

**ZAMORANO**  
**Carrera de Ciencia y Producción**  
**Agropecuaria**

**Análisis de residuos de sulfitos en camarón**  
**entero**

Tesis presentada como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado  
Académico de Licenciatura

Presentado por

**Edgar Osiris Carranza Espinal**

**Zamorano, Honduras**

Agosto, 2002

El autor concede a Zamorano permiso  
para reproducir y distribuir copias de este  
trabajo para fines educativos. Para otras personas  
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

---

Edgar Osiris Carranza Espinal

Zamorano, Honduras  
Agosto, 2002

## **Análisis de residuos de sulfitos en camarón entero**

Presentado por

Edgar Osiris Carranza Espinal

Aprobada:

---

Daniel Meyer, Ph. D.  
Asesor Principal

---

Miguel Vélez, Ph. D.  
Coordinador Área Temática

---

Carlos Aceituno, M.Sc.  
Asesor

---

Jorge Iván Restrepo, M.B.A.  
Coordinador de Ciencia  
y Producción Agropecuaria

---

Ismael Escobar, Lic.  
Asesor

---

Antonio Flores, Ph. D.  
Decano Académico

---

Miguel Vélez, Ph. D.  
Coordinador PIA

---

Mario Contreras, Ph. D.  
Director Interino

## **DEDICATORIA**

A Dios por haberme fortalecido en cada instante durante mi trayectoria en Zamorano, por enseñarme que la perseverancia es un don.

A mi Mamá por su incondicional apoyo, la certera confianza de creer en mi y el haberme inculcado verdaderos valores morales.

A mis hermanos Kevin, Evans, Enoch y Aaron, por apoyarme siempre.

A mi Abuela Hilda y tías Maria, Mercedes y Norma, mi tío Gustavo y mis primos por ser tan especiales.

A mis amigos Ricardo, Alba, José y Carlos Aceituno.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias Dios por permitirme estar donde estoy hoy.

A mi Mamá y mis hermanos al ser una familia muy unida, y salir siempre airoso en todas las adversidades.

A mi padre por su apoyo económico en los tres primeros años en Zamorano.

A Carlos Aceituno por considerarme especial y el afecto paternal que siempre me ha mostrado.

A mis asesores Daniel Meyer, Carlos Aceituno e Ismael Escobar, por su apoyo en todo momento.

A mis colegas zamoranos por su sincera y valiosa amistad.

A todos los maestros y personal del Zamorano que me regalaron sus conocimientos, experiencia y amistad.

## **AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES**

Agradezco enormemente al Grupo Granjas Marinas S. A. por financiar mis estudios de cuarto año y mi proyecto especial en Zamorano. El apoyo recibido ha sido fundamental para mi crecimiento personal y la culminación de una meta importante en mi vida.

## RESUMEN

Carranza, O. 2002. Análisis de residuos de sulfitos en camarón entero. Proyecto especial del programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 15 p.

El Grupo Granjas Marinas (GGMSA) quiere incrementar la comercialización de camarón entero en los mercados norteamericano y europeo, los cuales castigan fuertemente los camarones con melanosis o que contienen residuos de sulfitos superiores a 100 y 150 ppm, respectivamente. La melanosis consiste en el desarrollo de una coloración negruzca en el exoesqueleto del camarón. El metabisulfito de sodio (MBS) inhibe la formación de melanosis. Para detectar residuos de sulfitos en camarones tratados con MBS se emplean los métodos de cintas colorimétricas, titulación con iodometría y titulación con Monier-Williams (M-W). Los objetivos del estudio fueron evaluar los métodos para detectar sulfitos en camarones tratados con MBS y determinar la cantidad de sulfitos detectados con el procedimiento M-W a diferentes tiempos de destilación. Se seleccionaron camarones de un estanque de producción según las características de textura del exoesqueleto que fueron sometidos a baños de 0.5% y 1.0% de MBS. Se determinaron las concentraciones de sulfitos y el desarrollo de melanosis durante ocho semanas de almacenamiento a  $-18^{\circ}\text{C}$ . El método de cintas colorimétricas no tiene precisión en detectar sulfitos en los camarones, el método M-W detectó más sulfitos que la iodometría ( $P < 0.004$ ). Se encontraron correlaciones altamente significativas con el método M-W entre los sulfitos detectados después de cada tiempo de destilación ( $P < 0.001$ ). Los camarones tratados con MBS mostraron una reducción de sulfitos a lo largo de ocho semanas de almacenamiento ( $P < 0.04$ ). El método M-W mostró ser más preciso en la detección de sulfitos. Según los resultados del ensayo se puede acortar el tiempo de destilado en el método M-W para detectar adecuadamente los residuos de sulfitos en el camarón. Los camarones tratados con MBS presentaron menos melanosis ( $P < 0.02$ ) que los no tratados durante ocho semanas de congelamiento.

Palabras claves: Cintas colorimétricas, iodometría, MBS, melanosis, Monier-Williams.

## **NOTA DE PRENSA**

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Autoría .....	ii
Página de firmas .....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimiento .....	v
Agradecimiento a Patrocinadores .....	vi
Resumen .....	vii
Nota de prensa .....	viii
Contenido .....	ix
Indice de cuadros .....	xi
Indice de figuras .....	xii
Indice de anexos .....	xiii
1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
2. <b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	4
2.1 LOCALIZACIÓN .....	4
2.2 TOMA DE MUESTRAS .....	4
2.3 ANALISIS DE LAS MUESTRAS .....	5
2.3.1 Comparación de tres métodos de detección de residuos de sulfitos (SO <sub>2</sub> -) en función al tiempo de almacenamiento .....	5
2.3.2 Determinación de residuos de sulfitos a diferentes tiempos de destilación con el método Monier-Williams .....	6
2.3.3 Grados de desarrollo de melanosis .....	6
2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADISITICO .....	7
3. <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	8
3.1 COMPARACION DE TRES DE METODOS DE DETECCION DE RESIDUOS DE SULFITOS EN CAMARONES TRATADOS CON MBS...	8
3.2 DETERMINACION DE RESIDUOS DE SULFITOS A DIFERENTES TIEMPOS DE DESTILACION CON EL METODO M-W.....	12
3.3 GRADOS DE DESARROLLO DE MELANOSIS .....	14
4. <b>CONCLUSIONES</b> .....	15

<b>5.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>16</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>17</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>19</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

### Cuadro

1. Escala de desarrollo de melanosis ..... 7
2. Residuos de sulfitos determinados con los métodos de las cintas colorimétricas, iodometría y Monier-Williams, en tratado con MBS ..... 8
3. Concentración de residuos de sulfitos con los métodos de cintas colorimétricas, iodometría y Monier-Williams, para detectar residuos de sulfitos en camarón tratado con MBS durante ocho semanas de almacenamiento a  $-18^{\circ}\text{C}$  ..... 9
4. Detección de residuos de sulfitos y el porcentaje de captación de sulfitos a diferentes tiempos de destilado con el método Monier-Williams ..... 12

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura

1. Escala de concentración de sulfitos con cintas colorimétricas .....	5
2. Comparación de los métodos iodometría y Monier-Williams para detectar sulfitos en tejido de camarón en concentraciones de 0.5 y 1.0% de MBS .....	11
3. Porcentaje de captación de sulfitos con el método Monier-Williams en cuatro tiempos de destilado (35, 70, 90 y 105 minutos) .....	13
4. Desarrollo de melanosis en camarones tratados con MBS después de ocho semanas de almacenamiento a -18°C .....	14

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Anexo

1. Categorías de textura para cosecha de camarón entero .....	19
2. Procedimiento para la detección de residuos de sulfitos del método Monier-Williams.....	19
3. Procedimiento para la detección de sulfitos de los métodos de iodometría y cintas colorimétricas .....	21
4. Regresión y correlación en camarones tratados con 0.5% y 1.0% de MBS entre los minutos de destilado de 35, 70, 90 y 105 minutos con el método Monier-Williams .....	23

## 1. INTRODUCCION

El camarón cultivado en Honduras constituye el tercer rubro de exportación más importante, con 125 millones de dólares al año (Banco Central de Honduras, 2001) y generar alrededor de 25,000 empleos directos (Sampson, 1997). El mayor exportador de camarones es el Grupo Granjas Marinas S.A. (GGMSA), que comercializa colas y el camarón entero.

Tradicionalmente el principal producto de exportación de esta empresa es la cola del camarón a los mercados de Norteamérica, Inglaterra y Japón. Recientemente, GGMSA ha considerado incrementar la comercialización del camarón entero en el mercado europeo. Sin embargo, las exigencias del mercado europeo en cuanto a calidad, son muy altas, castigando fuertemente el valor y la aceptación por los consumidores del camarón con presencia de melanosis (Villalón, 1994).

La melanosis consiste en una coloración negruzca sobre la cutícula del camarón. Se produce por la reacción enzimática de la polifenól oxidasa (PFO) (Hispano Química, 1987) al oxidarse los compuestos fenolíticos en quinónas (Ferrer, 1991). La melanosis se presenta en todas las especies de camarones.

La PFO se activa 18 a 20 horas después del muerte del camarón (Bon, 1994). La melanosis se extiende sobre el camarón desde la cabeza hasta la cola, ramificándose por las extremidades (Rivas 1997). Este proceso es semejante al bronceado de la piel humana cuando es expuesta a la luz solar (Slattery et al., 1992).

Para que se desarrolle melanosis debe existir la PFO, un ambiente de pH alto, una alta temperatura, y la exposición a la luz y oxígeno molecular. Se puede reducir la incidencia de melanosis controlando estos factores (Slattery et al., 1992). La melanosis es considerada por las normas oficiales de los Estados Unidos, como una mancha, y no como una alteración bacteriana (López, 1990).

La industria camaronera utiliza el descabezado y el frío para evitar la melanosis. El descabezado elimina la mayoría de los órganos internos y enzimas digestivas del camarón. El congelamiento disminuye la actividad de la enzima, pero no previene la melanosis (Villalón, 1994). El descabezado representa un mayor costo de producción y la cola tiene un menor valor en el mercado internacional que el camarón entero. Otros de los métodos empleados para la prevención de melanosis es el tratamiento con metabisulfito de sodio (MBS).

El MBS es utilizado ampliamente en la industria alimenticia como conservador de frutas y verduras, mariscos, y una gran variedad de alimentos conservados (Parsulfite Chemical Company, 2002). La fórmula química de MBS es  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , tiene un pH de 3.5 -5.0 y una solubilidad en agua de 470g/l a 20°C. En el camarón inhibe la enzima responsable del desarrollo de la melanosis (Food Marketing Institute, 2002).

Los sulfitos han sido utilizados por siglos en la industria de alimento como agente anti-microbial (Slattery et al., 1992). MBS se usa para prevenir la melanosis en mariscos desde 1950 (McEvily et al., 1991).

Los camarones cosechados son bañados con MBS, controlando las concentraciones, la temperatura, y el tiempo de inmersión. La metodología tradicional de inmersión en MBS para el tratamiento de camarón entero consiste en la preparación de soluciones con 100kg de MBS en 500 litros de agua, a temperatura ambiente en pilas. Se quiere alcanzar concentraciones de sulfitos en el tejido del camarón, de acuerdo al reglamento vigente en el mercado europeo (Alvarez, 2000).

Actualmente el GGMSA dispone de una metodología propia para preservar camarón entero, que involucra baños en una solución de MBS. El producto cosechado es colocado en un recipiente de 1000 litros de capacidad en una solución de 3% de MBS, y con una temperatura inferior a 5°C. El baño dura 30 segundos. El producto es depositado en otro recipiente de 1000 litros con una solución de 0.8 ó 0.5% de MBS. Se usa 0.8% de MBS para el mercado europeo y 0.5% para el mercado Norteamericano. Los camarones cosechados son transportados a la planta de procesamiento en estos tanques.

Desde la laguna a la planta de empaque, el camarón absorbe MBS durante 6 a 12 horas. Este manejo permite obtener concentraciones de 100 y 150ppm de MBS en el tejido del camarón al momento de su consumo, que son aceptadas por la Food and Drug Administration (USFDA) y por el Consejo de la Unión Europea (UE), respectivamente (GGMSA, 2001a).

Las concentraciones de sulfitos en el tejido del camarón son determinadas a través de métodos estándares de laboratorio. Estos incluyen: el método Monier-Williams, la iodometría, y las cintas colorimétricas. Los métodos de Monier-Williams (M-W) e iodometría (IM) son los aceptados por la USFDA. El método M-W es más preciso pero requiere más tiempo para analizar una muestra, el equipo es más sofisticado y los reactivos más costosos que para los otros métodos (Alvarez, 2000). El procedimiento de iodometría consiste en la titulación de una muestra de camarón macerada. Las cintas colorimétricas determinan, a nivel de campo, las concentraciones presuntivas de sulfitos en el camarón.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar tres metodologías de laboratorio para determinar la cantidad de residuos de sulfitos ( $\text{SO}_2$ ) en camarones tratados con MBS.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Observar la cantidad de residuos de sulfitos detectada en camarones tratados con MBS utilizando el método de Monier-Williams, con diferentes tiempos de destilación.

Observar el desarrollo de la melanosis en camarones enteros tratados con MBS en función del tiempo de almacenamiento a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1 UBICACIÓN**

Los camarones enteros fueron tratados con metabisulfito (MBS) al ser cosechados en las instalaciones de Granjas Marinas San Bernardo (GMSB), ubicada en el Departamento de Choluteca, Honduras. Los análisis de residuos de sulfitos y la evaluación de melanosis en los camarones se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Empacadora San Lorenzo en San Lorenzo, Valle, Honduras.

### **2.2 TOMA DE MUESTRAS**

Se obtuvieron 11kg de camarones vivos con un peso promedio de 10.6g de un estanque de producción entre las 7:00 y 10:00 de la mañana. La selección del estanque para obtener los camarones se realizó a partir de las características de textura del exoesqueleto establecidas para la cosecha comercial de camarón entero. Las que están definidas en 5 categorías que son: muda (M), blando3 (B3), blando 2 (B2), blando 1 (B1) y duro (D), una cosecha comercial de camarón entero debe contar con los niveles de textura de 6% M, 9% B3, 15% B2, 25% B1 y 60% D (Anexo 1).

La muestra de camarones se dividió en tres lotes. El primero, de 2kg, no recibió MBS, los otros dos lotes de 4.5kg cada uno, fueron tratados con meta-bisulfito de sodio (MBS) utilizando las metodologías establecidas por la compañía (GGMSA, 2001a). El tratamiento de MBS consistió en un baño de 30,000ppm de MBS durante 30 segundos para los 2 lotes de camarones en un recipiente de 72 litros de agua y 2.16kg de MBS a una temperatura inferior a 5<sup>0</sup>C. Los camarones tratados se almacenaron en porciones iguales en 2 hieleras de 0.20 metros cúbicos, con una altura de 50cm distribuido en tres capas uniformes de camarones y hielo. Se agregaron soluciones de MBS de 1.0% y 0.5% a cada hielera, distribuyendo el hielo, camarón y solución de MBS, en una relación de 1:1:2.

El hielo se colocó en bolsas plásticas, evitando así el contacto con la solución de MBS, ya que contenía hipoclorito de sodio, el cual inactiva los iones de azufre del MBS. Las muestras de camarón se dividieron en tres sub-lotes y fueron almacenados a -18<sup>0</sup>C en la planta de Empacadora San Lorenzo (ESL).

## 2.3 ANALISIS DE LAS MUESTRAS

El estudio constó de tres fases que fueron: I) comparación de tres métodos de detección de residuos de sulfitos ( $\text{SO}_2$ -) en función al tiempo de almacenamiento; II) determinación de residuos de sulfitos a diferentes tiempos de destilación con el método Monier-Williams; y III) determinación del grado de desarrollo de melanosis en los camarones durante ocho semanas de almacenamiento.

### 2.3.1 Comparación de tres métodos de detección de residuos de sulfitos ( $\text{SO}_2$ -) en función al tiempo de almacenamiento

Se comparó los residuos de sulfitos detectados con los métodos de las cintas colorimétricas, la iodometría (IM) y Monier-Williams (M-W) (Anexos 3 y 4) en muestras de camarón tratados con 0.5% y 1% MBS. Se realizaron cuatro repeticiones por cada método de detección de sulfitos y se evaluaron los residuos a las semanas 1, 6 y 8, post-tratamiento.

Se evaluaron diez camarones para cada réplica y por cada tratamiento de MBS. Con el método de cintas colorimétricas se realizó la evaluación de residuos de sulfitos en las branquias del animal (Anexo 3). La detección de sulfitos con este método es basado en una escala presuntiva de concentraciones de sulfitos de 0, 10, 40, 80, 180 y 400 ppm (Figura 1)

Se utilizaron 50g de muestra para cada detección de sulfitos con el método iodometría. Este método consiste en el macerado del camarón con MBS, al que se aplica agua destilada y se deja reposar por 10 minutos, con la finalidad de liberar del tejido los sulfitos retenidos en el tejido del camarón. De la mezcla de agua destilada y tejido, se extraen 10ml a los que se adiciona ácido clorhídrico, solución de almidón y yodo (63N). La solución de yodo se aplica hasta obtener un color azul oscuro en la solución. El ácido clorhídrico hace disponible los sulfitos para que reaccionen con el yodo (GGMSA, 2001b).

La cantidad de yodo consumida depende de la cantidad de residuos de sulfitos. Al consumirse los sulfitos, el yodo reacciona con el almidón generando la coloración azul, que indica el final de la titulación (GGMSA, 2001).



Figura 1. Escala de concentración de sulfitos en cintas colorimétricas.

Para cada análisis de M-W se utilizaron 50g de camarón tratado con MBS. El método M-W consiste en una destilación del tejido del camarón para liberar los sulfitos del tejido. Luego se titula la muestra con NaOH para determinar la concentración de sulfitos (ppm). La muestra de camarón es introducida en un balón separador adicionando agua destilada, ácido clorhídrico, y alcohol etílico para desnaturalizar el tejido y liberar los sulfitos. Durante este proceso es calentada a 100°C durante 125 minutos, de los cuales aproximadamente 20 minutos corresponden al tiempo que demora llegar a la ebullición, y 105 minutos que es el tiempo recomendado del método para captar sulfitos, una vez iniciado la ebullición. Este proceso se desarrolla en un ambiente libre de oxígeno, sustituyéndolo por nitrógeno puro para evitar que los sulfitos liberados reaccionen con el oxígeno y no sean detectados.

Los sulfitos libres son conducidos del balón separador hasta la trampa de sulfitos donde son capturados. La trampa de sulfitos contiene el reactivo rojo de metilo, agua destilada, hidróxido de sodio, y ácido clorhídrico. Cuando hay sulfitos, la solución de la trampa adquiere un color rosado (Food and Drug Administration, 1987).

Después de 105 minutos de ebullición de la muestra, se retira el líquido de la trampa de sulfitos, y se titula con el hidróxido de sodio. La cantidad de hidróxido de sodio consumido durante la titulación es utilizada para determinar la concentración de sulfitos (ppm) a través de la fórmula:

$$\text{ppm de SO}_2^- = 32.03 \times V1 \times N \times 1000 / Wt$$

Donde:

32.03 = mili equivalentes del peso del dióxido de azufre

V1 = volumen de hidróxido de sodio titulante de 0.01 N

N = 0.01, que es la normalidad del NaOH

1000 = factor de conversión de mili equivalentes a micro equivalentes

Wt = peso en gramos de la muestra de camarón que fue introducido dentro del balón.

### **2.3.2 Determinación de residuos de sulfitos a diferentes tiempos de destilación con el método Monier-Williams**

Se determinó la cantidad de residuos de sulfitos detectados con diferentes tiempos de destilación (35, 70, 90, 105 minutos) utilizando el método de Monier-Williams. Hubo cuatro repeticiones para cada tiempo de destilado y cada muestra de camarón tratado con MBS. Cada muestra de camarón consistió en tejido abdominal (cola) cortado en varios pedazos, con peso total de 50 g.

### **2.3.3 Grados de desarrollo de melanosis**

Se evaluó el desarrollo de la melanosis en camarones tratados con 0.5% y 1.0% de MBS y camarones testigos, almacenados a -18°C a la primera, sexta y octava semanas post-tratamiento.

En cada evaluación se observaron 100 camarones por tratamiento de MBS a través de la escala de melanosis en 0 a 10 grados desarrollada por Otwell y Marshall (1986) (cuadro 1).

cuadro 1. Escala de desarrollo de melanosis de Otwell y Marshall

Grado de Melanosis	Grado	Aceptabilidad
0		
2	1	Producto aceptable
4		
6	2	Producto devaluado
8		
10	3	Producto no aceptable

Los grados de melanosis se clasifican en:

- 0 Melanosis ausente.
- 2 Melanosis suave en rostrum y urópodos.
- 4 Melanosis suave en rostrum, uropódos, cefalotórax y periópodos.
- 6 Melanosis moderada en rostrum, uropódos, cefalotórax, periópodos y pleópodos.
- 8 Melanosis severa en rostrum, uropódos, cefalotórax, periópodos y pleópodos.
- 10 Melanosis severa y pronunciada en el cefalotórax y abdomen, con apéndices arrugados.

## 2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADISTICO

Para la comparación de los tres métodos de detección de sulfitos se utilizó el modelo de medidas repetidas en el tiempo. El análisis de los resultados se hizo con la prueba de medias LSMeans. Se hizo una correlación entre los sulfitos detectados con los métodos de IM y M-W. En los sulfitos detectados a diferentes tiempos de destilado con el método M-W se utilizó el modelo medidas repetidas en el tiempo y coeficiente de regresión cuadrático. Se analizó la incidencia de melanosis en camarones de cada grupo tratado y los testigos. Los resultados fueron analizados por medidas repetidas en el tiempo y la prueba de medias LSMeans (SAS®, 1999).

### **3. RESULTADOS Y DISCUSION**

#### **3.1 COMPARACION DE TRES METODOS DE DETECCION DE RESIDUOS DE SULFITOS (SO<sub>2</sub>) EN CAMARONES TRADOS CON MBS**

Se compararon los métodos de Monier-Williams (M-W), iodometría (IM) y de las cintas colorimétricas, para determinar la concentración de sulfitos en camarones tratados con 0.5 y 1.0% de MBS (Cuadro 2). En general se detectaron concentraciones superiores en 67% de sulfitos en los camarones tratados con 1.0% de MBS que en los camarones tratados con 0.5% (P <0.001). Con la metodología de las cintas colorimétricas, no hubo variación en los resultados. Esta metodología no proporciona una precisión adecuada para detectar sulfitos en muestras de camarón.

En promedio la detección de sulfitos con el método de IM fue de 22.9 y 58.0% del valor obtenido con el método M-W en los camarones tratados con 0.5% y 1.0% de MBS, respectivamente (Figura 2). Alvarez (2000) encontró que el método M-W resulta en la detección de 58% más de sulfitos en camarón que el método de IM. En este trabajo, los resultados obtenidos con los métodos IM y M-W coinciden más en el análisis de camarones tratados con 0.5% de MSB. Con ambos tratamientos de MBS la detección de sulfitos en los camarones con el método de IM fue inferior a las 100 ppm.

En doce muestras de camarones tratados con 0.5% de MBS, el método de IM detectó una concentración de sulfitos que oscilaba entre 7.2 a 39.7% de la cantidad detectada con el método de M-W (Figura 2). Los métodos de IM y M-W son aceptados oficialmente por la "Food and Drug Administration" (FDA) de los EE UU.

En camarones enteros congelados a -18°C durante seis semanas, la concentración de sulfitos disminuye hasta un 20.5% del total original, (Alvarez, 2000). No se detectó una disminución en la concentración de sulfitos en las muestras de camarón tratados con 0.5 y 1.0% de MBS y analizadas con el método de IM (Cuadro 3).

El análisis con el método M-W con los camarones tratados con 1.0% MBS indicó un incremento en la cantidad de sulfitos entre la primera y sexta semana de almacenamiento (Cuadro 3). Luego la concentración de sulfitos en esta muestra se redujo a las ocho semanas de almacenamiento.

En general, al final de las ocho semanas de almacenamiento a -18°C los camarones tratados con 0.5% MBS cumplían con las exigencias de residuos de sulfitos de los mercados europeo y norteamericano mientras que los camarones tratados con 1% MBS sobrepasaron los niveles de sulfitos permitidos.

Los resultados de los análisis de sulfitos con IM se mantuvieron constantes por ser un método poco sensible (Alvarez, 2000). Con el método de M-W se presentó mayor variación de los resultados debido a la sensibilidad del método para detectar sulfitos y la posible variación de la capacidad de absorción de MBS entre los camarones.

Cuadro 2. Residuos de sulfitos (SO<sub>2</sub>-) determinado con los métodos de las cintas colorimétricas, iodometría (IM) y Monier-Williams (M-W) en camarones enteros tratados con dos soluciones de MBS después de ocho semanas de almacenamiento a -18<sup>0</sup>C (ppm).

Tratamiento	Método de detección	ppm	C.V. (%)
0.5%	Cintas	400 a	0
	M-W	93.2 b	17.2
	Iodometría	13.5 c	40.8
1.0%	Cintas	400 a	0
	M-W	215.2 b	17.4
	Iodometría	16.3 c	30.7

\* Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes.

Cuadro 3. Concentración de residuos de sulfitos determinada con los métodos cintas colorimétricas, iodometría y Monier-Williams (M-W), en camarón tratado con dos concentraciones de MBS (ppm).

Tratamiento	Semanas almacenamiento	Método de análisis		
		Cintas*	M-W*	Iodometría
0.5%	1	400 a	93.5 c	13 e
	6	180 b	88.3 c	18 d
	8	180 b	34.3 d	10 e
1%	1	400 a	215.3 b	16 c
	6	180 b	265.7 b	18 c
	8	180 b	180.3 b	9 c

\* Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes.

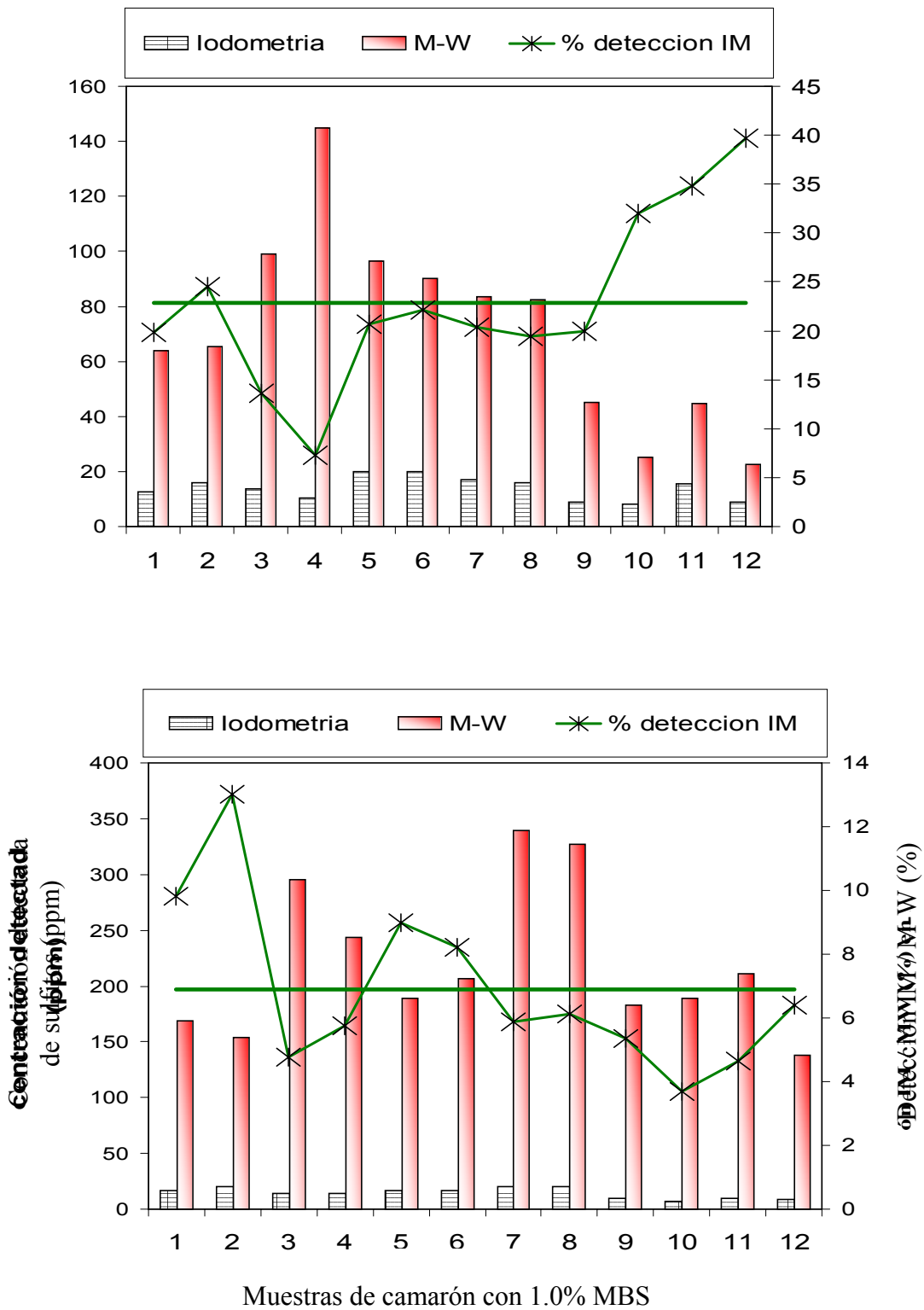


Figura 2. Comparación de los métodos iodometría y Monier-Williams para detectar sulfitos en tejido de camarón en concentraciones de 0.5 y 1% de MBS. Se incluye el porcentaje de

sulfitos detectados por IM en comparación con los sulfitos determinados con M-W, y asumiendo que los sulfitos detectados por M-W corresponden al 100%

### 3.2 DETERMINACION DE RESIDUOS DE SULFITOS A DIFERENTES TIEMPOS DE DESTILACION CON EL METODO MONIER-WILLIAMS

En las 24 muestras de camarón analizadas con el método M-W se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) para cada tiempo de destilado (Figura 3). La menor cantidad de sulfitos fue detectada a los 35 minutos de destilado. Esta cantidad correspondió en promedio al 66.6% del total de sulfitos capturados con a los 105 minutos, para camarones tratados con ambas concentraciones de MBS.

Las cantidades de sulfitos detectadas aumentaron en los demás tiempos de destilado. En promedio para los dos tratamientos con MBS, la cantidad adicional de sulfito detectada fue de 23.4% a los 70 minutos, 8.1% a los 90 minutos, y 4.4% a los 105 minutos (Figura 2). El procedimiento de M-W indica un tiempo de destilado de 105 minutos (FDA, 1987).

Con un mayor tiempo de destilado, se observó menor variación en los resultados del análisis de sulfitos en las muestras (Cuadro 4 y Figura 3). Las correlaciones entre la cantidad de sulfitos detectadas y los varios tiempos de destilado en el método M-W fueron altamente significativas (Figura 3 y anexo 4).

Con 90 minutos de destilado se obtuvo en promedio 98% de los sulfitos. Este resultado sugiere que se debe estudiar más de la posibilidad de disminuir el tiempo de destilado para lograr una mayor eficiencia en la realización de los análisis. El procesar cada muestra de camarón en menos tiempo implicaría una mayor eficiencia y ahorros para la industria (Escobar, 2002)<sup>1</sup>.

Cuadro 4. Detección de residuos y el porcentaje de captación de SO<sub>2</sub> (ppm) a diferentes tiempos de destilado con el método Monier-Williams.

Tiempo destilado	0.5% MBS		1.0% MBS	
	ppm SO <sub>2</sub>	% Captación	ppm SO <sub>2</sub>	% Captación
35	47.3	65.8	148.5	67.4
70	16.0	88.1	54.0	91.9
90	6.8	97.5	15.2	98.8
105	1.8	100.0	2.6	100.0

<sup>1</sup>Lic. Ismael Escobar, Julio de 2002, comunicación personal.

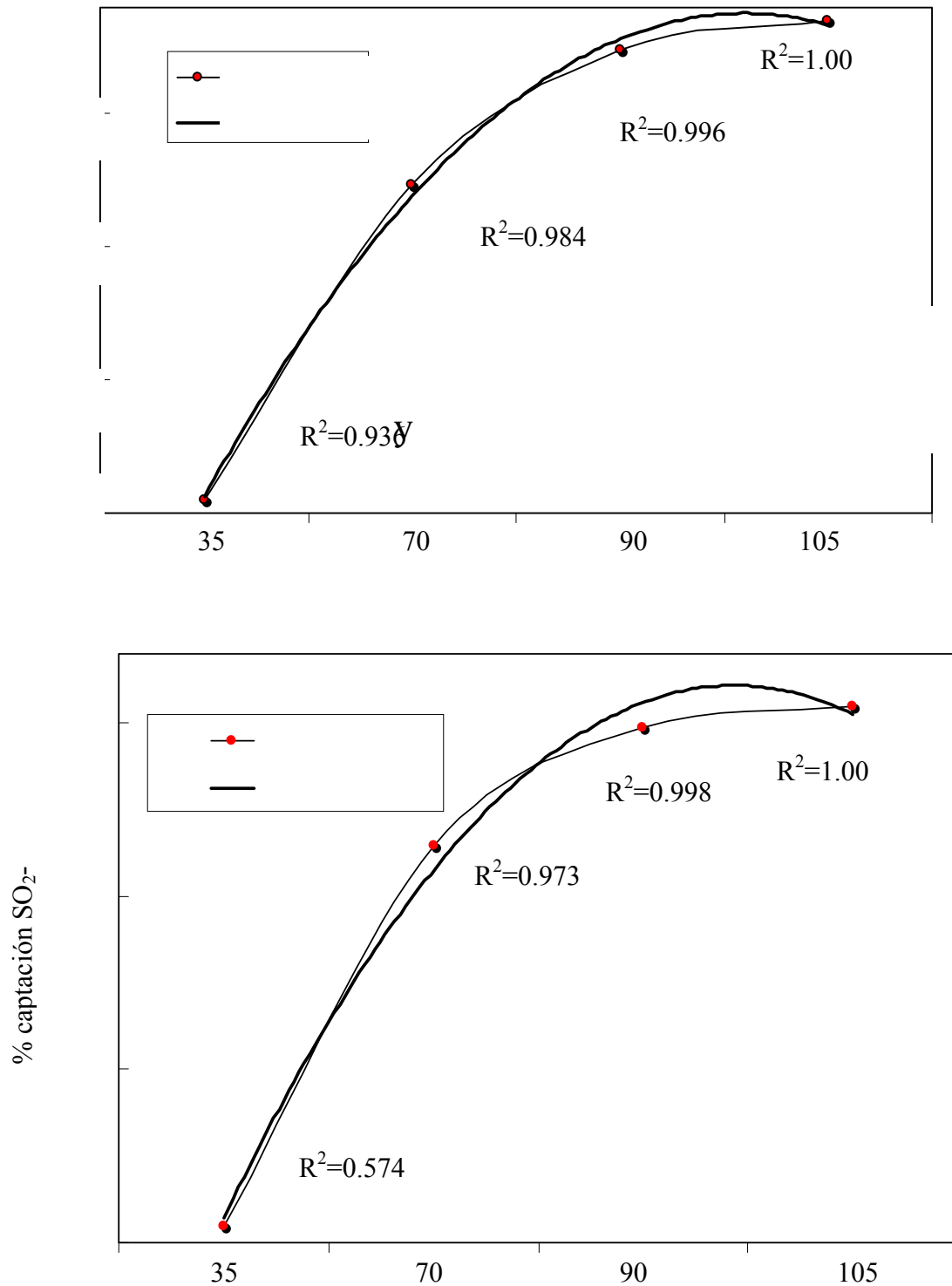


Figura 3. Porcentaje de captación de sulfitos con el método M-W en cuatro tiempos de destilado (35, 70, 90 y 105 minutos) en camarones tratados con 0.5 y 1% MBS. Se incluye

el coeficiente de regresión para cada tiempo de destilado a los 35, 70, 90 y 105 minutos de destilado.

### 3.3 GRADOS DE DESARROLLO DE MELANOSIS

La presencia de melanosis en el camarón es fuertemente castigada en el mercado europeo. Los camarones no tratados con MBS desarrollaron un grado mayor de melanosis que los tratados (Figura 4) y no son aceptados para el mercado europeo (Ward, 1996).

Los tratamientos de MBS redujeron significativamente la melanosis en camarones almacenados a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante ocho semanas post-tratamiento. Los camarones tratados con 1.0% de MBS presentaron un control efectivo sobre la melanosis ( $P < 0.04$ ), pero superaron los niveles de sulfitos permitidos en los mercados europeo y norteamericano.

Los camarones tratados con 0.5% de MBS cumplían con las exigencias de estos mercados en cuanto a residuos de sulfitos, aunque presentaron un mayor nivel ( $P < 0.04$ ) de melanosis a las ocho semanas de almacenamiento (Figura 4) que los tratados con 1.0% de MBS, y que es suficiente para afectar negativamente su valor en el mercado meta.

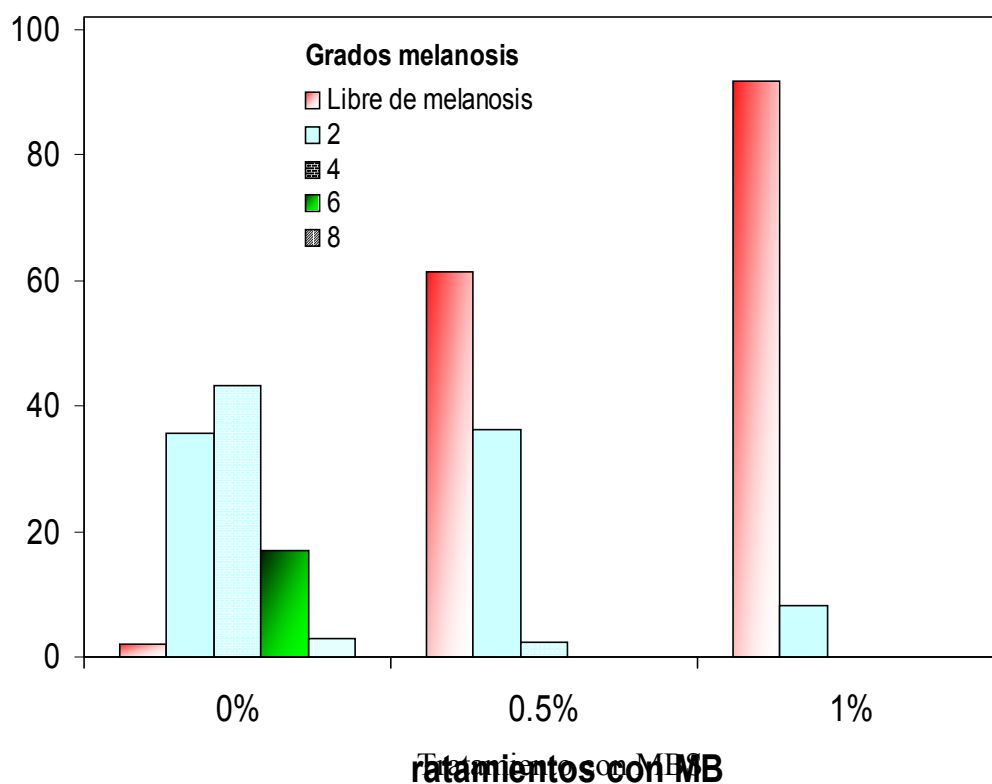


Figura 4. Desarrollo de melanosis en camarones tratados con MBS después de ocho semanas de almacenamiento a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

## **4. CONCLUSIONES**

El método Monier-Williams fue más preciso para la detección de sulfitos que los métodos de iodometría y de las cintas colorimétrica.

El método de cintas colorimétricas no mostró precisión para detectar residuos de sulfitos.

En el método Monier Williams con 90 minutos de destilado fue posible detectar el 98% de los sulfitos detectados a los 105 minutos ( $R^2=0.99$ ).

A lo largo de ocho semanas de almacenamiento a  $-18^{\circ}\text{C}$  disminuyó la concentración de sulfitos.

Los camarones no tratados con MBS desarrollaron un grado mayor de melanosis que los tratados.

Los camarones tratados con 1% MBS no desarrollaron melanosis, pero superan los niveles de sulfitos permitidos en los mercados europeo y norteamericano.

Los camarones tratados con 0.5% MBS cumplieron con las exigencias del mercado en cuanto al nivel de sulfitos, pero desarrollan melanosis, aunque a niveles aceptables.

## **5. RECOMENDACIONES**

Investigar otros métodos de detección de sulfitos más rápidos e igualmente precisos que el método Monier-Williams.

Continuar investigando el tiempo de destilado en el método M-W para buscar una mayor eficiencia.

Realizar mas experimentos para determinar la concentración de MBS apropiada para minimizar los daños por melanosis y cumplir con los niveles de sulfitos exigidos por los mercados europeo y norteamericano.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

ALVAREZ, M. 2000. Evaluación de tres metodologías de tratamiento con metabisulfito de sodio en camarones enteros para prevenir melanosis. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 29 p.

BANCO CENTRAL DE HONDURAS. 2001. Honduras en cifras. Edit. Guaymuras. Tegucigalpa, Honduras. 10 p.

BON, A. 1994. Comparative trial metabisulfite on ever fresh. Provisional report. Fincacua. Guayaquil, Ecuador. 7 p.

FERRER, O.J. 1991. Aislamiento y caracterización de la fenoloxidasa del camarón blanco (*Penaeus setiferus*) y la langosta espinosa (*Panulirus argus*). Accesado el 17 de julio de 2002. Disponible en <http://redpax-fpolar-info.vel/fagroluz/v8-2>

FOOD MARKETING INSTITUTE. 2002. Sulfites (en línea). EEUU. Accesado el 20 de febrero de 2002. Disponible en <http://www.fmi.org/media/bg/sulfites.htm>

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 1987. Method Monier-Williams. *In* pesticide analytical manual. USA. 4 p.

GGMSA. 2001a. Protocolo para cosecha de camarón entero. Choluteca, Honduras. 5p.

GGMSA. 2001b. Procedimiento de método para detectar sulfitos con iodometría. Choluteca, Honduras. 4 p.

HISPANO QUÍMICA S.A. 1987. Manual informativo de bacterol f. Barcelona, España. 11 p.

LOPEZ, F. 1990. La melanosis del camarón: ¿Tendremos que olvidar el bisulfito? *Alimentaria (España)* 90(47):47-52.

MCEVILY, A.; IYENGAR, R.; OTWELL, S. 1991. Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. *Food Technology (USA)*:80-82.

OTWELL, S.; MARSHALL, E. 1986. Scale and rate the occurrence of melanosis on shrimp. *Food Techonology (USA)*:73-79.

PARSULFITE CHEMICAL COMPANY. 2002. Sulfites (en línea). EEUU. Accesado el 8 de marzo de 2002. Disponible en <http://www.parsulfite.com/7681574g0.asp>

RIVAS, N. 1997. Purificación parcial y caracterización cinética de la polifenol oxidasa del cambur manzano (en línea). Accesado el 23 de febrero de 2002. Disponible en <http://www.livingwithout.com/note.htm>

SAS Institute. 1999. SAS® user guide: Static version 8.0. Edition. SAS Institute Inc., Carry, N.Y.

SAMPSOM, M. 1997. Comparación físico-químico del agua de dos esteros del sur de Honduras en época seca. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 20 p.

SLATTERY, L.; WILLIAMS, D.J.; DEETH, H.C. 1992. How to use sodium metabisulphite to prevent black spot on prawns. Fishing Industry. Queensland, Australia. 13 p.

VILLALON, R. 1994. Manual práctico para la producción comercial semi-intensiva de camarón marino. Texas A&M University. Bryan Texas, U.S.A. 122 p.

WARD, D. 1996. Seafood haccp training manual. National Seafood HACCP Alliance for Training and Education. North Carolina. 675 p.

## ANEXOS

### Anexo 1. **Categorías de textura para cosecha de camarón entero**

**Muda (M):** Exoesqueleto del camarón totalmente suave, es palpable el tejido interno en la cola y la cabeza.

**Blando 3 (B3):** Tiene 3 o más segmentos abdominales suaves, es lo más cercano a muda.

**Blando 2 (B2):** 2 segmentos abdominales suaves.

**Blando 1 (B1):** Exoesqueleto mas sólido que otras características, pero tiene el primer segmento abdominal suave.

**Duro (D):** Exoesqueleto completamente sólido y con cierta capacidad de flexión.

### Anexo 2. **Procedimiento para la detección de residuos de sulfitos del metodo Monier - Willians**

Es el método estándar de laboratorio para la detección de residuos de sulfitos M-W basado en un proceso de destilación, aceptado por la "Food and Drug Administration" FDA de USA.

Reactivos:

Ácido clorhídrico 4N

Indicador de rojo de metilo

Peróxido de hidrógeno 3%

Titulante estandarizado de Na(OH) (0.01N)

Gas nitrógeno de alta pureza

Trampa de pyrogallol

Hidróxido de potasio (KOH)

Preparación de los reactivos:

\*Acido clorhídrico (4N): Para cada análisis preparar 90 ml de ácido clorhídrico agregando 30 ml de ácido concentrado (12N) en 60 ml de agua destilada.

\*Indicador rojo de metilo: Disolver 250 mg de rojo de metilo en 10 ml de etanol si el rojo de metilo es en polvo (si es liquido no disolver), mantenga fuera de la luz.

\*Peróxido de hidrogeno 3%: Diluir reactivo ACS 30% de peróxido de hidrogeno al 3% con agua destilada.(100 ml de peróxido de hidrogeno en 900 ml de agua destilada, considerando que solo se utilizan 30 ml por análisis queda preparada la solución para

varias pruebas)

\*Titulante estandarizado Na(OH) 0.01N: El titulante se obtiene de la mezcla de 0.4 gr de Na(OH) (pelets) con un litro de agua destilada, sellar bien el recipiente de Na(OH) por ser altamente higroscópico.

\*Gas nitrógeno: Una fuente de alta pureza (99.9%) es requerida y esta debe ser aplicada utilizando un regulador de flujo que lo mantendrá en 200 cc/min (90 burbujas/minuto)

-NOTA: Una vez preparados todos los reactivos y la trampa de pyrogallol comenzar con el paso 1 del protocolo M-W.

\* Preparación de la trampa de pyrogallol:

1. Agregar 4.5 g de pyrogallol en un erlen meyer de 1000 ml y purgar durante 3 minutos con gas nitrógeno para evacuar el oxígeno y crear una atmósfera de nitrógeno en el erlen meyer.
2. Preparar una solución con 85 ml de agua destilada y 65 g de KOH, agregar al erlen meyer después de haber sido purgado con gas nitrógeno.

Equipo:

La cristalería y equipo

Manta de calor

Balón separador

Embudo

Válvula de entrada

Conectores

Condensador

Mangueras

Probeta o trampa de sulfitos

Trampa de pyrogallol

Fuente de enfriamiento

Bureta

Cilindro de gas nitrógeno

El método M-W involucra 16 pasos para la determinación de la presencia de sulfitos en una muestra:

1. Revisar y ensamblar el aparato agregando una película de vaselina a cada una de las uniones.
2. El balón separador debe estar posesionado sobre la manta de calor.
3. Agregar 400 ml de agua destilada en el balón y cerrar la llave de paso del embudo. Agregar 90 ml de ácido clorhídrico (4N) al embudo. Comenzarse el flujo de gas nitrógeno a una tasa de 200 cc/min (90 burbujas en la probeta o trampa).
4. Agregar 30 ml de peróxido de hidrogeno al 3% a la trampa, el cual ha sido titulado con 3 gotitas de NaOH al 0.01 N hasta llegar a un punto amarillo claro.
5. Después de 15 minutos de estar funcionando el aparato, el agua destilada estará libre de oxígeno, el aparato está listo para introducir la muestra.
6. Preparar una muestra de 50 g de cola de camarón con exoesqueleto, partido en tres pedazos cada camarón.
7. Preparar una solución de 100 ml de etanol al 5% en un beaker de 250 ml.
8. Remover el embudo y transferir la muestra al balón.

9. Limpiar el orificio de entrada de la muestra, el flujo de nitrógeno a través de la solución de peróxido de hidrogeno debe ser reiniciado tan pronto como el embudo sea reinsertado.
10. Examinar cada unión para asegurarse que este bien sellado el equipo.
11. Presionar con ayuda de un bulbo equipado con válvula, a la solución de ácido clorhídrico que se encuentra en el embudo.
12. Abrir la válvula del embudo y permitir que el ácido fluya dentro del balón aplicando presión para facilitar el procedimiento. Antes de que halla evacuado todo el ácido del embudo hacia el balón se debe cerrar la llave de paso para evitar la salida del dióxido de azufre hacia el embudo.
13. Aplicar calor sobre la manta (en el nivel 5.3/10) utilizando un poder regulador que cause 80 a 90 gotas por minuto de condensado al retorno del frasco condensador.
14. Después de 105 minutos de hervor del contenido del balón, retirar la trampa.
15. Titular el contenido con NaOH a 0.01 N hasta alcanzar un color amarillo que persista por más de 20 segundos.
16. Determinar la cantidad de sulfitos en la muestra mediante la siguiente formula:

$$\text{ppm de SO}_2^- = 32.03 \times V1 \times N \times 1000 / Wt$$

Donde:

32.03 = mili equivalentes del peso del dióxido de azufre

V1 = volumen de hidróxido de sodio titulante de 0.01 N

N = 0.01, que es la normalidad del NaOH

1000 = factor de conversión de mili equivalentes a micro equivalentes

Wt = peso en gramos de la muestra de camarón que fue introducido dentro del balón.

### Puntos Críticos en el desarrollo de la prueba

#### 1 Trampa de pyrogallol

La fuente de gas nitrógeno debe ser de 99.9% de pureza, debido a que si hay contaminación de oxígeno no se capturan los sulfitos reales.

Al agregar la solución de KOH a los 4.5 gramos que se están purgando durante 3 minutos en el erlen meyer debe tornarse transparente y no negro o verde. Cada trampa de pyrogallol puede desarrollar hasta un máximo de ocho pruebas y luego volverse a preparar. A medida se realicen las pruebas la trampa tomara un color oscuro.

2 Condensado A los 30 minutos de desarrollo de la prueba, con el condensado deben alcanzarse 90 gotas del condensador que caen al interior del balón separador. Estas 90 gotas son reguladas mediante la temperatura de la manta de calor, el flujo de gas nitrógeno y agua a temperatura de 0 a 5 °C.

3 Reactivo certificado grado ACS. Use una pipeta para cada reactivo y no los reutilice.

### **Anexo 3. Procedimiento para la detección de sulfitos de los métodos de Iodometria y cintas colorimétricas**

Cintas: utilizado en la cosecha para camarón entero, proporciona resultados rápidos que determinan la concentración de sulfitos a partir del color que se observa en la cinta cuando esta se introduce en las branquias del camarón ha sido tratado con MBS. Para determinar la concentración de sulfitos se compara el color con un patrón que se clasifica en

concentraciones de 0, 10, 40, 100, 200 y 400 ppm. El color de las cintas se manifiesta al absorber la humedad del tejido del camarón, adquiriendo una coloración rosa cuando existe presencia de metabisulfito.

Iodometría: procedimiento de laboratorio y consiste en los siguientes pasos:

1. Obtener una muestra de 50 a 60 gramos de camarón tratado con MBS, es preferible que la muestra sea del tejido de la cola y sin el exoesqueleto.
2. Macerar durante 10 minutos en un beaker con 100 ml de agua destilada y tapar con papel aluminio para agitar intermitentemente la mezcla, dejar reposar durante 10 minutos. Esto es con la finalidad de obtener una solución acuosa disponible de sulfitos que están retenidos en el tejido.
3. Obtener 10 ml de la mezcla y vaciar en un beaker de 250 ml, a esto se adicionan 1.4 ml de ácido clorhídrico y 1 ml de almidón al 1%
4. Se titula la solución anterior con yodo 63N hasta obtener un cambio de color azul que se mantiene durante 20 segundos, lo cual indica el final de la valorización.
5. Se anota el yodo que se ha consumido para lograr la titulación y se utiliza la siguiente fórmula para determinar la concentración de sulfitos

$$\frac{\text{Consumo de yodo} * 0.5 * 100 * 1000}{\text{Peso gramos de muestra} * 100} = \text{ppm SO}_2$$

Esto se fundamenta en que el ácido clorhídrico hace disponible el azufre, haciendo que el yodo reaccione con el azufre libre en la solución, al consumirse todo el azufre disponible, el yodo reacciona con el almidón generando una coloración azul, el cual indica el final de la titulación.

**Reactivos:**

Yoduro de yodato 63N

Solución de almidón al 1%

Solución de ácido clorhídrico 1N

Bureta 25 ml

Beaker 250 ml

Probeta 100 ml

Agua destilada

Pipetas 5, 10, 1 ml

Anexo 4. Regresión y correlación en camarones tratados con 0.5% y 1.0% de MBS entre los minutos de destilado de 35, 70, 90 y 105 minutos en el método M-W.

Trat.	Tiempo destilado	Correlación	R <sup>2</sup>	C.V.	Ecuación cuadrática		
					Intercepto	bx	bx <sup>2</sup>
0.5%	35	-0.919	0.936	12.22	5.168	1.532	-0.002
	70	-0.963	0.984	6.0	-2.722	1.292	-0.0015
	90	-0.965	0.996	2.99	-1.043	1.058	-0.0002
1%	35	-0.807	0.574	19.88	-469.797	7.506	-0.0185
	70	-0.994	0.973	4.97	-55.707	1.644	-0.0013
	90	-0.993	0.998	1.0	-16.442	1.173	-0.0003