marcar un comportamiento ante la falta de alimento (Aguiar Santos y Haimovici, 1997).

Modalidad de captura

En Uruguay, los volúmenes iniciales de su captura se obtenían como fauna acompañante de merluza pero desde 1997 se ha comenzado a explotar mediante el uso de poteras, siendo este el arte de pesca específica para su captura, y donde se obtienen los mejores rendimientos y calidad del producto. También se captura mediante redes de arrastre en general como acompañante, pudiendo ser estas semi pelágicas de gran apertura vertical y las de arrastre de fondo (www.dinara.gub.uy).

La pesca con poteras utiliza las características biológicas del calamar para su máximo desempeño, la potera o robador constituye una combinación de cebo y dispositivo de captura, al moverse en el agua simula una presa y es atacado por el calamar, quedando este atrapado por anzuelos. Muchas veces se utiliza este método con atracción luminosa (Rathjen, 1987).

Desembarques y exportación

Existe una época de veda para los buques arrastreros de fondo que se extiende desde el 1 de enero al 31 de agosto de cada año y solo puede desembarcarse hasta un 15% de calamar con respecto al total desembarcado en cada viaje (Resolución 1/2000 Comisión Mixta del Frente Marítimo www.dinara.gub.uy).

En el año 2012 se desembarcaron un total de 1431 toneladas, cayendo un 3% respecto al año anterior. En cuanto a las exportaciones, estas fueron de 1233 toneladas a un precio promedio de 2 mil USD/ton (DINARA, 2013).

Evaluación sensorial de la frescura

La valoración sensorial es una función que la persona realiza desde la infancia y que lleva, consciente o inconscientemente, a aceptar o rechazar los alimentos de acuerdo con las sensaciones experimentadas al observarlos o ingerirlos. Las sensaciones que motivan ese rechazo o aceptación varían con el tiempo y el entorno, de aquí la dificultad de obtener datos objetivos de una valoración tan subjetiva. Se puede definir en un sentido estricto al análisis sensorial como el examen de los caracteres organolépticos de un producto mediante los sentidos, obteniendo datos cuantificables y objetivables (J. Sancho et al; 1998).

La evaluación sensorial es la más utilizada para productos de la pesca debido a su eficiencia, confiabilidad y que permite trabajar con altos volúmenes. Bertullo en 1976 señala a la evaluación sensorial como la herramienta más usada para la inspección y aceptación o rechazo de productos pesqueros para consumo humano

Huss en 1998 define a la evaluación sensorial como una disciplina científica empleada para evocar, medir, analizar e interpretar reacciones características del alimento, percibidas a través de los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y audición. Los métodos utilizados en la evaluación de la calidad los productos de la pesca son los microbiológicos, físicos, químicos y sensoriales (Huss, 1998).

Hay que tener en cuenta que para obtener un análisis sensorial fiable, es necesario objetivar y normalizar los términos, para que las conclusiones sean cuantificables y reproducibles con la máxima precisión posible (Abaroa et al; 2008).

El proceso sensorial se inicia por la presencia de un estímulo sobre los receptores sensoriales, estos crean un impulso nervioso que se transmite al cerebro quien lo interpreta como una sensación. La interpretación de la sensación, es decir la toma de conciencia sensorial, se denomina percepción. El sabor se percibe principalmente por la lengua, aunque también por la cavidad bucal. Las papilas gustativas de la lengua registran los cuatro sabores básicos; dulce, ácido, salado, y amargo. La visión es un fenómeno complejo basado en una señal luminosa que incide sobre la retina, provocando impulsos eléctricos que son conducidos por el nervio óptico hasta el cerebro, en el que la sensación visual se percibe y es interpretada. En cuanto al olfato, este es el más complejo para su estudio. Se denomina sensación olfativa al conjunto de acciones psíquicas que ocurren en el cerebro al llegar las señales nerviosas, provenientes de células receptoras olfativas y que provocan la sensación de un olor característico, basados en parte en la experiencia del individuo (Sancho J. et al; 1998).

En la mayoría de los casos, la detección de las alteraciones y defectos se realiza de forma eficaz y rápida por el sentido de la vista. El sentido del tacto se utiliza para evaluar la elasticidad y textura. La degustación es el método más reproducible ya que se tiene en cuenta todas las características del producto y ello refleja, de forma satisfactoria, los cambios ocurridos en el sabor, olor y flavor. Con alguna práctica la gama de olores existentes entre el producto muy fresco y el producto alterado pueden diferenciarse fácil y rápidamente,

permitiendo estimar el grado de frescura de forma precisa. Mediante el olfato se pueden identificar los olores que permiten evaluar el grado de putrefacción, así como olores extraños provenientes de la contaminación por mala manipulación o almacenamiento inadecuado (Connell, 1978).

La tendencia actual es utilizar el método de índice de calidad conocido como Quality Index Method (QIM) (Dragonetti, 2008).

El QIM es un método objetivo y seguro que se basa en características organolépticas bien definidas que reflejan los cambios que ocurren durante el deterioro de los productos de la pesca. Es necesario definir los parámetros organolépticos para cada especie en particular (Dragonetti, 2008)

El uso de este método, desarrollado por el Tasmanian Food Research Unit , el cual actualmente la tendencia es adoptarlo como método de elección para la Comunidad Europea (CE). El objetivo de la CE es que el QIM sea su método de referencia para la evaluación de la frescura y calidad de los productos de la pesca en toda la cadena productiva (Dragonetti, 2008).

En este método el inspector entrenado cuenta con una escala de 0 a 3 para cada uno de los atributos elegidos, cuánto más bajo es el número (resultado) obtenido más fresco se encuentra el producto. Esto le permite realizar un rápido y certero dictamen de frescura. Es posible desarrollar programas de computación que comparan los resultados obtenidos con curvas de calibración preestablecidas, esto permite trabajar en forma más eficiente frente a grandes volúmenes (Dragonetti, 2008).

Características del deterioro en calamar

Las características de los productos frescos y alterados han sido extensamente estudiadas para pescado, pero no así en el caso de los moluscos, para los que se cuenta con escasos estudios sobre los mecanismos de la alteración. Los que actualmente se utilizan fueron desarrollados para pescado y por extensión se utilizan en estos, lo que puede inducir a errores involuntarios ya que se trata de dos grupos zoológicos distintos (vertebrados e invertebrados). El tema mas estudiado en moluscos son los cambios organolépticos, especialmente las variaciones de color, siendo este muy importante debido a la presencia de cromatóforos, los que se alteran rápidamente después de la muerte, por autolisis, por daño mecánico provocado por los cristales de hielo y otros factores; por otra parte, los estudios microbiológicos sobre la flora natural o propia del calamar, la que se presenta durante la alteración no son abundantes, como tampoco la literatura sobre especies de interés comercial para Uruguay (Py, 2011).

Una vez que se produce su muerte, los moluscos se alteran rápidamente (Agenjo, 1980). En estudios sobre los cambios de color registrados en Todadores pacificus, se relacionaron a la expansión de melanóforos localizados en la epidermis (Yoshioka et al, 2003). En el calamar recién muerto se observa translucidez del músculo, y puntos negros diseminados en la superficie de la piel. Transcurridas 24 hs desde su captura ; esa coloración se

expande, debido a la contracción de los músculos que rodean los cromatóforos (Dragonetti, 2008). Se atribuye el enturbiamiento del músculo al solapamiento de filamentos de actina y miosina durante la contracción muscular, enlenteciéndose ese proceso durante el Rigor Mortis (Yoshioka et al., 2003).

La Octopina es el producto final del metabolismo anaeróbico de los cefalópodos y a diferencia del lactato no es ácido. Por lo tanto cualquier cambio en el potencial de hidrogeniones (pH) post mortem en cefalópodos no está relacionado con la producción de ácido láctico a partir del glucógeno como sucede en los peces (Dragonetti, 2008).

En un trabajo pudo observarse que el pH fue tornándose más alcalino a medida que transcurrían los días en refrigeración, manifestándose leves cambios a comienzos del día 11 (Marin y Vidal, 2013).

Para la evaluación de Illex argentinus retiramos la piel, y evaluamos el color del músculo, que en los ejemplares muy frescos es traslúcido (Yoshioka et al., 2003).Durante el almacenamiento su manto se torna a tonalidades blanco marfilino. A medida que avanza la descomposición, el color se va tornando más rojizo llegando a un color rojo vinoso en los ejemplares podridos. La evaluación de la textura y elasticidad muscular no es un dato relevante ya que por la disposición de las fibras musculares y el colágeno, el músculo mantiene cierta firmeza y elasticidad aunque el ejemplar se encuentre podrido. El olor se evalúa en el interior del manto, presentando un aroma agradable, muy característico cuando se encuentra fresco; sin embargo cuando está podrido es desagradable pero no se encuentra el olor amoniacal típico del pescado de mar podrido. En los cefalópodos el olor es mucho más aromático y menos ofensivo a los sentidos (Dragonetti, 2008). Uno de los compuestos responsables del olor del calamar alterado es la agmatina (Yamanaka et al., 1989).

Se debe prestar especial atención al grado de repleción del estómago. Cuanto mayor sea éste, mayor será la actividad enzimática digestiva, la cual sumada a la acción de las enzimas tisulares favorece los fenómenos autoliticos. Dependiendo del momento del ciclo reproductivo, podemos encontrar en las hembras las glándulas nidamentarias. Éstas son de estructura gelatinosa de color blanco o blanco amarillento, responsables de elaborar el material con que la hembra protege su puesta forPDQGR XQ ¨QLGR´6X SUHVHQFLD H[LVWH durante desde el punto de vista tecnológico porque dificulta la limpieza del tubo, que del punto de vista del deterioro propiamente dicho (Dragonetti, 2008).

Para la realización de la evaluación sensorial podemos considerar el siguiente cuadro:

Cuadro 2. Sistema de clasificación y puntuación para la evaluación organoléptica del calamar (*Illex argentinus*)

características	0	1	2	3	Observaciones
Piel	**Brillante, húmeda, lisa, elástica, integra fácil de desprender, mucus transparente**	**Integra, Húmeda y lisa, mucus viscoso y traslucido.**	**Algo seca, puede presentar desgarros. Mucus turbio, espeso y escaso**	**Seca con desgarros sin mucus, difícil desprendimiento**	
Musculo	**Traslucido, consistente y elástico**	**Blanco ,Blanco Marfilino, firme y elástico**	**Duro , poco flexible, con manchas o ligeramente rosado**	**Rojo ,rojo violáceo, ligera disminución de la textura el color es por difusión de la pigmentación**	
Ojo	**Convexo, Brillante, Traslucido, vivos, sobresalen de sus orbitas**	**Ligeramente convexos aplanado, Traslucido, húmedos, prominentes, redondos**	**Plano ,opacos, algo secos, no sobresalen de sus orbitas o ligeramente hundidos**	**Cóncavo, opacos, secos**	
Olor	**Propio, *Sui generis* ,agradable**	**Aromático, ligeramente dulce**	**Aromático a levaduras**	**Pútrido**	

Fuente: Py, 2012

Parámetros objetivos

La determinación de Bases nitrogenadas volátiles totales (BNVT) es el parámetro químico más utilizado para la evaluación de la frescura en pescado. Las BNVT en los estadios iniciales del deterioro en los peces están fundamentalmente integradas por bases nitrogenadas no proteicas. La valoración de estos compuestos se utilizan como índice de frescura, siendo el óxido de trimetilamina (otma) el más destacado (Huidobro A y Tejada M, 1990).

La reducción del OTMA es fundamentalmente debido a la acción microbiana, aunque algunas especies de peces contienen en sus tejidos una enzima (OTMA-asa u OTMA-dimetilasa), capaz de descomponer el OTMA en dimetilamina (DMA) y Formaldehido (Huidobro y Tejada , 1990)

Cuando la reducción del OTMA es de tipo bacteriano pasa a TMA, que luego pasa por desaminación a dimetilamina, monometilamina y amoniaco (no necesariamente por acción bacteriana) (Huidobro y Tejada , 1990).

La TMA tiene gran importancia desde el punto de vista de la calidad, ya que es la principal responsable del olor fuerte a pescado. El contenido en BNVT expresa cuantitativamente las bases volátiles de bajo peso molecular y aminas procedentes de la descarboxilación microbiana de aminoácidos y se ha considerado representativo del grado de alteración de productos marinos (Huidobro y Tejada , 1990).

El contenido de TMA y BNVT aumenta al producirse deterioro por acción bacteriana o enzimática y éstos son usados como índices de calidad en productos marinos (Baixas-Nogueiras et al, 2001).

Los compuestos extractables que contienen nitrógeno pueden definirse como compuestos de naturaleza no proteica, solubles en agua, de bajo peso molecular y que contienen nitrógeno (Py, 2012).

Los principales componentes de esta fracción son: bases volátiles como el amoniaco y el OTMA, creatina, aminoácidos libres, nucleótidos y bases purinicas (FAO, 1999).

La determinación de BNVT es un término general que incluye la medición de TMA (producido por reducción bacteriana), dimetilamina (producidas por enzimas autolitíca durante el almacenamiento en congelación), amoníaco (producidas por desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos) y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles asociados con el deterioro de los productos pesqueros (FAO, 1999).

Según Connell (1978) el nivel de bases volátiles consideradas como límite de aceptabilidad para los cefalópodos es de: 40-50 mg/100g teniendo como nivel máximo de aceptabilidad 70 mg.

En un trabajo utilizando la técnica de microdifusión de Conway (Adaptada por Bertullo) se establece que las BNVT comienzan a aumentar significativamente a partir del día 12 del almacenamiento frigorífico (0 a 3ºC) (Marin y Vidal, 2013).

Este método se basa en el desprendimiento de las bases volátiles nitrogenadas en medio alcalino y su absorción en ácido bórico para su posterior valoración mediante titulación ante un indicador de color (Ayala et al, 2001).

Para la determinacion de bases nirogenadas volailes oales, uno de los méodos uilizados es la técnica de Conway y Bayrne, modificada por Bertullo (1970).

En cuanto a los parámetros químicos, la normativa internacional utiliza los mismos que para pescado, BNVT: Inferior a 30 mg de nitrógeno/100 g de carne, excluidos los elasmobranquios (MERCOSUR, 1994)

Según el Reglamento Bromatológico Nacional, Decreto 315/994: 6HSURKtEHOD comercialización de los pescados y sus derivados que: presenten un contenido de BNVT superior a 30 mg por 100 g de músculo (se exceptúa los HODVPREUDQTXLRV´

En un estudio se concluyó que no existe una relación razonable entre los métodos sensoriales para la evaluación de la frescura en Illex argentinus, y los resultados obtenidos de la determinación de BNVT, NTMA y TMA. Este no aconseja la utilización de la determinación de BNV como índice de frescura para Illex argentinus, dado que no se encontró un paralelismo adecuado entre dicha medición y la evaluación organoléptica realizada (Marin y Vidal, 2013).

Para la evaluación de los moluscos, las aminas biógenas son un parámetro importante dentro de las cuales, la agmatina (AGM) y la octopina (OCT) son las más importantes. Se señala a la agmatina como un índice químico adecuado en moluscos, ya que su nivel comienza a incrementarse inmediatamente después de la muerte (Cabello et al., 2004).

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de aminoácidos. Desde un punto de vista biológico, estas son moléculas con funciones fisiológicas esenciales para los seres vivos. Sin embargo, la descarboxilación de algunos aminoácidos, llevada a cabo por determinados microorganismos, como; Citrobacter, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Shigella entre otras, pueden provocar la presencia de concentraciones altas de aminas biógenas en los alimentos, de forma que tras su ingestión pasan a la circulación sanguínea desde donde ejercen diversos efectos tóxicos. La presencia de aminas biógenas en alimentos debe de atribuirse a la acción microbiana sobre la fracción proteica de la materia prima y más específicamente a las reacciones de descarboxilación de los aminoácidos precursores llevadas a cabo por determinadas bacterias. Por lo tanto, hay dos factores clave para su acumulación en los alimentos: la presencia de las bacterias con actividad aminoacil-descarboxilasa y la disponibilidad de los sustratos de la reacción. En primer lugar hay que destacar que la presencia de actividad aminoacil-descarboxilasa implicada en la síntesis de aminas biógenas, se trata de una característica de cepa y no de especie, pueden ser bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. En el caso de alimentos no fermentados serán bacterias contaminantes, principalmente gram negativas, las responsables de la síntesis de esas. Algunos autores han sugerido que en este tipo de alimentos la concentración de aminas biógenas podría ser considerada como un indicador de la carga microbiana. Los métodos de detección de aminas biógenas en los alimentos se han ido desarrollando de forma paralela al desarrollo de la cromatografía. Inicialmente, se determinaba su presencia mediante cromatografía en capa fina, para esto se desarrollaron una serie de técnicas que se basan en la separación y la resolución mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Un método alternativo de control de la presencia de aminas biógenas en alimentos se basa en la detección de cepas potencialmente productoras (Fernandez et al 2005).

Algunos microorganismos son considerados como responsables de la producción de aminas biógenas por parte de enzimas descarboxilantes; como ser Pseudomonas, Flavobacerium, Achromobacer y Phoobacerium phosphoreum; específico del calamar (Frances et al., 2001)

Según Marin y Vidal, et al 2013 que estudiaron al pH como parámetro de evaluación de frescura en Illex argentinus; no es recomendable su utilización

debido a que no se encontraron variaciones significativas en el estudio realizado.

Análisis microbiológico

La finalidad del análisis microbiológico de los productos pesqueros es evaluar la posible presencia de bacterias o microorganismos de importancia para la salud pública, así como proporcionar una impresión sobre la calidad higiénica del pescado, incluyendo las condiciones de almacenamiento e higiene durante manipulación y procesamiento del producto (Huss, 1998).

El número total de bacterias en el pescado raramente indica calidad sensorial o duración en almacén (Huss et al., 1974). Sin embargo, se reconoce que ciertas bacterias son las principales causantes del deterioro (Huss, 1998).

En cuanto a la microbiología nativa de los moluscos y del calamar propiamente no es abundante, y refiere a que la microbiota depende de la calidad sanitaria de las aguas en las que se encuentran, y los trabajos realizados son básicamente para bivalvos (Jay, 2002; Wood, 1979). De la misma forma es escasa la bibliografía referente a técnicas para desarrollo y cultivo de dichos microorganismos, ya que la mayoría refieren a recuentos en alimentos en general (Moreno et al., 1985; Sanchi et al., 2007) nombrando solamente los cambios de temperatura posibles para el cultivo de psicrofilos (Moreno et al., 1985; Sanchi et al., 2007), siendo estas últimas las más asociadas a la putrefacción del pescado. Su desarrollo óptimo se produce en un rango de temperatura de 0 a 7 º c (Bertullo, 1975).

En un estudio realizado por Jay, en Pagellus bogaraveo (besugos del mediterráneo) se demostró que en condiciones de almacenamiento aeróbico Pseudomonas lundensis y P. fluorescens eran las dos especies dominantes en el proceso de alteración. Photobacterium phosphoreum se aísla a menudo de pescados de agua salada alterados (Jay, 2002)

Cada especie bacteriana prolifera únicamente entre ciertos límites de temperatura y tiene para su desarrollo una temperatura óptima. En el crecimiento bacteriano se observa una fase de adaptación, una de crecimiento exponencial, seguida de una fase de latencia y posterior muerte. De los factores extrínsecos, la temperatura tiene uno de los papeles más importantes en la viabilidad y desarrollo bacteriano (ICMSF, 1985). De aquí surge la siguiente clasificación;

- Psicrófilos: Son aquellos microorganismos que se desarrollan a temperatura de refrigeración, teniendo su temperatura óptima entre 10 y 12 º c.
- Psicrótrofos: Son microorganismos capaces de crecer a temperaturas cercanas a 0 c, pero que no reúnen los requisitos temperatura óptima y máxima; el crecimiento es bueno a temperaturas moderadas (25-35 ºC)
- Mesófilos: La temperatura óptima de desarrollo está en el rango de 30-37º C
- Termófilos: Se desarrollan a temperaturas opimas de 55-65 º C.

En los métodos de recuento en placa utilizados para la enumeración de grupos de microorganismos que se multiplican dentro de rangos de temperatura diferentes, debe especificarse la temperatura de incubación. Esos rangos son de 0-7ºC para los psicrótrofos, 30-35 ºC para los mesófilos, y 55ºC para los termófilos. La temperatura de incubación dependerá de cuál es la finalidad de realización del recuento en cada caso, no pudiendo contar con valores que excluyan a los microorganismos de los otros grupos de la clasificación (Moreno et al., 1985)

Pseudomonas

Las Pseudomonas son bacilos gramnegativos rectos o ligeramente curvados, mesófilos, poseen flagelos polares únicos o múltiples. Los requisitos nutricionales son muy sencillos, crecen quimiorganotroficamente a pH neutro y a temperaturas en el rango (Brock, 2009)

Dentro de este grupo encontramos el subgrupo fluorescente; que incluye a; P. aeruginosa, P. fluorescens, P. putida, P. syringae, P. stutzeri; donde la mayoría producen pigmentos amarillo verdoso, solubles en agua. (Madigan et al., 2009)

Photobacterium phosphoreum

La familia de los Vibrio, familia Vibrionaceae, incluye bacilos y bacilos curvados gramnegativos anaerobios facultativos con un metabolismo fermentativo. La mayoría de las especies de Vibrio presentan flagelos peritricos. Los géneros mejor conocidos del grupo son: Vibrio, Alivibrio y Photobacterium. La mayoría de los Vibrios y bacterias relacionadas son acuáticos de agua dulce, agua marina y agua salobre (Madigan et al., 2009).

Diversas especies de bacterias pueden emitir luz en un proceso denominado bioluminiscencia; la mayoría de estas están clasificadas en los géneros Photobacterium, Aliivibrio y Vibrio. La mayoría viven en un medio ambiente marino y pueden aislarse de agua marina, sedimentos marinos y la superficie y tractos intestinales de animales marinos. Algunas especies también colonizan órganos especializados de ciertos peces marinos y calamares denominados órganos bioluminiscentes, que el animal utiliza para enviar señales, evitar predadores y atraer a sus presas. Aunque los aislamientos de Photobacterium, Aliivibri y Vibrio son aerobios facultativos, son bioluminiscentes únicamente en presencia de oxígeno, al estar esta catalizada por la luciferasa bacteriana, quien utiliza como sustrato al oxígeno (Madigan et al., 2009).

Entre la bacteria gramnegativa marina Aliivibrio fischeri y un pequeño invertebrado marino, el calamar sepiólide hawaiano Euprymna scolopes, ha evolucionado una simbiosis mutualista. El calamar sepiólide secuestra grandes poblaciones de la bioluminiscente A. fischeri en un órgano luminoso que se encuentra en su parte ventral. La bacteria emite una luz y se piensa que sirve de camuflaje frente a los depredadores que atacan desde abajo, por lo que le confiere una ventaja de supervivencia adicional (Madigan et al., 2009).

No existe un medio selectivo o indicativo para Pseudomonas spp., contaminante de algunos pescados de agua dulce tropical, ni para

Photobacterium phosphoreum que contamina el pescado empacado (Huss, 1998)

Medios de cultivo.

El sustrato más comúnmente usado para los recuentos totales continúa siendo el agar para recuento en placa. Sin embargo, cuando se examinan diferentes tipos de productos pesqueros, un agar más rico en nutrientes, como por ejemplo; (Agar hierro, Lyngby, Oxoid), son de elección, ya que proporcionan recuentos significativamente mayores que el Agar para recuento en placa. Además el agar hierro proporciona mayor número de bacterias productoras de sulfuro de hidrógeno, siendo las mismas específicas del deterioro. Las temperaturas de incubación iguales o superiores a 30 °C son inapropiadas cuando se examinan productos pesqueros mantenidos a temperaturas de enfriamiento. Es relevante emplear siembra en profundidad y, entre tres y cuatro días de incubación a 25 °C cuando se examinan productos donde los organismos más importantes son psicrótrofos, mientras los productos donde aparecen los microorganismos como Photobacterium phosphoreum deberían ser analizados por siembra en superficie y temperatura máxima de incubación a 15 °C. (Huss, 1998)

Para ese trabajo se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- **Cetrimide Base Agar. (Britania)**

  Medio utilizado para el aislamiento selectivo de Pseudomonas aeruginosa y de otras especies del género. La fórmula de este medio está desarrollada para favorecer la selección de esta bacteria y estimular la formación de pigmentos. Es éste un medio muy semejante al King A, en el cual el cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina y piomelanina de P. aeruginosa. La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de Pseudomonas (Laboratorio Britania).

- **King A Agar. (Britania)**

  Medio de cultivo utilizado para el aislamiento, detección y la diferenciación de especies de Pseudomonas spp. en base a la producción de piocianina. En el medio de cultivo, la peptona de gelatina aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la glicerina favorece la producción de pigmentos, las sales de magnesio y potasio estimulan la producción de piocianina y piorrubina e inhiben la producción de fluoresceína. Un resultado positivo es por observación de los pigmentos piocianina y/o piorrubina. La producción de piocianina se observa como una zona color azul, azul-verdoso que rodea la colonia, o que se extiende en todo el medio de cultivo debido a la difusión del pigmento. La producción de piorrubina se observa como una zona de color rojo alrededor de la colonia, o que se extiende en todo el medio de cultivo debido a la difusión del pigmento. Se observa producción de piocianina en; P. aeruginosa, P. fluorescens, y P.putida (Laboratorio Britania).

- **Agar Sea Water. (Himedia)**

Este medio está desarrollado y formulado según American Public Health Association (APHA) para el cultivo de microorganismos marinos en alimentos. Las bacterias halófilas tienen requisitos iónicos complejos, y pueden requerir magnesio y potasio, además de cloruro de sodio para el crecimiento y la actividad proteolítica. Este medio además de tener una parte que actúa como agua de mar sintética para proveer un ambiente propicio para el crecimiento de los microorganismos, contiene compuestos nitrogenados, vitaminas del complejo B y otros nutrientes esenciales para el crecimiento (Laboratorio Himedia).

-

OBJETIVOS

Objetivo general

- Identificar los cambios sensoriales más relevantes para la evaluación sensorial de la frescura en Illex argentinus
Confeccionar una cartilla para la evaluación sensorial de la frescura para Illex argentinus
-Identificar los microorganismos alterativos en Illex argentinus refrigerado (0 a 3°c)

Objetivos específicos

- Describir la variación de los parámetros sensoriales en Illex argentinus a medida que avanza la putrefacción
- Elaborar una cartilla gráfica para la evaluación sensorial de Illex argentinus
- Elaborar una cartilla interpretativa para la evaluación sensorial de Illex argentinus
- -Confeccionar un registro de imágenes de los atributos más significativos por método sensorial para la especie en particular de acuerdo al grado de frescura.
- Identificar cuali-cuantitativamente la flora alterativa de Illex argentinus.
- Comparar los resultados obtenidos de la evaluación sensorial con los resultados de las BNVT y los recuentos microbiológicos.

Localización del estudio.

Los estudios se llevaron a cabo en dos instituciones en el departamento de Montevideo; en el Instituto de Investigaciones Pesqueras ³3URI 'U 9tFWRU + Bertullo´(IIP), donde se realizaron las tareas de evaluación sensorial, registro fotográfico, preparación y esterilización de material.
En el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) se realizó la preparación de medios de cultivo, para su posterior transporte refrigerados al IIP.

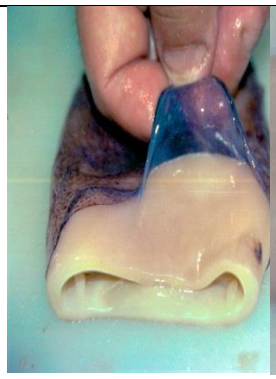
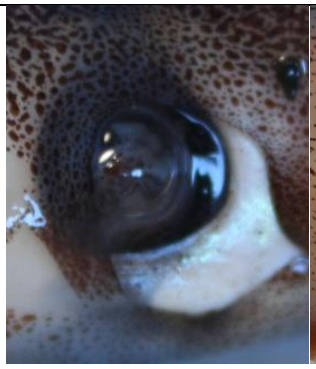
Materiales

- Ejemplares de la especie Illex argentinus
- Planillas de inspección
- Tabla de plástico
- Cuchillas
- Balanza electrónica
- Termómetro
- Cámara fotográfica digital
- Regla
- Cámara de refrigeración del IIP (0-3°c)
- Estufa de incubación
- Autoclave
- Ácido tricloracetico
- Ácido bórico al 2
- Ácido sulfúrico N/100
- Reactivo de Tashiro
- Vaselina sólida
- Cámaras de Conway y tapas
- Licuadora
- Filtros de papel
- Embudos de vidrio
- Vasos de bohemia
- Pipetas graduadas
- Varillas de vidrio
- Medios de cultivo: Agar Base Cetrimide, Agar Base King A, Agar Sea Water
- Placas de petri

Metodología

- Se

Cuadro 3. Sistema representativo para la clasificación y puntuación de la evaluación organoléptica del calamar (*Illex argentinus*)

Características	0	1	2	3
Piel				
Musculo				
Ojo				

Fuente: Py, 2012

En base a esta evaluación se desarrolló una planilla, que se presenta en anexos.

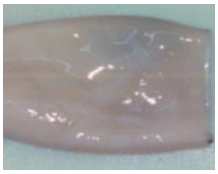
En base a este seguimiento se desarrolló una planilla final tomando en cuenta el total de muestras consideradas para él estudió, resultando en el siguiente cuadro:

Figura 4. Resultados de la evaluación sensorial.

	Calamar				
DIAS	COLOR	PIEL	MUSCULO	OJO	OLOR
0	Color claro, caracteristico, brillante, con presencia de marcas por congelado	Brillante, humeda, lisa, mucus transparente, facil de desprender	Blanco marfilino, firme	Plano, no sobresale de su orbita, traslucido pero con señas de la congelacion	Propio *Sui generis*
1	Empiezan a aparecer cromatoforos, se intensifican marcas del congelado	Brillante, humeda, lisa, mucus transparente	Blanco, pero con menos brillo	Ligeramente hundido	Muy ligeramente dulce
2	Se intensifican cromatoforos; se nota un color mas oscuro	Integra, humeda	Duro, sin brillo	Ligeramente hundidos, opacos	Ligeramente dulce
3	Siguen intensificandose cromatoforos	Comienza a aparecer mas debil a la manipulacion	Se mantiene firme, pero se presenta opaco	Hundidos	Ligeramente dulce
4	Pierde brillo	Con desgarros	Duro, con alguna mancha	Concavo, opacos	Debilmente aromatico
5	Comienza a aparecer un color violaceo en algunas zonas	Humeda, con desgarros	Comienza a aparecer una coloracion de tinte rosado muy sutil	Concavo, opacos	Aromatico
6	Color violeta se empieza a hacer notar en zonas claras	Mas seca, sin brillo	Mantiene textura, aparece alguna mancha	Concavo, opacos	Aromatico
7	Zona de cromatoforos oscura, con bordes en los que aparece el color violeta	Seca, con poco mucus	Ligeramente rosado	Concavo, opacos	Aromatico
8	Color oscuro por cromatoforos, y con un tono violeta en otras zonas	Mas seca, se desprende en la manipulacion	Poco flexible, ligeramente rosado	Totalmente hundido, opaco	Aromatico
9	Tono violeta claro se extiende en todo el ejemplar	Deshidratada, se desprende con facilidad	Rosado con zonas mas oscuras	Totalmente hundido, opaco	Aromatico
10	Oscuro, opaco, violeta cada vez mas oscuro	Se desprende con facilidad	Perdida de texura, aparecen zonas mas grises y negras	Totalmente hundido, opaco	Aromatico
11	Color Oscuro, apagado, predominan el violeta oscuro y el negro	Perdida de cohesion, se desintegra a la manipulación	Músculo con zonas de perdida total de texura, negras	Totalmente hundido, opaco	Aromatico, no agradable

Tambien se confecciono la siguiente planilla con las fotografias obtenidas de los aributos evaluados;

Figura 5. Registro fotográfico de los aributos evaluados.

Grado de Frescura	Apariencia gral	Piel	Músculo	Ojo
0				
1				
2				
3				

2. **Análisis microbiológico**:

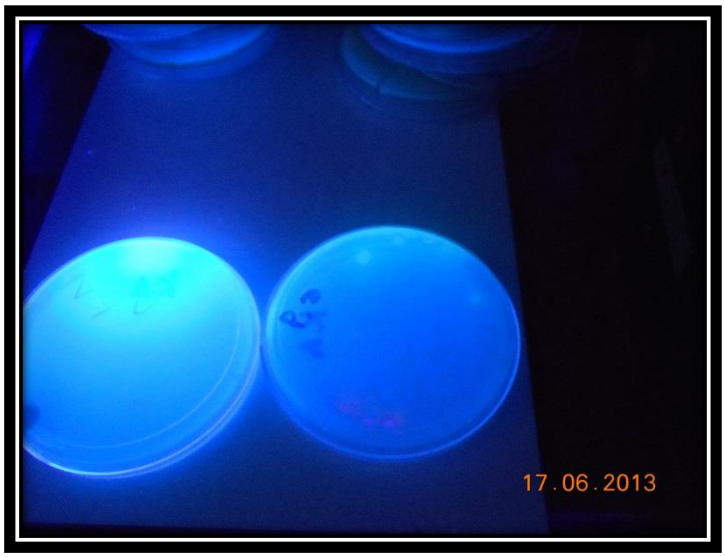
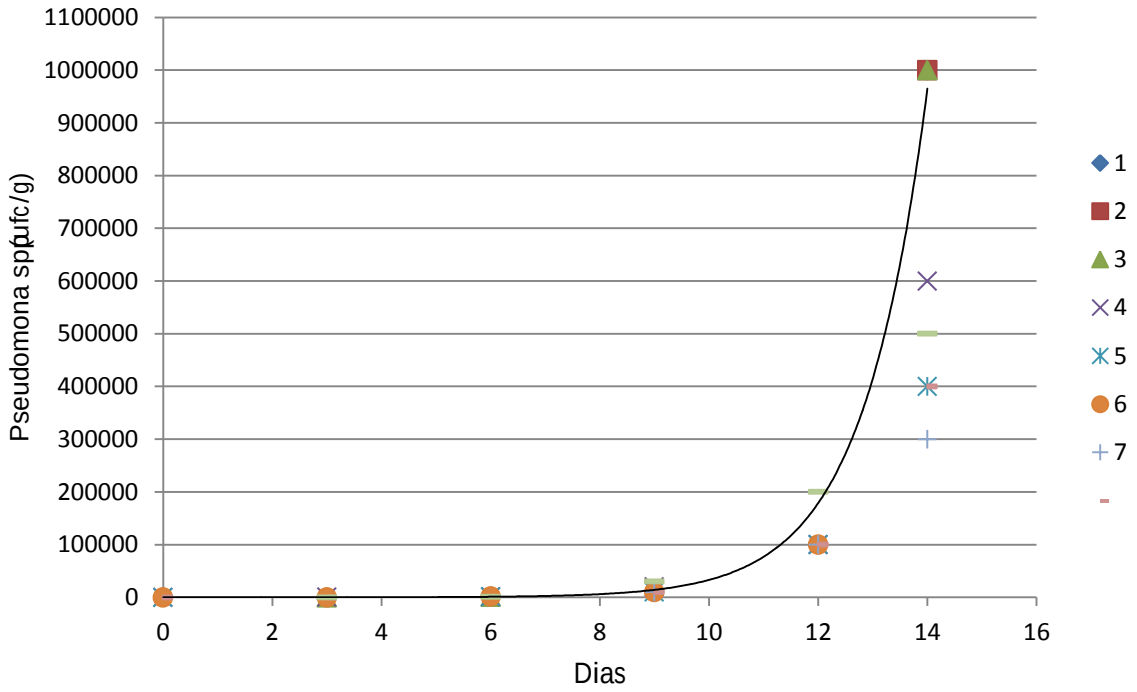


Figura 6. Fluorescencia en *Pseudomona spp*.

Cuadro 5.Resultados obtenidos en los recuentos para *Pseudomona spp.* Expresado en ufc/g

Muestra/ Dias	0	3	6	9	12	14
1			1×10^3			1×10^6
2						1×10^6
3		1×10^2	1×10^3			1×10^6
4	30	2×10^2	1×10^3	2×10^4	1×10^5	6×10^5
5	10		1×10^3	1×10^4	1×10^5	4×10^5
6	40	1×10^2	2×10^3	1×10^4	1×10^5	
7				1×10^4	1×10^5	3×10^5
8	20	1×10^2		1×10^4	1×10^5	4×10^5
9		1×10^2	1×10^3	3×10^4	2×10^5	5×10^5

Gráfico 1. Crecimiento obtenido de *Pseudomona spp.* durante el almacenamiento refrigerado



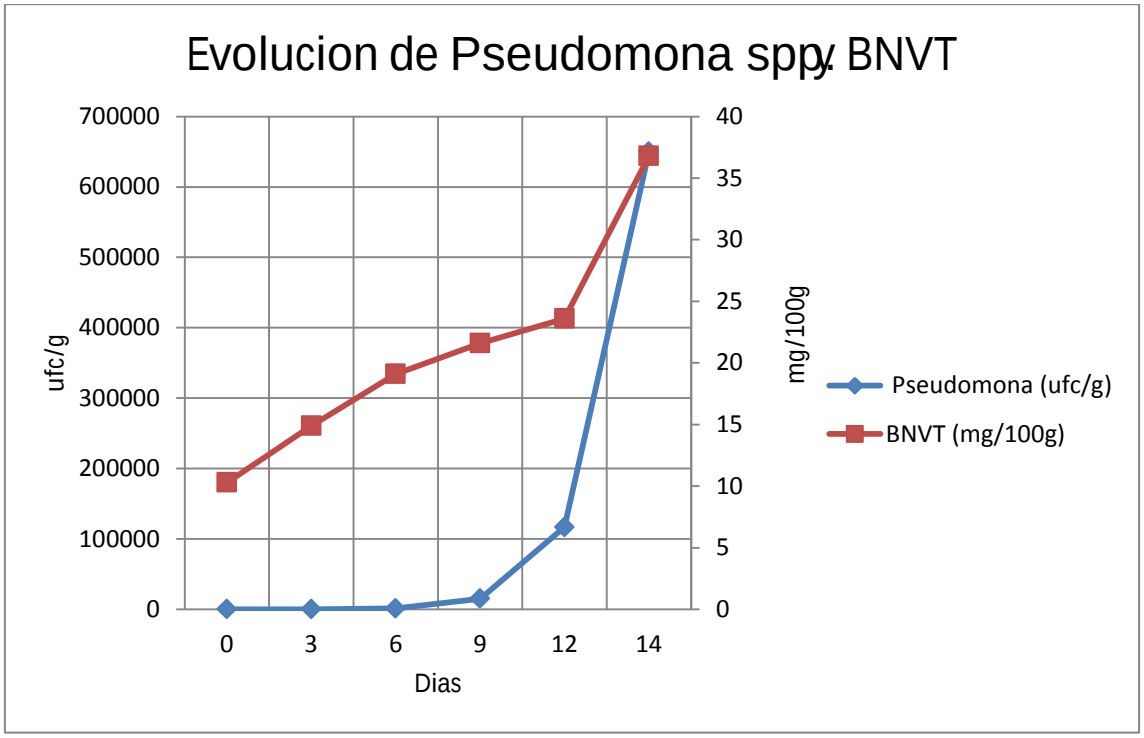
En la gráfica se observa que los resultados tienden a una curva exponencial, pero los valores aumentan desde el día 12 del ensayo. Para este caso tomamos como referencia los valores del reglamento bromatológico Nacional, que establece un máximo de 1 x 10^6 para recuentos de bacterias mesófilas totales, no especificando ningún valor específico para el calamar en si, sino en general a productos de la pesca. De aquí se desprende que microbiológicamente el producto es apto hasta el día 14.

Se realizó un seguimiento del crecimiento y se encontró que a los 5 días de incubación se encontraban los mejores resultados para el recuento de Pseudomona spp, estableciendo en dicho valor los días de incubación del total de las muestras.

Para el caso de Photobacterium phosphoreum no se encontraron hallazgos de este microorganismo.

los primeros días del ensayo, a partir del día 12 se comportan de manera similar marcando ambos parámetros un notorio crecimiento. También podemos observar como al día 9 cuando los ejemplares dejan de ser aptos por examen organoléptico, por cualquiera de estos ensayos lo continúa siendo hasta el día 14

Gráfico 3. Evolución de *Pseudomona spp.* y BNVT promedio



Discusión:

El presente trabajo se basó en utilizar distintos métodos para la evaluación sensorial de la frescura de Illex argentinus. Se observó al igual que lo descrito en Marin y Vidal, 2013 tanto la determinación de bases nitrogenadas volátiles totales, como los análisis microbiológicos, no coinciden con los resultados obtenidos en la evaluación sensorial, siendo estos significativos cuando ya el producto no es apto sensorialmente para consumo humano, por lo tanto no serían recomendables para la determinación de frescura por si solos.

Cabe destacar que se trabajó con ejemplares congelados y no frescos, debido a la escasez de esos; por lo cual es probable que ese hecho altere los resultados en las distintas evaluaciones realizadas

Al ser ejemplares congelados es probable que interfirieran en la no determinación del Photobacterium phosphoreum, como también la dificultad de encontrar un método específico para este, ni bibliografía específica, sino que se trabajó en base a citas en trabajos puntuales (Jay, 2002). Para el caso de Pseudomonas spp, hay que señalar que pueden provenir del ambiente acuático

propio del calamar, así como también por la manipulación del producto luego de su captura.

Para el caso de BNVT se observó como en trabajos anteriores (Marin y Vidal, 2013), que estas superan los límites establecidos en el reglamento (30mg/100g) luego de ser descarado el producto por evaluación sensorial.

Conclusiones:

- Del trabajo se desprende que en los calamares observados se pudo constatar su aptitud para el consumo hasta el día 10; coincidiendo con trabajos anteriores en la materia (Marin y Vidal, 2013). Dentro de las características sensoriales evaluadas resalta que el olor nunca a llega a ser un olor amoniacal, ni demasiado ofensivo, si bien finaliza no siendo agradable, esto ocurre cuando ya dejo de ser apto por evaluación sensorial del resto de los atributos.
- Se constató la presencia, y el aumento de Pseudomona spp a medida que avanzó la descomposición, con valores desde 10 ufc/g al comenzar el estudio, hasta máximos de 1 x 10^6 ufc/g llegando al día 14 en refrigeración

- No se constató la presencia de Photobacterium phosphoreum.

- No se encontró relación directa de los valores obtenidos en las muestras analizadas entre las BNVT, los análisis microbiológicos y el dictamen de la evaluación sensorial

Recomendaciones

- No es aconsejable utilizar los métodos antes descriptos para la evaluación de frescura, a excepción de la evaluación sensorial.

- Es de suma importancia profundizar en estudios complementarios de la evaluación sensorial para la evaluación de frescura del calamar.

- No es aconsejable seguir utilizando los mismos métodos de evaluación de frescura que se utilizan para peces, ya que existen marcadas diferencias en esos grupos zoológicos

- Es altamente recomendable poder desarrollar un QIM específico para esta especie, y poder utilizarlo como referencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abaroa, M. C., Pérez-Villarreal, B., González de Zárate, A., Aboitiz, X., Bald, C., Riesco, S., Picaza, N. (2008) Frescura del pescado. Guía visual para su evaluación sensorial. Sukarrieta, AZTI-Tecnalia. 69 p.

2. Agenjo, C. (1980). Enciclopedia de la Inspección Veterinaria y Análisis de los Alimentos. Madrid: Espasa-Calpe. pp 853-882.

3. Aguiar Santos, R, M Haimovici (1997). Food and feeding of the short-finned squid Illex argentinus (Cephalopoda: Ommastrephidae) off southern Brazil. Fisheries Research 33:139-147.

4. Ayala, M. E., Salas, A., Carbajal, M., Plácido, M., Albrecht Ruiz, M. (2001) Patrón de deterioro de anchoveta peruana (Engraulis ringens) almacenada a temperatura de refrigeración. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 3(3): 161-168, Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Disponible en: http://www.redalyc.org/pdf/724/72430306.pdf
   Fecha de consulta: 22/08/14

5. Ayçaguer C.; (2009) Guía temática de Malacología. Material de apoyo para el Ciclo Orientado, Higiene, Inspección y Control de productos de la Pesca ± IIP Montevideo. 19p

6. Ayçaguer C.; (2008) Elementos de Malacología. Teórico para el Ciclo Común Obligatorio - IIP, Área Ciencias del Mar. [diapositivas]

7. Baixas-Nogueiras S.; Bover-Cid S.; Vidal-Carou MC.; y Veciena-Nogués MT.; (2001) Volatile and non volatile amines in mediterranean Hake as a function of their storage temperature. J. Food Sci. 66(1): 83-88.

8. Bertullo, VH.; (1975). Tecnología de los productos y subproductos de pescados, moluscos y crustáceos. Buenos Aires: Hemisferio Sur. 538p

9. Cabello, A. M.; Villarroel Lezama, R.;Figuera Garcia, B. E (2004). Parámetros de frescura de moluscos. Revista científica 14(5):457-466.

10. Castellanos, Z.A de (1964).Contribución al conocimiento biológico del calamar argentino (Illex argentinus) Mar del Plata, Instituto de Biología Marina, 36p.

11. Connell, J.; (1978) Control de la calidad del pescado. Zaragoza. Acribia. 236p.

12. Dragonetti JP. (2008); Guía Ilustrada para la Evaluación de la Frescura de los productos de la pesca Montevideo, FV, 119 p .

13. FAO/OMS. (1999). Codex Alimentarius: Directrices del Codex para la Evaluación Sensorial de Pescados y Mariscos en Laboratorio. CAC/GL 31. Roma. 24p. -> Disponible en: www.codexalimentarius.net/download/standards/359/CXG_031s.pdf- Fecha de consulta:10/06/14

14. Fernandez, María; Álvarez, Miguel, A. Las aminas biógenas en los alimentos. Instituto de productos lacteos de Asturias. 2005. Disponible en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/5771/1/IPLA_AGROCSIC_2.pdf Fecha de consulta: 25/06/14

15. Huss, H. H. (1998) El pescado fresco su calidad y cambios de su calidad. Documento técnico de pesca nº 348. Roma, FAO. 202 p. Disponible en: http://www.fao.org/DOCREP/V7180S/V7180S00.HTM. Fecha de consulta: 24/06/14

16. International Comission on Microbiological Specifications for Foods(1985) Ecología Microbiana de los alimentos 1. Factores que afectan la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Zaragoza. Acribia. 332p.

17. Ivanovic, M.L., N.E. Brunetti. (1994). Food and feeding of Illex argentinus. Antart. Sci. 6(2): 185-193.

18. Jay, J, M; Loessner, M, J; Golden, D, A.(2002) Microbiologia Moderna de los Alimentos. Zaragoza. Acribia. 782p.

19. Leta, R.Ð $SHFWRV ELROyJLFRV GHO FDODPDU ,OOH[DUJHQWLQXV´ Informe Técnico del Instituto Nacional de Pesca. Montevideo, Uruguay. 51p.

20. Laboratorios Britania. Hojas técnicas, disponible en: http://www.britanialab.com/productos.php Fecha de consulta:24/07/14

21. Laboratorio Himedia. Hojas técnicas, disponible en: http://himedialabs.com/TD/M592.pdf Fecha de consulta: 24/07/14

22. Madigan, Michael t; Martinko, Jhon M; Dunlap, Paul V; Clark, David P. Brock. (2009) Biología de los Microorganismos. 12 ed. Gráficas Rogar.

23. Marin Gimenez, A; Vidal, Calzada, C L. 2013 Estudió de los parámetros para la evaluación de la frescura en el calamar (Illex argentinus) Tesis de Grado Facultad de Veterinaria Montevideo, Uruguay , 36p

24. MERCOSUR. (1994). Resolución Nº 40/94. Identidad y calidad de pescado fresco. Disponible en: http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/res94es/9440.pdf Fecha de consulta: 21/07/14

25. Moreno,B; Diez, V; Garcia, M, L; Francisco, J, J.(1985) Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de análisis microbiológico. Zaragoza. Acribia v.1.

26. Ocaño Higuera, V, M; Graciano Verdugo, A, Z; Tapia López, M, I; Castillo Yáñez, F, J. El consumo de alimentos de origen marino: un camino a la salud. Revista Universidad de Sonora. Número 22, Julio-Septiembre 2008. Disponible en: http://www.revistauniversidad.uson.mx/revistas/22-22articulo%208.pdf Fecha de consulta: 20/06/2014

27. Py, M (2012) Métodos para la evaluación de la frescura en el calamar (Illex argentinus). Tesis de Grado Facultad de Veterinaria Montevideo, Uruguay, 29p.

28. Rathjen, Warren F,(1987) Pesca Marina . La pesca del calamar . 11p.

29. Sancho E, J; Bota, E; De Castro, J J.1999 Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Edicions de la Universitat de Barcelona. 336p.

30. Uruguay. Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. 2013. Boletín Estadístico Pesquero 2012. Montevideo, MGAP-DINARA, 83p.

31. Uruguay (2001). Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto N° 315/994. 3a ed. Montevideo, IMPO. 136 p.

32. Wood, P, C.1979 Manual de higiene de los mariscos. . Zaragoza. Acribia. 83p.

33. Yamanaka, H. (1989). Changes in Polyamines and Amino Acids in Scallop Adductor Muscle during Storage. Journal of Food Science 54(5): 1133-1135.

34. Yoshioka, T; Kinoshita, H.; Yoshino, H.; Park, S.; Konno, K.; Seki, N. (2003). Change in translucency of squid mantle upon storage. Fish Sci 69(2): 408-413.

Anexo I

Planilla utilizada para el seguimiento diario de la evaluación de la frescura.

	Calamar x				
DIAS	**COLOR**	**PIEL**	**MUSCULO**	**OJO**	**OLOR**
0					
1					
2					
3					
4					
5					
6					

7					
8					
9					
10					
11					