



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MEXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS



“Influencia de un recubrimiento comestible adicionado con antioxidantes sobre las características post-mortem en filetes de carpa común (*Cyprinus carpio*) almacenado a bajas temperaturas”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

P r e s e n t a

M. en C.Q. Ana Gabriela Morachis Valdez

TUTOR ACADÉMICO

Dr Octavio Dublán García

Dr Leobardo Manuel Gómez Oliván

Dra. Imelda García Argueta

Noviembre, 2017. Toluca, Estado de México

CONTENIDO

CONTENIDO	2
INDICE DE TABLAS.....	4
INDICE DE FIGURAS.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
1 ANTECEDENTES.....	7
1.1 Calidad del pescado	7
1.2 Oxidación lipídica y proteínica.....	7
1.3 Conservación de alimentos.....	9
1.3.1 Recubrimientos Comestibles	9
1.4 Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>).....	12
2 JUSTIFICACIÓN	13
3 HIPÓTESIS.....	14
4 OBJETIVOS.....	15
4.1 Objetivo General.....	15
4.2 Objetivos Específicos	15
5 METODOLOGIA	16
5.1 Colecta y mantenimiento de la muestra	16
5.1.1 Preparación de soluciones de recubrimiento	16
5.2 Análisis fisicoquímicos	17
5.3 Análisis bioquímicos.....	19
5.4 Análisis estructurales.....	19
5.5 Análisis Nutricional	20
5.6 Análisis microbiológico	20
5.7 Capacidad Antioxidante.....	22
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1 CONGELACIÓN	24
6.1.1 Cambios fisicoquímicos.....	24
6.1.2 Cambios Microbiológicos.....	27
6.1.3 Cambios por oxidación	28
6.1.3.3 Cambios nutrimentales	30

6.1.4	Cambios estructurales	33
6.2	Refrigeración.....	35
6.2.1	Cambios microbiológicos	35
6.2.2	Cambios Físicoquímicos	38
6.2.3	Capacidad Antioxidante	40
6.2.4	Oxidación de lípidos y proteínas.....	40
6.2.5	Cambios estructurales	42
7	CONCLUSIONES.....	43
8	REFERENCIAS	44
9	Anexos	53
9.1	Anexo 1. Curva patrón de sero-albúmina.....	53
9.2	Anexo 2. Curva patrón para determinación de polifenoles con ácido gálico	53
9.3	Anexo 3. Productos de Investigación.....	54
9.3.1	Artículo publicado.....	54
9.3.2	Artículo enviado.....	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Perfil de aminoácidos de proteína de filete de carpa común fresca, filete de carpa almacenado en congelación por 5 meses y filete de carpa con recubrimiento almacenado en congelación por 5 meses.....	32
Tabla 2. Índice de aminoácido limitante (%).	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variación del contenido de humedad durante el almacenamiento de filetes de carpa común a -18°C.....	24
Figura 2. Variación del contenido pH durante el almacenamiento de filetes de carpa común a -18°C.....	25
Figura 3. Variación del contenido de Bases Volátiles Totales de Nitrógeno (BVT-N) durante el almacenamiento de filetes de carpa común a -18°C.....	26
Figura 4. Variación de mesófilos aerobios durante el almacenamiento de filetes de carpa común a -18°C	27
Figura 5. Variación de los productos de oxidación lipídica durante el almacenamiento de filetes de carpa común a -18°C.....	28
Figura 6. Variación de los productos de oxidación proteínica durante el almacenamiento de filetes de carpa común a -18°C.....	30
Figura 7. Electroforesis de carpa común almacenada a -18°C.....	34
Figura 8. Efecto de la actividad antimicrobiana de los diferentes recubrimientos sobre diferentes cepas ...	35
Figura 9. Cambios en las características microbiológicas en filete de carpa común, durante el almacenamiento en refrigeración a 4°C.por nueve días.....	37
Figura 10. Cambios en las propiedades fisicoquímicas del filete durante el almacenamiento, valores de filetes de carpa común almacenada a 4°C durante 9 días	39
Figura 11. Cambios en los productos de oxidación lipídica y proteínica del filete de carpa común durante el almacenamiento, valores de filetes de carpa común almacenada a 4°C durante 9 días.....	41
Figura 12. Electroforesis de carpa común almacenada a 4°C. Control, (C + RC) Carpa con recubrimiento base.....	42

RESUMEN

El pescado es una fuente importante de proteína de alta calidad y de fácil digestión, cuenta con aminoácidos esenciales (lisina, metionina, cistina, treonina y triptófano), además de ácidos grasos insaturados que pueden tener un efecto hipocolesterolémico. El contenido de grasa, puede presentar consecuencias tecnológicas post-mortem, debido a las reacciones de oxidación, repercutiendo en las características sensoriales, tales como color y olor. Las proteínas son también susceptibles a estas debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) generadas durante la crianza, procesamiento y almacenamiento, así como por la actividad microbiana y enzimática propias del pescado. Se ha observado una correlación importante entre la oxidación proteínica y la textura, siendo ésta un factor determinante para la aceptación por parte del consumidor. Es posible reducir los efectos de la oxidación durante el almacenamiento, mediante la combinación de técnicas de conservación como el control de temperaturas, disminuyendo las reacciones de degradación por acción enzimática y microbiológica, además del empleo de recubrimientos comestibles (RC); los cuales mantienen la humedad en los tejidos y disminuyen la transferencia de oxígeno; pueden ser vehículos de diversos compuestos, como antioxidantes y/o antimicrobianos, formando un material de empaque bioactivo.

Dentro de los productos cárnicos empleados para el uso de estas tecnologías de conservación se encuentran las especies acuícolas, especialmente aquellas de importancia económica como lo es la carpa común (*Cyprinus carpio*). El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de un RC adicionado con antioxidantes en filete de *Cyprinus carpio*, evaluando las características bioquímicas, fisicoquímicas, texturales, microbiológicas y nutrimentales durante su vida útil permitida para su consumo.

Encontrándose una prolongación durante el almacenamiento, a temperaturas de congelación de las características fisicoquímicas y nutrimentales, presentando un efecto protector en lisina, al final de 5 meses de almacenamiento, mientras que las especies con RC en los tratamientos en refrigeración presentan cargas microbianas menores, así como disminución de los productos de oxidación, comparado con aquellos en los que no se emplearon RC.

ABSTRACT

Fish is known to be a source of high quality and easy digestion protein, rich in essential amino acids (lysine, methionine, cystine, threonine, and tryptophan), as well as unsaturated fatty acids that, amongst other benefits have a hypocholesterolemic effect. Fat content, may present post-mortem technological consequences, due to oxidation reactions, rebounding on sensory characteristics such as color and odor. Proteins are also sensitive due to oxygen reactive substances (ROS) produced during breeding, processing and storage, as well as microbiology and enzymatic activity inherent to fish. An important correlation has been observed between protein oxidation and texture, being this last a determinant factor for consumer acceptance. Reduce oxidation effects during storage is possible by combining preservation techniques as temperature control which diminish enzymatic and microbiology degradation reactions, and by applying edible coatings (EC); maintaining moisture in tissues and decrease oxygen transfer, may also be used as vehicle for antioxidants and/ or antimicrobial compound, forming an bioactive packaging material.

These preservation techniques may be used with meat products, such as aquatic species, especially those with an economical importance as common carp. The aim of this study was to determine the influence of an EC antioxidant added, on *Cyprinus carpio* fillets, evaluating bioquematical, physicochemical, textural, microbiological and nutritional characteristics periodically during its storage. Results have shown that EC allows retention of the physicochemical and nutritional characteristics of the common carp for more time during storage, presenting a protective effect in lysine at the end of a five months frozen period, additionally microbiological growth and oxidation products were decreased in fillets with EC during refrigeration compared to those storage without EC.

1 ANTECEDENTES

1.1 Calidad del pescado

El pescado es considerado como un alimento de alta calidad nutrimental, es una fuente importante de proteína de alto valor biológico, siendo esta de fácil digestión, caracterizada por su aporte de aminoácidos esenciales (lisina, metionina, cistina, treonina y triptófano); el contenido total proteico varía de acuerdo con la especie, sin embargo, se puede considerar un intervalo del 18 al 20%, contiene a su vez micro elementos tales como calcio, fosforo, flúor y yodo, grasas que son fuente de energía, vitaminas liposolubles y ácidos grasos insaturados que entre otros beneficios se encuentran el tener un efecto hipocolesterolémico (Usydus et al., 2009). El contenido de grasa, el cual presenta variaciones en función de la especie y la etapa estacional, tiene consecuencias tecnológicas post-mortem, debido a que la oxidación de éstas generan cambios en olor y por lo tanto la pérdida de las características sensoriales deseadas. Éstos procesos de oxidación pueden ocurrir por la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs) como peróxidos, radical hidroxilo y oxígeno singlete, entre otros, generados endógenamente por una amplia variación de procesos en los sistemas biológicos, que pueden ser, desde productos de reacciones deliberadas y altamente controladas en los sitios activos de enzimas como NADPH reductasa, mieloperoxidasa, lipoxigenasa, óxid-nítrico sintetasa, por la cadena de transporte de energía (en la mitocondria o en el sistema del citocromo P450), o bien esencialmente producidos al azar en células y tejidos expuestos a agentes externos como radiación UV, rayos gamma, rayos X, o incluso a la luz visible, además de metales, disolventes, ozono, formas de humo, e incluso debido a situaciones de estrés agudo en peces como falta de oxígeno y nado extenuante generando la acción de catecolamina, la cual acelera la producción de las enzimas previamente mencionadas (Davies, 2005; Pazos et al., 2013).

1.2 Oxidación lipídica y proteínica

En los organismos vivos, se cuenta con un mecanismo enzimático de defensa anti-oxidante, los cuales neutralizan los efectos de las EROs, pero desafortunadamente no sirven después de la muerte de la especie, ocasionando la acumulación en músculo, lo que lleva a modificaciones en lípidos y proteínas. Hay un acuerdo general de que la oxidación de lípidos en pescados grasos es un problema importante durante el almacenamiento y procesamiento, particularmente en músculos oscuros de las especies pelágicas, debido a la vulnerabilidad de estos por la presencia de sustancias pro-oxidantes tales como las proteínas heme (Hb), mioglobina, complejos de transición de metales de bajo peso molecular y

lipoxigenasas presentes en el músculo oscuro. Sin embargo, se ha encontrado que en la especie de pez caballa del Atlántico se forman agregados insoluble causados presumiblemente por la desnaturalización proteica debido a la transferencia de radicales libres provenientes de la oxidación de lípidos, mientras que Stadtman & Oliver (1991) reportaron que tanto la oxidación de lípidos como de proteínas aparentemente comienzan de forma simultánea, y el papel principal de proteínas oxidadas en el retículo sarcoplásmico en bacalao podría ser la competencia por radicales libres en la membrana lipídica. En caballa congelada se ha evidenciado la formación de proteínas debido a reacciones de entrecruzamiento en presencia de productos de oxidación de lípidos (Tokur & Korkmaz, 2007; Li et al., 2013).

La ocurrencia y el impacto de la oxidación de proteínas (Pox) en sistemas de alimentos se han ignorados por décadas. Actualmente, el creciente interés en este tópico ha conducido a resaltar la influencia que las Pox podrían tener en la calidad de la carne y la nutrición humana, teniendo efectos sensoriales y nutrimentales. Estudios recientes han contribuido al conocimiento científico sólido con respecto a los mecanismos básico de oxidación y en metodologías avanzadas para evaluar las Pox de forma precisa en los sistemas de alimentos. Algunos de estos estudios han proporcionado el conocimiento de las reacciones involucradas en las modificaciones oxidativas de proteínas musculares, tales como el entrecruzamiento de aminoácidos y la formación de carbonilos, identificando diversos productos de oxidación (Lund et al., 2011).

Las proteínas son responsables tanto de reacciones enzimáticas como de la textura en el tejido cárnico, siendo esta última uno de los parámetros de calidad más importante, en alimentos acuícolas se modifica rápidamente en las etapas iniciales post-mortem, debido a degradación autolítica por enzimas endógenas. Los cambios post-mortem, el pre-procesamiento y los métodos de procesado pueden conducir al daño en tejido y a la ruptura de los organelos celulares, como mitocondrias y lisosomas, liberando diversas enzimas dentro del líquido celular. El impacto de las enzimas autolíticas en la calidad textural limitarán la vida de anaquel causando un degradación temprana, por lo que la actividad enzimática en peces, ha sido empleada como un indicador de los cambios en calidad, siendo reportadas las calpaínas y las catepsinas (B y D) como las enzimas con mayor relevancia en el ablandamiento de tejidos musculares acuícolas (Chéret et al., 2007; Godiksen et al., 2009) A diferencia de las carnes de mamíferos, donde cierta degradación es requerida para lograr la ternura, los efectos de estos procesos es generalmente indeseable en peces. Estos cambios, de carácter progresivo durante el almacenamiento, pueden tener un impacto significativo en la calidad y por lo tanto en la aceptación por parte del consumidor (Ocaño et al., 2006; Wang et al., 2011; Teixeira et al., 2013).

1.3 Preservación de alimentos

Dentro de las técnicas de conservación empleadas para la disminución de las reacciones de deterioro de pescados, la temperatura es el factor de control que mayor impacto tiene en la frescura y vida de anaquel, el control de este durante el procesamiento, distribución y almacenamiento, es determinante para el crecimiento microbiano, clave en la prolongación de la vida de anaquel de pescado y sus productos. Las causas principales de pérdida de calidad durante el almacenamiento en congelación y descongelación son deshidratación, desnaturalización proteínica y decoloración, las cuales pueden ser controladas con los métodos de congelación así como, con temperatura y tiempo de almacenamiento. La congelación rápida con nitrógeno líquido, empleado en salmón, ha demostrado una disminución en el deterioro, y aunque algunos procesos de deterioro son reducidos con éstos procedimientos, se llevan a cabo reacciones indeseables en lípidos y proteínas, generando cambios perjudiciales en las propiedades nutrimentales y sensoriales (Einen et al., 2002; Asgharzadeh et al., 2010; Liu et al., 2013; Liu et al., 2014), aunado a esto el uso de recubrimientos comestibles (RC) ha generado mucho interés como un coadyuvante en la conservación de alimentos (García-Argueta et al., 2013; García-Argueta et al., 2016).

1.3.1 Recubrimientos Comestibles

El empleo de recubrimientos comestibles (RC) en alimentos durante el almacenamiento en frío permite disminuir las pérdidas de las propiedades antes mencionadas, son elaborados a partir de materiales con proteínas, polisacáridos, y aceites, conservando atributos importantes en alimentos sensibles como pescados y mariscos, como el color y la textura (Kilincceker, Dogan & Kucukoner, 2009; Soazo et al., 2013). Los RC son solubles en agua, proveen de brillo, actúan como una segunda piel, además de adherirse rápidamente a los alimentos, permiten el etiquetado y poseen propiedades anti-bacterianas y antioxidantes. Son protectores del sabor y el color, ayudando a mantener los componentes nutrimentales como vitaminas, aminoácidos, y ácidos grasos. Funcionan como barrera al oxígeno y dióxido de carbono, además de tener propiedades mecánicas a una humedad relativamente baja, disminuyendo la interacción del alimento con el ambiente. Reducen la absorción de aceite durante el freído, reteniendo sin embargo la humedad en el alimento, la calidad sensorial del producto se prolonga y se disminuye la pérdida en peso, lo cual no solo es importante por el impacto económico, sino por la relación de la humedad con la textura de los alimentos, ya que la pérdida de humedad durante el congelamiento produce quemaduras de frío o bien una apariencia vítrea, debido a las pequeñas cavidades causadas por la sublimación del hielo. Las películas y RC pueden ser una buena alternativa para mejorar la calidad de los alimentos congelados,

principalmente por la reducción en la relación de transferencia de humedad entre el alimento y el ambiente, manteniendo la integridad estructural durante la descongelación y disminuyendo la presencia de quemaduras de frío, además de cumplir con las demandas sensoriales del consumidor (Kilincceker et al., 2009; Motalebi & Seyfzadeh, 2011; Giménez et al., 2013; Soazo et al., 2013).

Estudios recientes han demostrado la extensión de las propiedades funcionales de los RC, adicionando compuestos como antimicrobianos o antioxidantes, para producir un material de *empaquete activo*. Dentro de los compuestos antimicrobianos incorporados, los más empleados son ácidos orgánicos y sus sales, pigmentos, sulfitos, nitritos, bacteriocinas (nisina y pediocina), enzimas (lisozimas), bacterias ácido lácticas (LAB) (Gialamas et al., 2010; Concha-Meyer et al., 2011), y algunos carbohidratos como el quitosano, polisacárido muy abundante en la naturaleza que se obtiene a partir de los caparazones de crustáceos como cangrejos y camarones y, en menor cantidad de la pared celular de hongos, bacterias, levaduras y cutículas de insectos (Zhong, Li & Zhao, 2012).

El desarrollo de películas y/o recubrimientos comestibles implica el empleo de al menos un constituyente capaz de formar una matriz con la suficiente cohesión y continuidad, de ahí que del tipo de componente o componentes, dependerán las características estructurales de las películas y recubrimientos comestibles. Para caracterizar un RC es posible evaluar las propiedades, fisicoquímicas, mecánicas, de barrera, y sensoriales. Así el pH, la viscosidad y el tamaño de partícula son relevantes ya que están directamente relacionadas con la microestructura y estabilidad de dichas dispersiones. El tamaño de partícula del componente disperso, la carga superficial de las mismas y la existencia de fuerzas atractivo-repulsivas entre las partículas de tipo Van der Waals, electrostáticas, estéricas y de hidratación determinan las fuerzas de cohesión y adhesión de la formulación al momento de su aplicación en el alimento. La cohesión se presenta entre las moléculas formadoras del polímero dando lugar a la película, la adhesión se presenta entre la película y el sustrato. Otra de las características importantes a evaluar es el comportamiento mecánico, ya que refleja la durabilidad de las películas y su habilidad para mejorar la integridad de los alimentos en los que se aplica por lo que es necesario evaluar esfuerzo tensil, elongación y módulo de Young. Aunado a lo anterior, es posible evaluar las propiedades de barrera entre las que destacan la permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua sobre todo cuando estas tienen como objetivo su aplicación en alimentos perecederos, y finalmente es imprescindible considerar que la aplicación de los RC producirán un efecto en la percepción del consumidor por lo que no debe despreciarse la evaluación de las propiedades sensoriales, apariencia (color, transparencia) e inclusive el sabor de las mismas ya que esto juega un papel indispensable en la calidad para lograr que la aplicación de tecnologías emergentes como las películas y recubrimientos comestibles lleguen a ser exitosas (García Argueta, 2013).

1.3.1.1 Quitosano

El quitosano, es derivado N-desacetilado de la quitina, con un grado de desacetilación no menor al 65%, es un polisacárido lineal constituido por unidades de N- acetilglucosamina y de 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (glucosamina) unidas por enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4). Debido a las forma protonada del grupo amino reactivo en la posición C3, las cargas positivas del quitosano, interfieren con las residuos cargados negativamente de las moléculas de la superficie celular sirviendo como un antimicrobiano y antifúngico efectivo, el quitosano se puede solubilizar en ácidos orgánicos como el acético o el cítrico, para formar películas debido a la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas de quitosano intra e intermoleculares y aunque presentan buena adhesión y propiedades de esfuerzo a la tracción comparables a películas sintéticas pero de menor elasticidad, así como propiedades de barrera al oxígeno comparables a películas plásticas convencionales, debido al carácter hidrofílico en presencia de agua y ambientes húmedos presenta propiedades mecánicas pobres, limitando su aplicación. Por lo que se emplea con otros componentes, como gelatina, suero de leche o metilcelulosa para mejorar las características en la formación de RC (Nadarajah, 2005; Sebti & Coma, 2005, Bourbon et al., 2011).

Ojagh et al., (2010), desarrollaron RC de quitosano enriquecidas con aceite de canela, con el objetivo de incrementar la vida de anaquel de filetes de trucha almacenados en frío, obteniéndose una protección efectiva a la oxidación lipídica, coincidiendo estos resultados con los descritos por Jeon, Janak & Shahidi, (2002), al aplicar recubrimientos a filetes de bacalao y arenques, en este caso tanto las propiedades de barrera al oxígeno como las propiedades antioxidantes inherentes al quitosano pudieron contribuir al control de la oxidación lipídica (Bonilla et al., 2012).

Es posible adicionar a los RC otros compuestos antioxidantes que coadyuven a mantener las características sensoriales y nutrimentales en la fracción lipídica y proteínica, esto se ha llevado a cabo mediante el empleo de compuestos como α -tocoferol o ácido cítrico, o bien de aceites esenciales de orégano, tomillo y menta, ya que al ser encapsulados en una matriz polimérica se minimiza la dosis requerida, evitando cambios en las propiedades organolépticas, ya que reducen la volatilización y controla la liberación gradual del componente (Bonilla et al., 2013).

1.3.1.2 Menta

La búsqueda de antioxidantes naturales, especialmente en plantas, ha aumentado considerablemente, debido a que los sintéticos sufren el inconveniente que son volátiles y se descomponen fácilmente a altas

temperaturas adicionalmente, algunos de ellos han sido suspendidos por causar o promover efectos negativos en la salud , por lo que algunas plantas aromáticas han sido ampliamente estudiadas por su intensa actividad antioxidante (Nickavar Alinaghi, & Kamalinejad, 2008), entre las que destacan: albahaca, salvia, orégano y pimenta, lo que ha resultado en el desarrollo de formulaciones de antioxidantes naturales (Miliauskas, Venskutonis, Van Beek, 2004). En el caso particular de la menta (*Mentha piperita L.*), esta es un híbrido entre *Mentha aquatica L.* y *Mentha viridis L.*, que pertenece a la familia Lamiaceae conformada por aproximadamente 220 géneros y 3300 especies. De acuerdo con lo descrito en la Farmacopea Europea IV (2002) esta planta es usada para tratar diversos padecimientos gastrointestinales y gastritis, así como en la industria farmacéutica y agroalimentaria. También se ha reportado como una fuente importante de compuestos polifenólicos y antioxidantes (Nickavar et al, 2008; Martínez et al., 2013).

1.4 Carpa común (*Cyprinus carpio*)

La carpa común (*Cyprinus carpio*) es un pez omnívoro usado comúnmente en acuicultura comercial, dada la gran capacidad de la carpa para desarrollarse en las condiciones ambientales de los diferentes sistemas acuíferos del país, esta se encuentra presente en el 80% de la superficie de cuerpos de agua de México, siendo los más relevantes: Hidalgo, Michoacán, Guanajuato, Durango y el Estado de México, en donde ya se ha constituido como un recurso de consumo popular cuyo impacto socioeconómico en los últimos años se ha incrementado derivado del aumento en la producción de carne y de crías (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2014a). El Estado de México, es la entidad con mayor producción acuícola (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2011), con un promedio en los últimos 6 años (hasta 2011) de 10,430 toneladas. En el 2012, la producción mundial alcanzó 2,791,912 toneladas (FAO, 2014a), la carpa común, se considera una fuente de proteína de alta calidad, la cual constituye aproximadamente el 20% de su parte comestible, y se considera como una especie semi grasa, debido a su contenido lipídico (Usydus et al., 2009).

El objeto de este estudio fue evaluar el efecto que tiene un RC adicionado con antioxidante (quitosano y extracto de menta) sobre las características bioquímicas y fisicoquímicas, así como las propiedades texturales y nutrimentales de la carpa común durante su vida útil, en almacenamiento a -18 °C y 4 °C.

2 JUSTIFICACIÓN

El pescado es conocido por el consumidor como una fuente de nutrientes como vitaminas lipo-solubles, proteínas ricas en aminoácidos esenciales, micro elementos y ácidos grasos insaturados que, entre otros beneficios tienen un efecto hipo-colesterolémico, sin embargo, éstos pueden verse afectados por oxidación mediante EROs, formadas durante la manipulación y almacenamiento de producto fresco, así como por acción enzimática y microbiana, afectando las características sensoriales (formación de compuestos volátiles desagradables) y fisicoquímicas (capacidad de retención de agua, formación de bases volátiles) así como en las propiedades texturales (ablandamiento) y nutritivas (pérdida de nutrientes) del pescado. Prolongar la vida de anaquel con pocos cambios en la calidad en especies acuícolas puede realizarse mediante la congelación y la combinación con otras técnicas de conservación. Las biopelículas, a base de proteínas o polisacáridos, sirven como una barrera selectiva a la humedad, gases y solutos, evitando daños durante el almacenamiento en congelación, como desnaturalización proteica, pérdida de peso, quemadura por frío, oxidación de lípidos y proteínas. Adicionalmente, funcionan como vehículos de sustancias antimicrobianas y antioxidantes así como de vitaminas y pigmentos, considerándose empaques activos, ya que proveen de funciones adicionales durante el almacenamiento.

Dado que los productos pesqueros frescos son generalmente más perecederos que la mayoría de especies de origen terrestre (res y cerdo), debido a las reacciones de deterioro, el objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de un RC adicionada con antioxidantes para extender la vida útil de productos frescos mínimamente procesados como los productos de la pesca, manteniendo sus características fisicoquímicas, texturales y nutritivas durante el almacenamiento a bajas temperaturas, esto es en refrigeración y congelación, en una especie semi-grasa, carpa común (*Cyprinus carpio*) de importancia relevante en la acuicultura en México.

3 HIPÓTESIS

Se sabe que las reacciones post-mortem en especies acuícolas durante el almacenamiento generan cambios en las características bioquímicas, fisicoquímicas y en las propiedades texturales y nutrimentales por acción enzimática y microbiológica, por lo que la aplicación de un RC adicionado con antioxidantes modificará la velocidad de éstas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la influencia de un RC sobre las características bioquímicas, fisicoquímicas, texturales y nutrimentales así como cambios microbiológicos post-mortem en filetes de carpa común (*Cyprinus carpio*) almacenado a bajas temperaturas.

4.2 Objetivos Específicos

- Valorar los cambios en las características fisicoquímicas y texturales en filetes de carpa común con un RC a bajas temperaturas.
- Observar el crecimiento microbiológico en filetes de pescado de carpa común (*Cyprinus carpio*) con RC durante el almacenamiento.
- Determinar el efecto bioquímico del almacenamiento a bajas temperaturas sobre las grasas y proteínas de filetes de pescado semi-graso (*Cyprinus carpio*) mediante el análisis del grado de lipoperoxidación y la concentración de proteínas oxidadas e hidroperóxidos.
- Evaluar el efecto de los cambios post mortem sobre la calidad nutrimental en filete de *Cyprinus carpio* con RC, mediante análisis proximal de la carne, así como perfil de aminoácidos, al inicio, y fin del almacenamiento.

5 METODOLOGIA

Se llevó a cabo un estudio comparativo en filetes de carpa común (*Cyprinus carpio*) almacenados a bajas temperaturas, considerando las características bioquímicas y fisicoquímicas, las propiedades texturales y nutrimentales así como cambios microbiológicos, entre con RC adicionados con antioxidantes y el control, la caracterización de éste RC fue determinado por García Argueta (2013).

5.1 Colecta y mantenimiento de la muestra

Se obtuvieron muestras de filete de carpa común, del Centro Acuícola Tiacaque, con un tiempo no mayor a las 72 h de captura. Se transportaron al laboratorio donde por inmersión se cubrieron con un RC hasta gelificación total, separando en lotes, de acuerdo al almacenamiento. Se colocaron en camas, en cajas de polipropileno, para almacenamiento en refrigeración a 4°C y a temperatura de congelación comercial de -18°C. Se tomaron muestras del tiempo inicial para ambos casos y posteriormente para las muestras refrigeradas cada tercer día y para las muestras tratadas en congelación, cada mes.

5.1.1 Preparación de soluciones de recubrimiento

La solución para el RC base se elaboró a partir de la formulación reportada por García-Argueta et al. (2016) consistente en 13% suero de leche, 6% grenetina, 13% glicerol, 4% inulina y 1.5% ácido cítrico. La solución se agitó de forma constante hasta la disolución completa de los componentes a una temperatura de 40°C, con un pH final de 3.5.

Por cada lote se emplearon aproximadamente de 15 a 20 filetes (12 a 15 cm) y se les aplicó el recubrimiento por inmersión por 15 s en la solución, mantenida a no menos de 30 °C y posteriormente se dejaron reposar por 1 min, colocándose en una malla para drenar y secar al aire permitiendo la formación de la película.

5.1.1.1 Tratamientos para almacenamiento en congelación

Las muestras de filete se asignaron al azar en dos tratamientos, consistiendo en un lote control (sin recubrimiento) (C), y un lote con recubrimiento adicionado con 1.5% de quitosano, el cual fue adquirido de Aldrich Chemical Co (C +R). Para el lote con recubrimiento, aproximadamente 20 filetes de carpa, se les aplicó el recubrimiento y se almacenaron a -18 ± 1 °C en un congelador comercial (Torrey, México,

MX), para análisis fisicoquímicos y microbiológicos subsecuentes en intervalos mensuales para determinar, la calidad del pescado, durante el almacenamiento.

5.1.1.2 Preparación para disoluciones de recubrimiento para refrigeración

Los filetes de carpa común (*Cyprinus carpio*) se asignaron de forma aleatoria en 4 lotes: el lote control sin recubrimiento (C), un lote con la formulación del recubrimiento base (C + RC), un lote con recubrimiento adicionado con 1,5 % de quitosano, (C +RCQ) y un último lote con recubrimiento adicionado con 1,5% de quitosano y 5 % de extracto de menta acuoso, (C + RCQM). En recipientes de polietileno cerrados,

Posteriormente fueron almacenados 4 ± 1 °C en un refrigerador comercial mabe (México, MX) por 9 días para los análisis subsecuentes. Se llevaron a cabo los análisis fisicoquímicos y microbiológicos los días 0, 1, 3, 7 y 9, para determinar la calidad del pescado durante el almacenamiento.

5.2 Análisis fisicoquímicos

Humedad. El contenido de humedad se determinó por diferencia de pesos entre la muestra fresca de filete de pescado picado y la muestra seca, después de secado en horno a 105 ± 5 °C durante 3 horas o hasta peso constante, el resultado se expresa como porcentaje de humedad. Descrito en AOAC (AOAC, 2000)

Medición pH: se tomó una porción de 10 g de músculo, se homogenizó con 90 mL de agua a pH neutro, hasta obtener una pasta consistente uniforme, ajustando la temperatura de la pasta a $20 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$, se realizó la lectura de pH con un potenciómetro (Conductronic pH 120) previamente calibrado, esto de acuerdo con el método NMX-F-317- S-1978 “Determinación de pH en Alimentos”

Extracción de proteínas miofibrilares (PM). Se realizó de acuerdo a la técnica reportada por Ngapo y colaboradores (1992), con las siguientes modificaciones. Se homogenizaron 100 g de músculo con hielo y agua fría, en las siguientes proporciones (1:1:1 p/p/w) en licuadora comercial. Se colocaron en agitación constante por 10 min en baño de hielo, filtrándose a través de manta de cielo para eliminar el tejido conectivo. Se añadieron 15 mL de disolución amortiguadora con agitación por 15 min, dos veces. El homogeneizado se centrifugó a 3000 rpm durante 25 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó, el precipitado conteniendo las PM, se mantuvo en refrigeración hasta su empleo.

Concentración de proteína: Se empleó el método biuret reportado por Miller (2001) en Dublín, y colaboradores (2006). Utilizando tubos de ensayo se midió 1 mL de las disoluciones de proteína y se agregaron 3 mL del reactivo de biuret (Disolver 1.5 g de sulfato de cobre y 6 g de tartrato de sodio y potasio en 500 mL de agua en un matraz volumétrico de 1 L. Adicionar 300 mL de hidróxido de sodio al 10% y aforar a 1L con agua destilada). Se homogeneizó y dejó en reposo durante 30 minutos a la sombra sin contacto directo con la luz, se midió la absorbancia a 540 nm, los datos obtenidos se relacionaron con respecto a una curva patrón de seroalbúmina-bovina de concentración 0-10 mg/mL Anexo 1. Curva patrón de seroalbúmina-bovina

Solubilidad: De acuerdo al método descrito por Pilosof (2000). Extraídas las proteínas (5 mg.mL⁻¹, a pH 7) se centrifugaron a una temperatura de 4 °C para evitar su desnaturalización. Al sobrenadante extraído se le midió la concentración de proteínas mediante el método biuret. (Descrito adelante) Se reportó la solubilidad como la relación entre el contenido de proteínas del sobrenadante y el contenido de la proteína sin centrifugar por 100.

Determinación de grupos sulfhidrilo: Se llevó a cabo el método Ellman (1959). Se mezcló 1 mL de la disolución proteica (5 mg/mL a pH 7) y 9 mL de urea 8 M disuelta en un amortiguador de Tris-Glicina-EDTA (10,4 g/L Tris; 6,9 g/L Glicina; 1.2 g/L EDTA; pH 8). Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min, a 3 mL de la mezcla se añadieron 50 µL de una disolución del reactivo 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzónico (4 mg/mL en la misma disolución amortiguadora). Se dejó en reposo durante 30 min en obscuridad, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm, se transformó el valor de absorbancia empleando el coeficiente de extinción.

Bases volátiles totales de nitrógeno (BVT-N). El contenido de BVT-N se determinó de acuerdo con el método de Conway and Byrne [20] con pequeñas modificaciones. 5 g de muestra homogenizada se añadió ácido tricloroacético (TCA) al 4 % en una relación 1:2 (w/v), posteriormente se filtró empleando papel Whatman No 1 (Schleicher & Schuell, Maidstone, England). 1 mL del filtrado obtenido se colocó en el anillo exterior de la cámara Conway, mientras que en el anillo interno se colocó solución de ácido bórico al 1 % conteniendo indicador Shiro Tashiro. Para activar la reacción se mezclaron 2 mL de K₂CO₃ con el filtrado. Se incubó la cámara a 25 °C por 24 hr. La solución del anillo interior se tituló empleando 0.1 N HCl hasta el vire de color a un tono rosa.

5.3 Análisis bioquímicos.

Determinación del grado de lipoperoxidación (Método de Buege y Aust, 1979): A 100 μL de la muestra (sin centrifugar) se completó a 1 mL con disolución reguladora Tris-HCl 150 mM a pH 7.4 y se le adicionaron 2 mL de ATB-ATC (ácido tiobarbitúrico al 0.375% en ácido tricloroacético al 15%) se indujo a choque térmico con agua en ebullición y se dejó en baño maría. Se incubó a 37 °C por 30 min. Concluido el tiempo se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. y se determinó la absorbancia a 535 nm. En un espectrofotómetro TU-1800 (Beijing Purkinje General Instrument Co. Ltd., Beijing, China) Los resultados se expresaron en mM de malondialdehído / mg proteínas / g tejido, usando el coeficiente de extinción molecular (CEM) el cual es de $1.56 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determinación de proteínas oxidadas (Método de Levine et al., 1994). Se tomaron 100 μL del sobrenadante y se adicionará 150 μL de 10 mM de dinitro hidracina (DNPH) / 2 M HCl. Se incubó durante 1 h a oscuridad. Después se adicionaron 500 μL de ATC al 20% y se dejó reposar durante 15 min a 4°C. El precipitado de las proteínas se colectó por centrifugación a 11 000 rpm por 3 min. El botón se lavó tres veces con etanol-acetato de etilo 1:1 y posteriormente se disolvió en 150 μL de una disolución de 6 M guanidina pH 2.3 y se incubó a 37 °C por 30 min. La absorbancia se determinó a 366 nm. Los resultados se expresaron en mM o nM de carbonilos reactivos (C=O) / mg proteínas usando el coeficiente de extinción (CE) el cual es de $21\ 000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determinación del contenido de hidroperóxidos (Método de Jiang et al., 1992). A 100 mL de la muestra (previamente desproteinizada con ATC al 10%) se le agregaron 900 mL de mezcla de reacción (FeSO_4 0.25 mM, H_2SO_4 25 mM, naranja de xilenol 0.1 mM e hidroxitolueno butilado 4 mM en metanol al 90%). Se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. La absorbancia se determinó a 560 nm. Los resultados se expresaron en nmol de hidroperóxido de cumeno (CHP) / mg de proteínas / g de tejido, usando el CEM de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.4 Análisis estructurales

Electroforesis en condiciones desnaturalizantes: Se empleó el método LaemmLi (1970), reportado en García (2001). Las PM se mezclaron en una relación 1:4 muestra:amortiguador (disolución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% + mercaptoetanol al 5% + azul de bromofenol al 0.05%+ glicerol, 0.5M Tris-HCl pH 6.8) y se calentó en baño maría a 97°C por 2 minutos, antes de su aplicación. Se inyectó 20 μL de muestra en cada carril de gel separador de 12% de poliacrilamida y concentrador 4%. Se inyectaron

20 µL del marcador, el cual se trató en las mismas condiciones de la muestra. Se empleó un buffer de corrida (9.0 g base tris, 43.2 g de glicina y 3.0 g de SDS adicionar 600 mL de agua desionizada). Para una corrida electroforética se diluyeron 60 mL de buffer con 240 mL de agua desionizada. Se conectó a una fuente de poder con un voltaje de 200 y una temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$, para evitar el efecto Joule. Terminado el proceso de separación se tiñó empleando una disolución de azul de Coomassie R-250 (0.1% azul de Coomassie, metanol 40% y ácido acético al 10%) durante 30 min. Se destiñó empleando una disolución al 40% de metanol y 10% de ácido acético, a temperatura ambiente, o bien en refrigeración hasta que presente nitidez en las bandas

5.5 Análisis Nutricional

Determinación de aminoácidos: De basó en el método descrito por Usydus (2009) con modificaciones, a 3 mg de la muestra deshidratada, se colocó en tubos para llevar a cabo la hidrólisis, con HCl 6 N y ácido tioglicólico como antioxidante. Posteriormente, los tubos se calentaron por 6 h a 150°C . Al término de la hidrólisis, se evaporó el reactivo en un rotavapor Buchi (Buchi, Flawil, Suiza), obteniéndose un concentrado, el cual se re-suspendió en 2 mL de buffer de citrato de sodio 0.2 N pH 2.2.

Para la determinación de los aminoácidos primarios se tomaron 250 µL del extracto hidrolizado, mezclándose con 250 µL de o-ftalaldehído (OPA). Se inyectaron 20 µL en el cromatógrafo (HPLC Varian 9012). Para la determinación de los aminoácidos secundarios (prolina e hidroxiprolina) se tomaron 125 µL del extracto hidrolizado, se les adicionó 0.5 ml de buffer de boratos 0.4 M pH 10.4. De esta dilución se tomaron 250 µL y se mezclaron con 250 µL con la solución derivatizante (NBD-Cl 2 mg/mL en MeOH); una vez filtrada, la mezcla se calentó a 60°C durante 5 min en un vial oscuro con tapa. La reacción de derivatización se detuvo con la adición de 50 µL de HCl 1 M (soluciones valoradas, empleando Na_2CO_3) y se enfrió a 0°C . Para el análisis se tomaron 20 µL de extracto final y se inyectaron en el HPLC. Se utilizó una columna Microsorb C18 marca Varian de 10 cm x 4.6 mm y 3 µm. Se usó metanol grado HPLC 99 % pureza (Baker) y buffer de acetato de sodio pH 7.2 como fase móvil. Se utilizó un detector de fluorescencia (marca Fluorichrom modelo 430020-02) a 455 nm. La cuantificación se llevó acabo usando estándares externos como referencia.

5.6 Análisis microbiológico

Cuenta total. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Se llevaron a cabo diluciones (NOM-110-SSA1- 1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis

Microbiológico) a partir de 10 g de filete de carpa se agregaron 90 mL de agua peptonada llevado a una temperatura similar a la de la muestra. Se homogenizó de 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión, este tiempo no debe exceder de 2,5 minutos, ésta es la dilución primaria. Se transfirió 1 mL de la dilución primaria 1 + 9 (10^{-1}), en otro recipiente conteniendo nueve veces el volumen de diluyente (agua peptonada) estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente. Se mezcló cuidadosamente cada tubo. La selección de las diluciones que se vayan a preparar y de aquellas que se van a inocular, dependen del número esperado de microorganismos en la muestra. En ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta. En cajas Petri previamente rotuladas se transfirió 1 mL de las disoluciones tomando de las capas superiores de la suspensión. Después de inocular las diluciones de las muestras preparadas se agregaron de 12 a 15 mL de Agar Tripton-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar) y mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidando de no mojar la cubierta de las cajas. Se dejó solidificar. Se incluyó una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad. El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que final ente se adicionó el medio de cultivo a las cajas, no excedió de 20 minutos. Se incubaron las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 2 h., para el grupo de mesófilos aerobios y a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 6 a 7 días para el grupo de psicrófilos aerobios. Se reportaron los resultado de acuerdo con la norma, en UFC/ g.

Coliformes totales. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Método para la Cuenta de microorganismos Coliformes Totales en placa. Se colocó en cajas Petri por duplicado 1 mL de la dilución primaria, se repitió el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requirieron, se vertieron de 15 a 20 mL del medio RVBA fundido y mantenido a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en baño de agua. Se mezcló cuidadosamente el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Se permitió que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría. Se preparó una caja control con 15 mL de medio para verificar la esterilidad. Una vez que el medio estuvo completamente solidificado en la caja, se vertieron aproximadamente 4 ml del medio RVBA a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en la superficie del medio inoculado. Se dejó solidificar. Se invirtieron las placas y colocaron en la incubadora a $35 \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 24 ± 2 horas. Reportar resultados de acuerdo con lo especificado en la norma, en UFC de coliformes totales / g pescado.

Hongos y Levaduras. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Se colocaron por duplicado en cajas Petri previamente rotuladas 1 mL de la dilución primaria, se repetirá el procedimiento hasta 3 diluciones decimales, se vertieron de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado, fundido y mantenido a 45 ± 1 °C en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que es vertido el medio de cultivo, no excedió de 20 minutos. Se mezcló cuidadosamente el medio. La mezcla solidificó dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría. Se preparó una caja control con 15 mL de medio, para verificar la esterilidad. Se incubaron las cajas invertidas a 25 ± 1 °C. Se contaron las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, se seleccionaron aquellas placas que contenían entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar los conteos de 4 días de incubación y aún de 3 días, se reportaron resultados en UFC/ g de pescado.

Actividad antimicrobiana. Se prepararon las suspensiones de microorganismos de acuerdo con lo descrito por Singh y colaboradores (2015). Se midió la turbidez por espectrofotometría y se comparó con el 0.5 unidades McFarland, de una suspensión estándar de BaSO₄, equivalente a 1.5×10^8 células / mL. Las suspensiones se extendieron en agar Muller Hinton, y se colocaron en la superficie círculos de celulosa de aproximadamente 5 mm de diámetro, embebidos con los extractos o los recubrimientos. Estas placas se incubaron a 35 °C por 18-22 h, la actividad antibacteriana se evaluó midiendo el diámetro de la zona de inhibición (zona clara) del crecimiento, los resultados se expresaron con diámetro de zona de inhibición. Se llevó cuenta viable por vaciado en caja. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado.

5.7 Capacidad Antioxidante

Compuestos fenólicos totales. La concentración de compuestos fenólicos totales se determinó por el método de Gao, Oomah & Mazza. (2002). En un tubo de ensaye se colocaron 100 µL de los extractos y se les adicionaron 700 µL de una solución 0.2N del reactivo de Folín-Ciocalteu, se mezclaron y reposaron durante 3 min a 25 °C, posteriormente se adicionaron 900 µL de carbonato de sodio y la mezcla se mantuvo por 90 min en la oscuridad, después de ese tiempo se determinó la absorbancia a 765 nm. Los compuestos fenólicos totales fueron expresados como mg ácido gálico/g en base a una curva estándar. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro TU-1800. Anexo 2. Curva estándar realizada?

Actividad antiradicalaria. De acuerdo con el método de Ranilla, Kwon, Apostolidis, & Shetty (2010) con algunas modificaciones. 100 μL de los extractos (a una concentración 0.7 mg/mL de compuestos fenólicos totales) fueron transferidos a tubos polipropileno donde se adicionaron 2.8 mL del 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) (98.9 μM en metanol) y se agitaron en un vórtex durante 15s, los tubos se mantuvieron en reposo y en ausencia de luz durante 30 min, después de ese tiempo se determinó la absorbancia a 515 nm. Se utilizó metanol como blanco y una solución de Trolox 0.02 mM como control antioxidante. La actividad antioxidante se expresó como sigue : % inhibición = $[(A0\ 515 - A_t\ 515) / A0\ 515] \times 100$.

Donde :

A0515= Absorbancia sin el extracto

At515= Absorbancia con el extracto.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CONGELACIÓN

6.1.1 Cambios fisicoquímicos

6.1.1.1 Humedad

Durante el almacenamiento en congelación, se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de la humedad en ambos tratamientos (Figura 1).

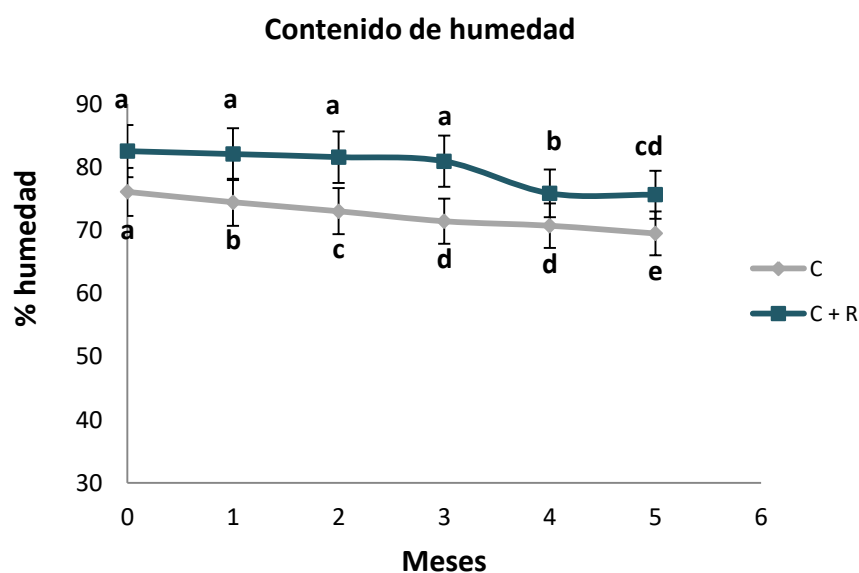


Fig.1. Variación del contenido de humedad durante el almacenamiento de filetes de carpa común a -18°C . C: lote control, C + R: Lote de filete con recubrimiento. Las letras diferentes muestran diferencias significativas durante el almacenaje ($p < 0,05$)

Para la carpa con recubrimiento ésta disminución se observó hasta el cuarto mes, esto podría explicarse a que el quitosano en el EC potencia el entrecruzamiento con la grenetina disminuyendo el volumen libre de la matriz polimérica lo que disminuye el radio de difusión de la moléculas del agua a través del recubrimiento, resultando en una disminución de la permeabilidad del vapor de agua tanto del filete como del recubrimiento mismo (Hosseini et al., 2013), de acuerdo a Dutta (2009), es una característica deseable en los recubrimientos, éste efecto no se observa en la muestra control en nuestro estudio, ya que ésta presenta una pérdida de humedad ($p < 0.05$) durante todo el almacenamiento. Al final del tratamiento, la pérdida porcentual fue similar para ambas muestras, esto puede ser debido a que ambos tratamientos fueron almacenados en cajas de polietileno, que actúan como protección, por lo que el recubrimiento

podría mantener la humedad del producto durante los primeros 4 meses de almacenamiento (Soares et al., 2015).

6.1.1.2 pH

Se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) del pH (Figura 2) al final del quinto mes de almacenamiento en ambos tratamientos, lo cual podría estar asociada a la generación de ácido láctico por la glucólisis anaerobia y la liberación del fosfato inorgánico, producto de la degradación del ATP; se observa un incremento a partir del segundo mes para el control y del tercero para la carpa con recubrimiento, lo cual puede corresponder a la acumulación de compuestos básicos como amoníaco y trimetil amina resultado de las reacciones autolíticas y microbianas (Fan, 2009; Indergard, 2014; Liu 2013; Soares, 2014).

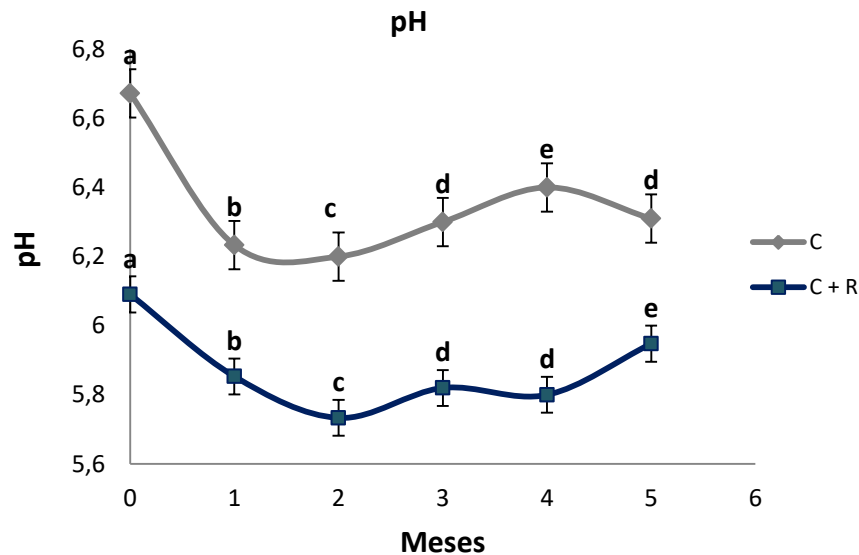


Fig.2. Variación del contenido pH durante el almacenamiento de filetes de carpa común a -18°C.C: lote control, C + R: Lote de filete con recubrimiento. Las letras diferentes muestran diferencias significativas durante el almacenaje ($p < 0,05$)

La mayor variación porcentual al final del almacenamiento la presentó la muestra sin recubrimiento (noncoated material), por lo que se podría decir que durante el almacenamiento, el recubrimiento disminuyó la caída de pH. Un pH menor en la muestra con recubrimiento, puede reforzar la inhibición microbiana y contribuir a la conservación de las muestras inhibiendo las proteasas endógenas (Fan, 2009; Huang et al., 2012).

6.1.1.3 Bases Volátiles Totales de Nitrógeno (BVT-N)

Las BVT-N, están compuestas principalmente por aminas primarias, secundarias y terciarias que son usadas como indicadores de deterioro de la carne, el incremento de éstas se relaciona con la actividad de enzimas endógenas y bacterias de deterioro (Fan, 2009).

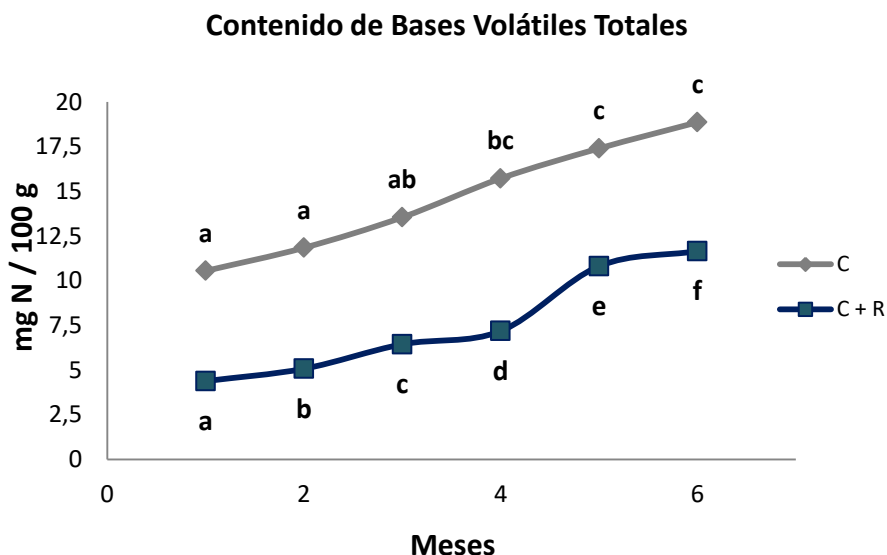


Fig.3. Variación del contenido de Bases Volátiles Totales de Nitrógeno (BVT-N) durante el almacenamiento de filetes de carpa común a -18°C . C: lote control, C + R: Lote de filete con recubrimiento. Las letras diferentes muestran diferencias significativas durante el almacenaje ($p < 0,05$)

De acuerdo con Connel (1990) y Gimenez, Roncales, and Beltran (2002) se considera un intervalo de 25 a 40 mg de N/100 g de tejido como aceptable para el consumo (Fan, 2009; Ojagh, 2010, Huang et al., 2012), a pesar de que ambos tratamientos se encuentran por debajo de este límite (Figura 3), la concentración de BVT-N es mayor en la muestra control en cada etapa de almacenamiento, esto podría ser debido a que la presencia del quitosano ayuda a la disminución de la capacidad de las bacterias para la desaminación oxidativa de los compuestos nitrogenados no proteicos (Fan, 2009, Huang et al., 2012). Probablemente el tiempo de almacenamiento no fue suficiente para identificar diferencias entre los tratamientos, debido a que la actividad enzimática y microbiana, se reducen a bajas temperaturas, la carpa utilizada en este estudio presentó buenas condiciones para el consumo al final del almacenamiento, coincidiendo con lo reportado con Soares et al. (2013).

6.1.2 Cambios Microbiológicos

6.1.2.1 Cuenta Viable Total

La actividad microbiana, es un factor limitante en la calidad del pescado y la cuenta viable total, se ha usado como un índice de aceptabilidad del mismo (Soares 2013; Olafstóttir et al., 1997). Los valores iniciales para carpa fueron de $2.3 \text{ Log}_{10}^4 \text{ UFC/ g}$ y para carpa con recubrimiento de $1.1 \text{ Log}_{10}^4 \text{ UFC/ g}$, éstos valores son dependientes del medio ambiente de donde el pescado es obtenido, así como de las condiciones post mortem (Huang et al., 2012), la evolución de ésta se detallan en la Figura 4 observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) a partir del segundo mes, teniéndose un incremento tiempo-dependiente en ambos tratamientos, sin embargo, el límite recomendado por ICMSF (1986) de $5 \times 10^5 \text{ UFC/g}$, para pescado fresco de buena calidad no se ve excedido (Soares, 2013).

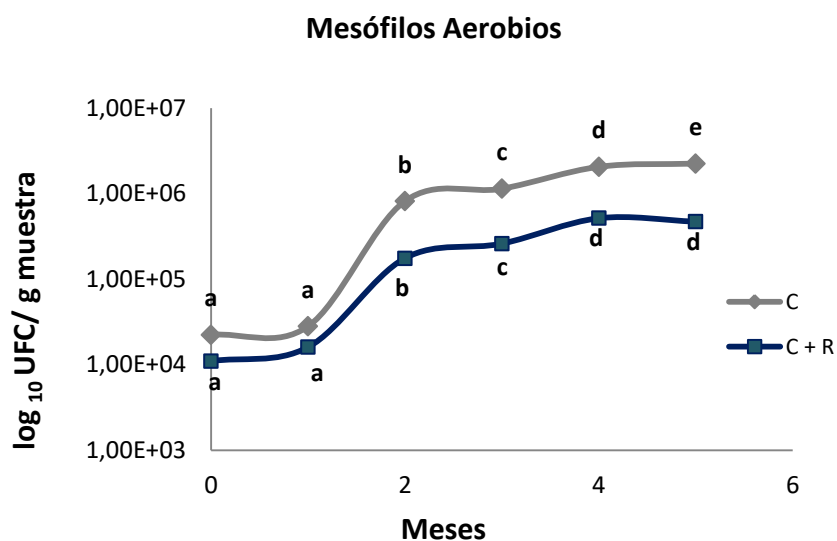


Fig.4. Variación de mesófilos aerobios durante el almacenamiento de filetes de carpa común a -18°C . C: lote control, C + R: Lote de filete con recubrimiento. Las letras diferentes muestras diferencias significativas durante el almacenaje ($p < 0,05$)

Las propiedades del quitosano adicionado en el recubrimiento tuvo un efecto inhibitorio obteniéndose $4.7 \text{ Log}_{10}^4 \text{ UFC/g}$ mientras que para el control fue de $2.2 \text{ Log}_{10}^6 \text{ UFC/g}$ después de seis meses de almacenamiento; el efecto antimicrobiano de este compuesto ha sido ampliamente reportado por Fernandez-Saiz et al. (2009); Jeon et al. (2002) y Lopez-Caballero et al. (2005) y su mecanismo de acción está relacionado al rompimiento de la capa de lipopolisacárido de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y su función como barrera contra la transferencia de oxígeno. Otro mecanismo

de acción puede ser la interacción con los grupos aniónicos de la superficie celular, debido a la naturaleza policationica (Mohan et al., 2012; Ojagh, 2010), esto demuestra que el RC inhibe el crecimiento microbiano hasta 2 unidades logarítmicas, disminuyendo las reacciones de deterioro por acción microbiana durante el almacenamiento en congelación.

6.1.3 Cambios por oxidación

6.1.3.1 Productos de oxidación de lípidos

La concentración de productos primarios de oxidación pueden ser medidos por el contenido de peróxidos, la carpa con recubrimiento muestra un incremento significativo ($p < 0.05$) de éstos a partir del cuarto mes y presenta un valor final de 0.55 nM HPOx/ mg de proteína, (Figura 5) mientras que el control presenta un incremento a partir del primer mes, y uno subsecuente en el último mes de almacenamiento, teniendo un incremento del 59% con respecto a la muestra con recubrimiento, esto demuestra que el recubrimiento disminuye la oxidación lipídica en filete de carpa, estos resultados son congruentes con X Jeon et al. (2002), Ojagh et al. (2010), Li et al. (2012) y Nowzari et al. (2013) quienes reportan recubrimientos adicionales con quitosano retardando la producción de compuestos primarios oxidados en arenque, trucha, bacalao y corvina tanto en refrigeración como congelación en hielo.

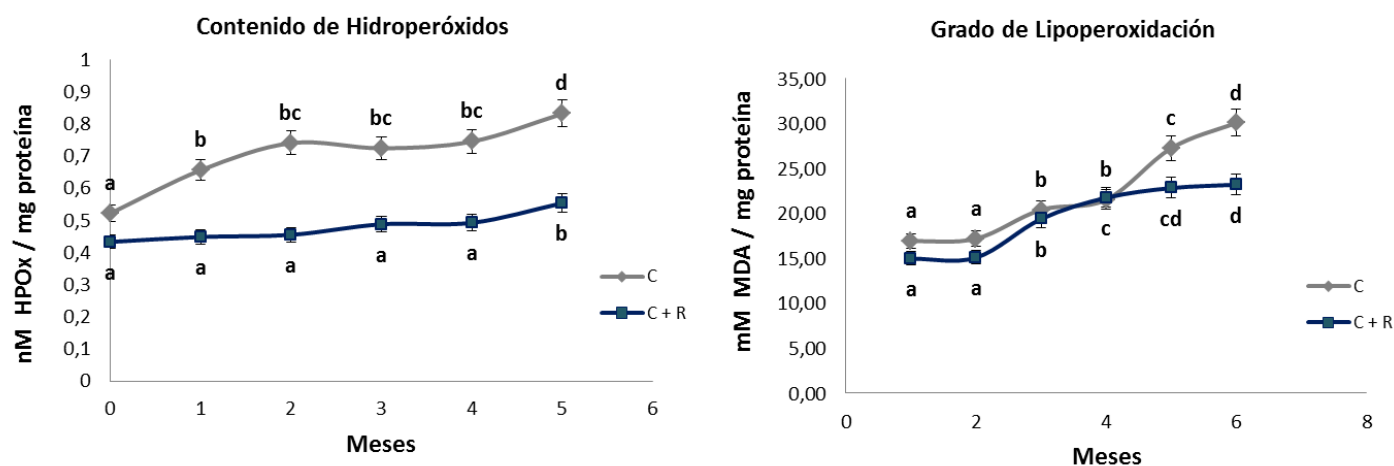


Fig. 5. Variación de los productos de oxidación lipídica durante el almacenamiento de filetes de carpa común a -18°C . C: lote control, C + R: Lote de filete con recubrimiento. Las letras diferentes muestran diferencias significativas durante el almacenaje ($p < 0,05$)

La oxidación de lípidos en pescado es influenciada por varios factores como el contenido graso, el nivel de microsoma asociada al sistema de oxidación lipídico, contenido de grupo heme y la presencia de iones (Li et al., 2012; Nowzari et al., 2013). Los recubrimientos adicionales con quitosano muestran una

excelente barrera a la permeabilidad del oxígeno, al ser aplicadas directamente sobre la superficie cárnica, retardando la difusión del oxígeno Nowzari (2013).

En el almacenamiento a temperaturas de congelación (- 18°C), la oxidación es el factor de deterioro más importante incluso que la actividad microbiana, el método de cuantificación de sustancias reactivas al ATB (o TBARS por sus siglas en inglés) cuantifica los compuestos responsables de la pérdida de sabores y olores y son de importancia en las etapas de deterioro de alimentos, el valor de TBA es un índice de la oxidación lipídica ampliamente usado, el cual cuantifica el contenido de MDA, formado a partir de hidroperóxidos, los cuales son los productos iniciales de la oxidación de ácidos grasos insaturados con oxígeno (Soares, 2013; Souza, 2010). En el presente estudio los valores del ATB de ambos tratamientos presentan un incremento significativo ($p < 0.05$) al segundo y cuarto mes, sin embargo, a partir del cuarto mes la muestra control presentó un incremento del 39 % con respecto a un 6 % de la muestra con recubrimiento, esto debido a la ausencia de quitosano en el control. Este mismo comportamiento lo observaron Jeon et al. (2002), en arenque y bacalao con recubrimiento de quitosano, y Ojagh et al. (2010) en trucha arcoíris, el mecanismo antioxidante del quitosano puede ser explicado debido a que los grupos amino primarios de este forman una fluorófera estable con los aldehídos volátiles, como el MDA derivado del rompimiento de grasas durante la oxidación (Li et al., 2012).

Los resultados indican que el quitosano empleado en un RC al 1.5%, preservan el filete de pescado por disminución de la oxidación lipídica.

6.1.3.2 Productos de oxidación proteínica

La oxidación proteínica en filete de carpa durante el almacenamiento en congelación se muestra en la Fig. 6. En esta se observa un incremento significativo ($p < 0.05$) en la formación de proteínas carboniladas durante el almacenamiento en la muestra control a partir del primer mes, mientras que la muestra con recubrimiento presenta un incremento hasta el tercer mes, y no presente diferencia al final del almacenamiento. El incremento en la muestra control de 0.35 a 0.89 nm/mg proteína y de 0.45 a 0.59 nm /mg de proteína al punto máximo de oxidación, las muestras de filete procesadas incluyen músculo rojo y blanco, y consecuentemente es posible encontrar una alta proporción de proteínas heme (hemoglobina y mioglobina) y con esto, una concentración de hierro, adicionalmente del que se puede encontrar quelado en las proteínas, favoreciendo la oxidación proteínica y lipídica.

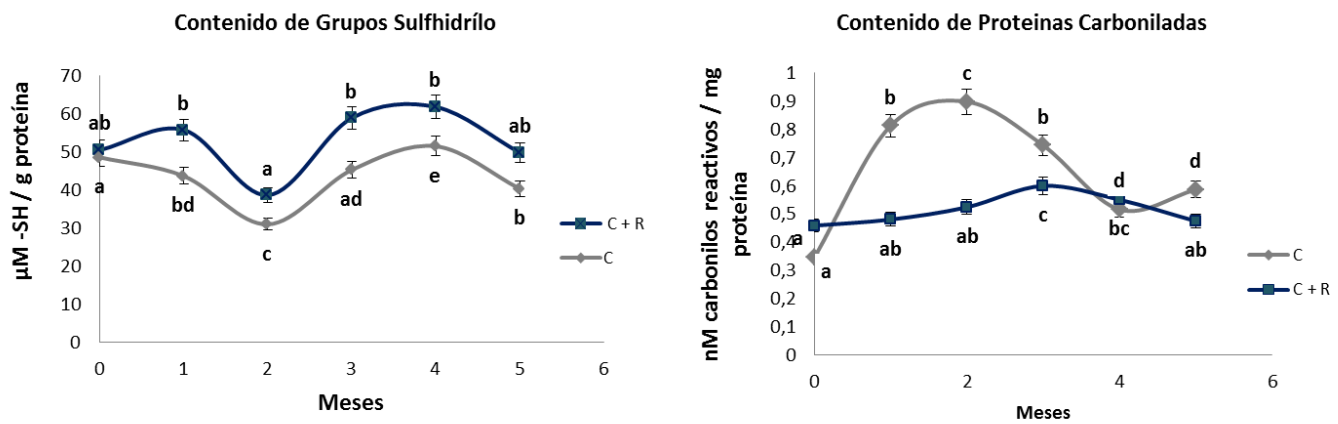


Fig. 6. Variación de los productos de oxidación proteínica durante el almacenamiento de filetes de carpa común a -18°C . C: lote control, C + R: Lote de filete con recubrimiento. Las letras diferentes muestran diferencias significativas durante el almacenaje ($p < 0,05$)

A partir del cuarto mes ambas muestras presentan una disminución en la concentración de grupos carbonilos, lo cual ha sido reportado por otros autores durante un almacenamiento a -20°C , sugiriendo interacciones entre los carbonilos y otros constituyentes celulares, por lo que la formación de grupos carbonilos debería ser visto como un paso en los procesos de oxidación y no como un único marcador estable de la oxidación proteínica (Eymard et al., 2009).

La oxidación de proteínas está asociada con la disminución en los grupos sulfhidrilo, que son convertidos a disulfuros, durante el almacenamiento en congelación se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) durante el tercer mes en ambas muestras, de hecho cuando las proteínas son atacadas por las especies reactivas de oxígeno, (existen diversos factores externos que pueden llevar a la generación de EROs en el pescado, tales como ruido, manipulación e incluso el sacrificio o la presencia de metales con hierro), la interacción puede llevar a la formación de grupos carbonilo y la pérdida de los grupos sulfhidrilo (Falowo et al., 2014; Soyer et al., 2010), afectando a las propiedades estructurales, funcionales y nutrimentales, por lo que el empleo de RC con quitosano puede disminuir dichos fenómenos.

6.1.3.3 Cambios nutrimentales

El contenido proteico en carpa fresca es similar al reportado por FAO (21%), tanto en la especie congelada y congelada con recubrimiento, como se puede observar en la tabla 1. La proteína de pescado se considera de la más alta calidad, comparada con proteínas estándar reportada por FAO, y aunque la información sobre el valor nutrimental es ampliamente conocido son pocos los estudios que se refieren a

su composición, siendo más escasos en cuanto a carpa común (Skibniewska et al., 2013). Se sabe que el contenido y biodisponibilidad de aminoácidos puede ser afectado por diferentes operaciones como secado, fermentado, extrusión e incluso germinado (Boye et al., 2012), en este estudio se pudo observar que debido a la congelación el contenido de aminoácidos contenidos en carpa se vio afectado después de 5 meses de almacenamiento, el cual disminuyó significativamente ($p < 0.05$), mientras que en la especie con recubrimiento solo presentó una disminución en Cys, His, Tyr, Thr, Met, Lys, esto pudo ser debido a la oxidación proteica causada por intermediarios de la oxidación de lípidos y factores ambientales tales como pH, temperatura, actividad de agua y la presencia de promotores o inhibidores como los compuestos fenólicos (Estévez, 2011). Los aminoácidos que contienen azufre como Met y Cys son altamente susceptibles a la oxidación en presencia de los productos oxidados de lípidos que conllevan a la formación de variaciones de compuestos como sulfona, sulfóxidos y derivados de disulfuro (Stadtman & Levine, 2000), en el presente estudio, se observa una disminución en Met y Cys, del filete congelado con respecto al control, al adicionar el recubrimiento comestible, se observa una actividad protectora para Cys (0.84 g/100g en filete congelado y 0.91 g/100g en filete con recubrimiento), esto puede ser debido a que, el entrecruzamiento se atribuye usualmente a la formación de Cys (mediante enlaces disulfuro) y ditirosinas como resultados de residuos de 2 Cys y 2 Tyr, respectivamente (Lund et al., 2011). La pérdida de Thr y Lys puede deberse a la formación de aductos intermediarios como ácido α -amino-3-keto butírico y el semialdehído α -amino adípico como consecuencia de la oxidación catalizada por metales provenientes de las metaloproteínas de la matriz alimentaria (Estévez, 2011).

La proteína de la carpa común se caracteriza por un alto contenido de aminoácidos esenciales, comparada con la proteína estándar establecida por la FAO, excediendo en el caso de Ile, Met + Cys, y Val (Tabla 2), en carpa fresca, siendo Leu el aminoácido limitante y presentando un índice de aminoácido limitante (o índice químico) de 82.27 (Tabla 2), este índice es un parámetro básico usado para la evaluación del valor nutricional de un alimento, el cual se refiere al contenido menor de un aminoácido esencial con respecto a una proteína estándar determinada, a este se le denomina amino ácido limitante. En este estudio, los aminoácidos esenciales de la muestra en congelación sin RC disminuyó, manteniéndose únicamente la Val como excedente y siendo el aminoácido limitante la Lys, este cambio en el aminoácido limitante podría ser consecuencia de reacciones enzimáticas y/o al desarrollo bacteriano durante el almacenamiento (Ciampa et al., 2012), por otro lado la carpa congelada con RC sigue presentando una concentración superior en los aminoácidos antes mencionados (Iso, Met + Cys y Val), presentándose por lo tanto un efecto protector en Lys, lo cual resulta en gran beneficio ya que se mantendría el pescado como una fuente importante de este aminoácido después de 5 meses de almacenamiento en congelación (Boye et al.,

2012; Usyodus et al., 2009). El índice químico disminuye después de la congelación 11 unidades en el filete sin RC y 3 unidades para el filete con RC lo que sugiere un efecto protector del RC sobre los aminoácidos esenciales.

Tabla 1. Perfil de aminoácidos de proteína de filete de carpa común fresca, filete de carpa almacenado en congelación por 5 meses y filete de carpa con recubrimiento almacenado en congelación por 5 meses.

Aminoácidos	Filete de carpa fresco	Filete de carpa con 5 meses de almacenamiento	Filete de carpa con recubrimiento, con 5 meses de almacenamiento
Asparagina	6.28 ± 0.18 ^a	5.03 ± 0.12 ^b	5.98 ± 0.22 ^a
Ácido Glutámico	10.75 ± 0.22 ^a	8.53 ± 0.18 ^c	9.05 ± 0.15 ^b
Alanina	4.98 ± 0.18 ^a	3.76 ± 0.15 ^c	4.28 ± 0.23 ^b
Arginina	3.74 ± 0.10 ^a	3.11 ± 0.12 ^b	3.45 ± 0.18 ^a
Cisteína	0.98 ± 0.07 ^a	0.84 ± 0.08 ^b	0.91 ± 0.06 ^a
Fenilalanina	3.51 ± 0.24 ^a	2.71 ± 0.28 ^b	3.29 ± 0.19 ^a
Glicina	3.34 ± 0.12 ^a	2.76 ± 0.19 ^b	3.11 ± 0.16 ^a
Histidina	2.48 ± 0.08 ^a	1.5 ± 0.05 ^c	2.01 ± 0.12 ^b
Isoleucina	3.89 ± 0.24 ^a	2.31 ± 0.22 ^b	3.28 ± 0.17 ^a
Leucina	5.43 ± 0.32 ^a	4.76 ± 0.38 ^b	5.21 ± 0.34 ^a
Lisina	5.53 ± 0.28 ^a	4.12 ± 0.22 ^b	5.3 ± 0.19 ^c
Metionina	2.73 ± 0.08 ^a	1.08 ± 0.07 ^b	2.06 ± 0.09 ^c
Serina	2.72 ± 0.07 ^a	1.97 ± 0.08 ^c	2.25 ± 0.11 ^b
Tirosina	2.67 ± 0.15 ^a	1.86 ± 0.21 ^b	2.22 ± 0.13 ^c
Treonina	3.16 ± 0.22 ^a	2.42 ± 0.12 ^b	3.08 ± 0.15 ^a
Valina	4.28 ± 0.19 ^a	3.76 ± 0.32 ^b	4.12 ± 0.23 ^a

^{a,b,c}p<0.05

Tabla 2. Índice de aminoácido limitante (%)

Aminoácidos	Proteína Estándar FAO/OMS (1991) ^a	Filete de Carpa		Filete de carpa congelado por 5 meses		Filete de carpa + recubrimiento congelado por 5 meses	
		g/ 100 g proteína	%	g/ 100 g proteína	%	g/ 100 g proteína	%
Fenilalanina + Tirosina ^a	6,30	6,18	98,10	4,57	72,54	5,51	87,46
Isoleucina	2,80	3,89	138,93	2,31	82,50	3,28	117,14
Leucina	6,60	5,43	82,27	4,76	72,12	5,21	78,94
Lisina	5,80	5,53	95,34	4,12	71,03	5,30	91,38
Metionina + Cisteína ^b	2,50	3,71	148,40	1,92	76,80	2,97	118,80
Treonina	3,40	3,16	92,94	2,42	71,18	3,08	90,59
Valina	3,50	4,28	122,29	3,76	107,43	4,12	117,71
Índice de aminoácido			82,27		71,03		78,94

^a de acuerdo a Usyus y colaboradores (2009)

6.1.4 Cambios estructurales

El perfil de pesos moleculares obtenidos mediante electroforesis de las MP extraídas de los diferentes tratamientos durante el almacenamiento se muestran en la Figura 7., en donde la composición de las PM de carpa común, fueron cadenas de miosina de alto peso molecular (MCP), actina (A) y troponina (T), observándose que la muestra sin recubrimiento, presenta al quinto mes de almacenamiento, bandas de peso molecular menor al de la miosina con un intervalo de 150, 100 y 75 KDa aproximadamente, esto probablemente debido a que algunos aminoácidos de la miosina han sido oxidados, formando compuestos carbonilados, coincidiendo con lo reportado por Kjaersgard et al. (2006) en trucha arcoíris, así mismo, Passi et al. (2005), reportan en diferentes especies de pescados del mediterráneo un incremento de las proteínas oxidadas posterior a la oxidación lipídica, posiblemente debido a la presencia del grupo heme de la mioglobina (Eymard et al., 2009).

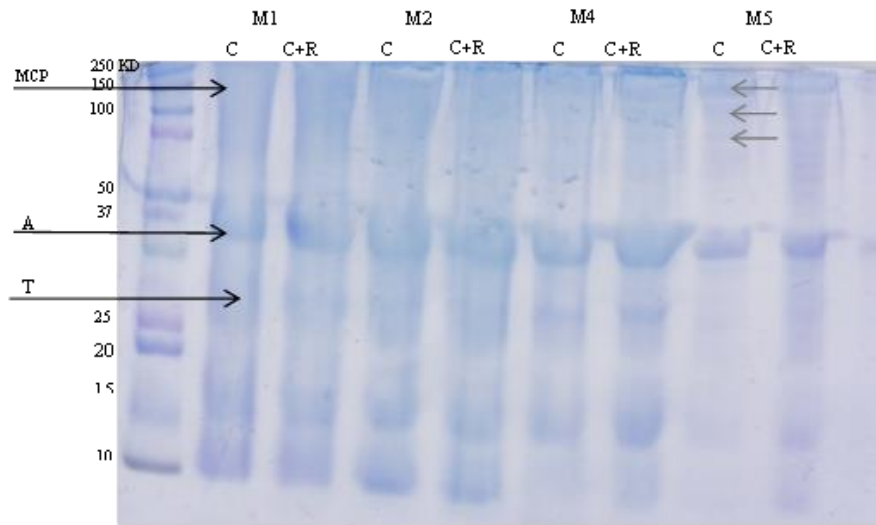


Fig. 7. Electroforésis de carpa común almacenada a -18°C . (C) lote control, (C + R) Lote de filete con recubrimiento. M1, M2, M4 y M5 indican del primer al quinto mes de almacenamiento.

Para las muestras con recubrimiento, no se observaron cambios notables en el perfil electroforético, lo que podría sugerir que el recubrimiento está retardando el mecanismo de oxidación, mostrando que la actina fue menos oxidada durante la congelación coincidiendo con lo reportado para surimi (Eymard, Baron, & Jacobsen, 2009). A pesar de la elevada susceptibilidad de las proteínas miofibrilares de ser oxidadas, los recubrimientos comestibles podrían coadyuvar a la preservación de la integridad proteica de las especies acuícolas/marinas almacenadas durante la congelación, manteniendo las propiedades funcionales y nutrimentales por más tiempo.

6.2 Refrigeración

6.2.1 Cambios microbiológicos

6.2.1.1 Actividad antimicrobiana

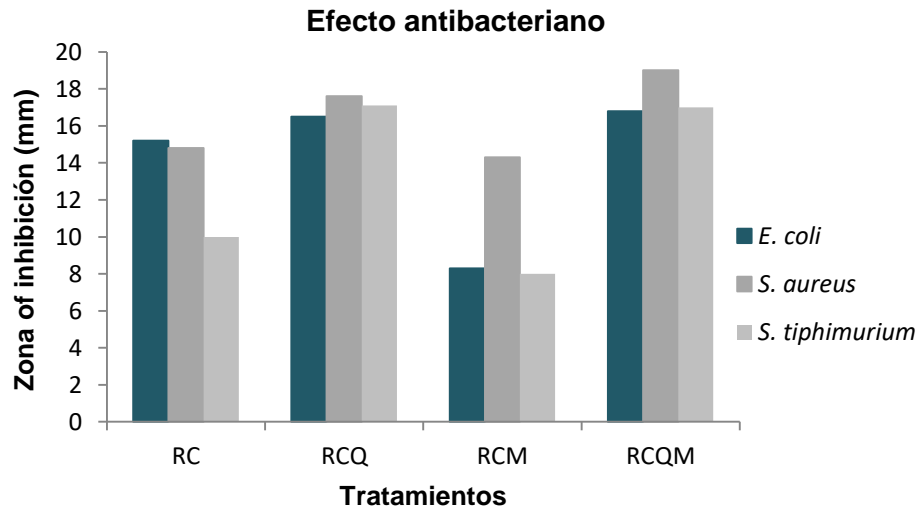


Fig. 8. Efecto de la actividad antimicrobiana de los diferentes recubrimientos sobre diferentes cepas. (RC) Recubrimiento comestible base, (RCQ) Lote de filete con recubrimiento adicional con quitosano, (RCM) Lote de filete con recubrimiento adicional con menta, (C + RCQM) Lote de filete con recubrimiento adicional con mezcla quitosano + menta. Se presentan resultados de muestras por triplicado.

La actividad antibacteriana de los recubrimientos comestibles adicionados con los extractos acuosos de menta, quitosano y la mezcla menta-quitosano, fueron evaluados usando el método de difusión en agar, midiendo el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento de las diferentes muestras, evaluándose tanto en especies bacterianas Gram positiva (*S. aureus*) como Gram negativa (*Salmonella* y *E. coli*). Los resultados de la actividad microbiana se presentan en la figura 8. Observándose para el caso de RCM una sensibilidad a *S. aureus*, con un halo de inhibición de 14.3 mm, no presentándose para las especies Gram negativas. Para el RCQ, presentó una sensibilidad para ambos grupos de bacterias, teniéndose que para *S. aureus* un halo de inhibición de 17.6 mm, seguido por salmonella con un halo de 17.1 mm y para *E. coli* 16.5 mm. Para RCQM, sobre *S. aureus* se observó un efecto sinérgico, ya que se formó una gran zona de inhibición (20 mm), no siendo así para *Salmonella* y *E. coli*, quienes presentaron zonas de imbibición en

un intervalo de 17 mm-16.8 mm. Es posible que la baja inhibición de RCM, en especies Gram negativas se deba a la presencia de lipopolisacáridos en la membrana externas, los cuales permiten un incremento a la resistencia a las sustancias antibacterianas presentes en el extracto acuoso de la menta (Singh et al., 2015), para el caso de las Gram positivas, Al-Hadi et al. (2011) menciona que el efecto del extracto acuosos sobre *S. aureus*, se debe principalmente a los compuestos 1,8-cineole, eugenol, sabine y 4-terpienol, los cuales presentan actividad antibacterial por su capacidad de inactivar proteínas microbianas y de células de recubrimiento. Para el RCQ. Dutta et al. (2009), sugiere que el carácter antimicrobiano del quitosano son las cargas positivas del grupo amino que interaccionan con las cargas negativas de las membranas celulares de las especies bacterianas. Zheng y Zhu (2003) mencionan que el mecanismo de acción del quitosano es diferente para las Gram negativas y las Gram positivas. Para el caso *S. aureus* la actividad antimicrobiana pudo haberse incrementado por el grado de desacetilación del quitosano, el cual puede formar en la superficie de la célula una membrana polimérica, la cual inhibe la entrada de los nutrientes a la célula. Y a medida que el grado de desacetilación disminuye, hay una mayor actividad antimicrobiana contra las especies Gram negativas, en donde el quitosano de bajo peso molecular entra a la célula mediante pervasión, en este estudio el utilizar quitosano con un grado de desacetilación mayor presentó una baja actividad antimicrobiana contra especies Gram negativas (*Salmonella* y *E. coli*). El efecto antimicrobiano de los RCQ se ven incrementados con la presencia de extractos como lo menciona Dutta et al. (2011), en este estudio la mezcla de RCQM, tuvo un efecto sinérgico para *S. aureus*.

6.2.1.2 Análisis Microbiológicos

Los resultados en las variaciones de los diferentes microorganismos presentes en *Cyprinus carpio* durante el almacenamiento en refrigeración se presentan en la Figura 9.

Los valores iniciales de mesófilos aerobios (Fig 9a) para los diferentes tratamientos en el filete de carpa se encuentran en 4,7. Se observó que el incremento de cuentas viable total (TVC) en el músculo de pescado a los 4 días en control (C) fue de 7,3 alcanzando el límite máximo recomendado de 7 Log₁₀ UFC/g en pescado crudo (Sallam, 2007), mientras que para la muestra C + RC alcanzó este límite en el séptimo día, para las muestras C + RCQ y C + RCQM en el noveno día, lo que indica una prolongación de la vida de anaquel de cinco días, coincidiendo con lo reportado por Ojagh et al. (2010) y Li et al. (2012).

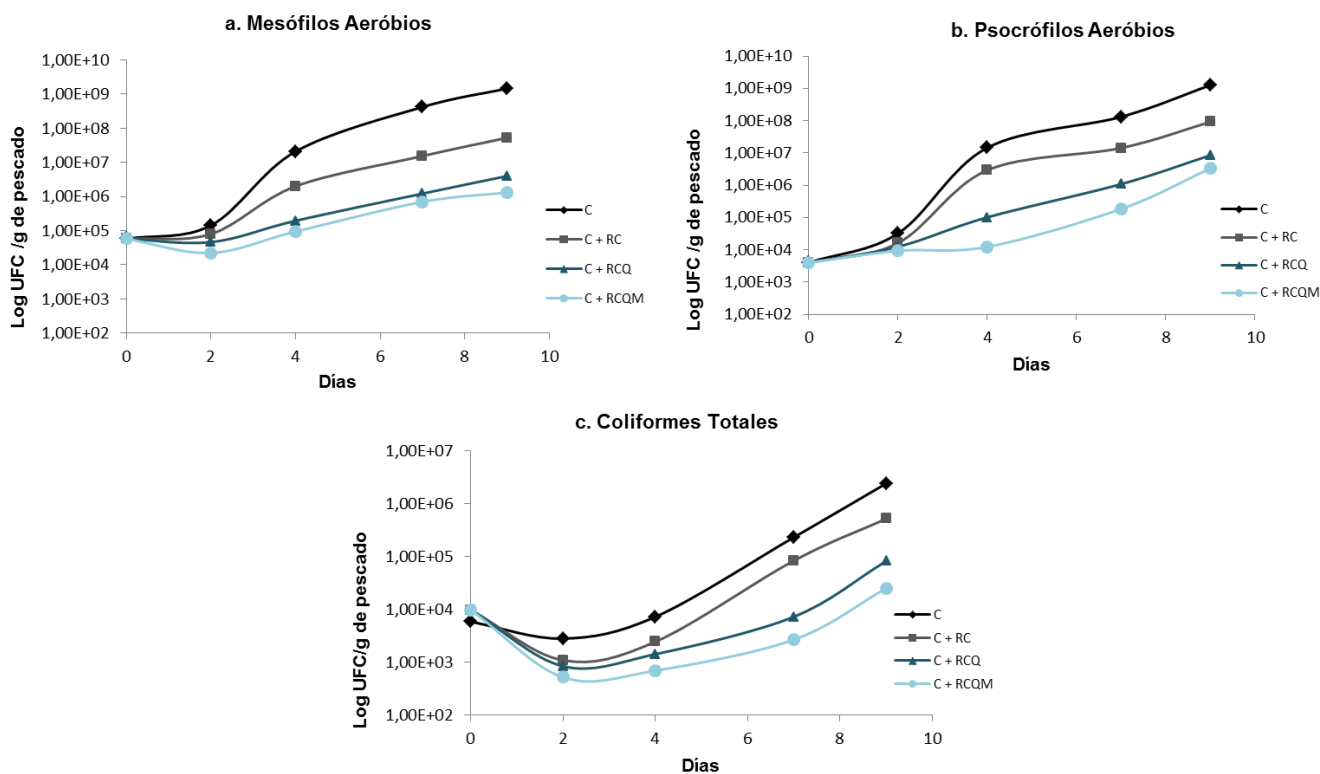


Fig. 9. Cambios en las características microbiológicas en filete de carpa común, durante el almacenamiento en refrigeración a 4°C. por nueve días. Los resultados son el promedio de tres repeticiones (C) lote control, (C +RC) filete de carpa con Recubrimiento Comestible base, (C + RCQ) Lote de filete de carpa con recubrimiento adicionado con quitosano, (C + RCQM) Lote de filete con recubrimiento adicionado con mezcla quitosano + menta. Se presentan resultados de muestras por triplicado.

Los psicrófilos son uno de los principales microorganismos responsables del daño del pescado almacenado en refrigeración (Sallam, 2007). En este estudio se observa un incremento en la cuenta total de psicrófilos (CTP) (Fig. 9b) a partir del segundo día, siendo el tratamiento C el que presentó mayor incremento durante el almacenamiento obteniéndose cuentas de hasta 9.1, mientras que para las muestras adicionadas con quitosano fueron de 6.9 para C + RCQ y de 6.5 para C + RCQM, coincidiendo con el comportamiento de psicrótrofos Gram negativos reportado por Li et al. (2013) y Sallam (2007), siendo los psicrófilos un grupo incluidos dentro de los psicrótrofos (ICMSF, 2011).

Para el caso de coliformes (Fig. 9c), el control alcanzó al final del almacenamiento cuentas de 6,3 Log 10 UFC/g, mientras que los tratamientos con recubrimiento no alcanzaron estos valores durante el periodo de almacenamiento, siendo C + RCQM quien presentó la menor cuenta (4,4 Log UFC/g).

El quitosano es ampliamente reconocido por sus propiedades antimicrobianas, esto puede ser debido a las interacciones entre las cargas positivas de la molécula y las cargas negativas de las cargas negativas de las

membranas, lo cual induce una fuga de proteínas celulares y otros constituyentes intracelulares (Li et al., 2013), adicionalmente, los RC adicionados con quitosano actúan como barrera del oxígeno que pueden inhibir el crecimiento de las bacterias aerobias, mientras que los extractos de menta funcionan como coadyuvantes en la inhibición bacteriana ya que la presencia del extracto de menta permitió la disminución en las cuentas durante el almacenamiento (Fig. 1a). De acuerdo a Al-Hadi (2011), esto podría deberse a los componentes de la menta presentes en el extracto acuoso (mentol, mentona, y algunos taninos). Adicionalmente la disminución en el número de CVT, CPT y coliformes para C+RC, puede ser debido al suero de leche que integra al recubrimiento comestible, Motalebi & Seyfzadeh (2011) observaron dicha actividad antimicrobiana para especies Gram negativas y Gram positivas.

6.2.2 Cambios Fisicoquímicos

6.2.2.1 Solubilidad, pH y contenido BVT-N

Cercano al punto isoeléctrico de la proteína, la solubilidad generalmente aumenta con la hidrólisis, ya que es principalmente el resultado de la reducción en peso molecular y del aumento en el número de grupos polares (Benitez, Ibarz, & Pagan, 2008), en el presente estudio todos los tratamientos presentaron un incremento durante el almacenamiento como se muestra en la figura 10a, siendo mayores en carpa sin recubrimiento (C) obteniéndose valores hasta 46.7 mg proteína SN/ mg total proteína, es posible observar valores significativamente bajos ($p < 0,05$) en los tratamientos con recubrimiento, $C + RC > C + RCQ > C + RCQM$ respectivamente, teniendo éste último valores de 29,1 mg proteína SN/ mg total proteína al final del almacenamiento.

Este incremento en la solubilidad se podría deber al debilitamiento de los enlaces fibrosos en la estructura muscular (Mehta, Elavarasan, Reddy & Shamasundar, 2014). Los resultados muestran que independientemente del tipo de recubrimiento, estos llevan a cabo una actividad protectora sobre las proteínas del músculo, siendo $C + RCQM$, quien presentó mejor efecto protector durante el almacenamiento en refrigeración, esto puede deberse a la disminución metabólica microbiana (Fig 9) y/o enzimática, evitando con esto la pérdida de proteínas estructurales.

Los cambios de los valores de pH durante los 10 días de almacenamiento en frío, se muestran en la figura 10b, el pH inicial de las muestras fue de 5,74. Los valores iniciales de pH, son diferentes de acuerdo a la especie, dieta, estación y nivel de estrés en la captura, manteniéndose en un intervalo de 5,4 a 6,0 para las muestras con recubrimiento, mientras que para el control fue de 5,8 a 6,4.

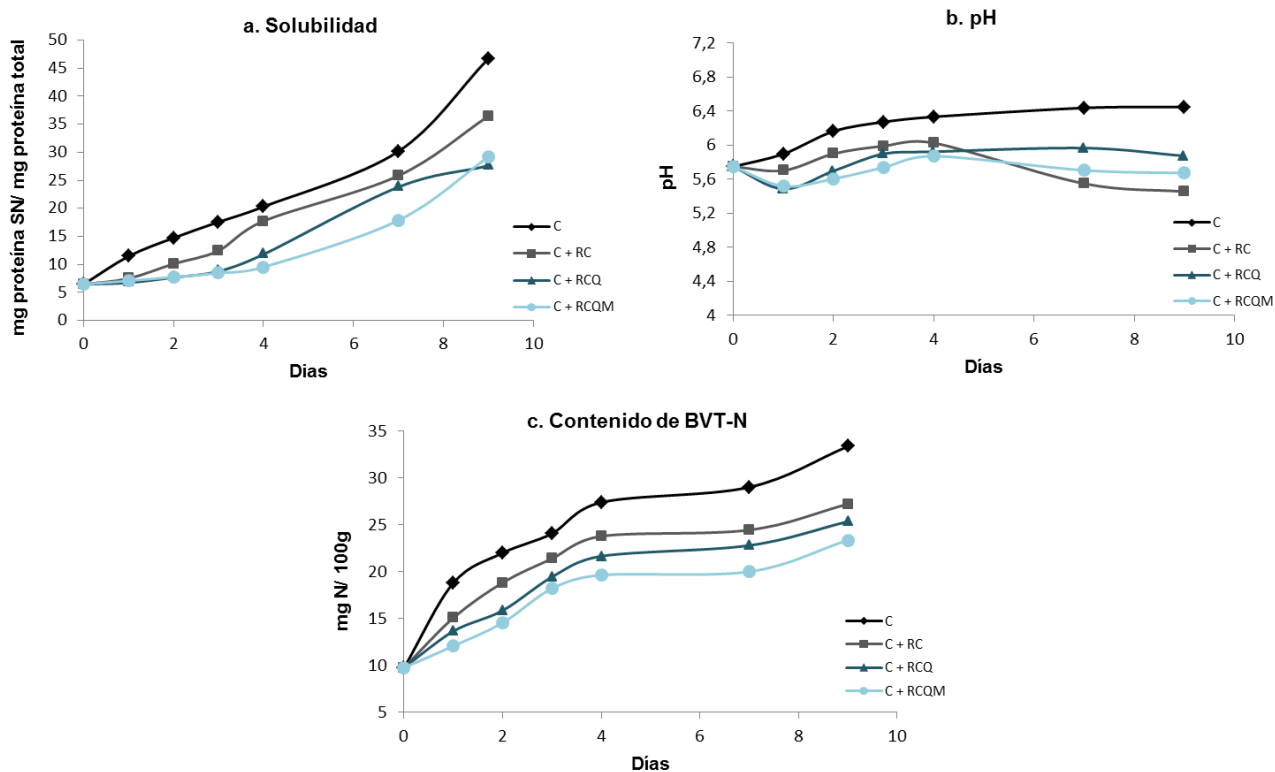


Fig.10. Cambios en las propiedades fisicoquímicas del filete durante el almacenamiento, valores de filetes de carpa común almacenada a 4°C durante 9 días. Los resultados son el promedio de tres repeticiones. (C) lote control, (C +RC) filete de carpa con Recubrimiento Comestible base, (C + RCQ) Lote de filete de carpa con recubrimiento adicionado con quitosano, (C + RCQM) Lote de filete con recubrimiento adicionado con mezcla quitosano + menta. Se presentan resultados de muestras por triplicado.

Durante el almacenamiento los valores de pH se incrementan exceptuando el primer día para las muestras con recubrimiento, esto podría ser debido al pH de la película misma, el aumento gradual del pH, puede atribuirse al incremento de las bases volátiles (Ocaño-Higuera et al., 2011; Li et al., 2012; Li et al., 2013;) reflejadas en la figura 10c, producidas por enzimas endógenas o microbianas. El valor máximo permitido para este parámetro es de 25mg N/100g de músculo de pescado propuesto por Giménez, Roncales y Beltrán (2002). En este estudio los valores de BVT-N reportan un incremento a partir de un valor inicial 9,7 hasta 33,3 en la muestra control (C), 27,2 para C + RC, 25,3 para C + RCQ y de 23,3 para C + RCQM, en el décimo día de almacenamiento, por lo que las muestras con recubrimiento con quitosano, evitan el deterioro hasta por 5 días más. La producción de amoníaco, dimetilamina, trimetilamina y formaldehído es causado por bacterias de deterioro, enzimas autolíticas y desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos, por lo que cuentas altas de CVT, favorecen la formación de estos compuestos.

En el presente estudio, las muestras con recubrimiento presentan cuentas menores en CVT (Fig 9^a) y por lo tanto la producción de BVT-N es menor (Fan, Sun, Chen, Qiu, Zhang, & Chi, 2009; Ojagh, 2010).

6.2.3 Capacidad Antioxidante

Los compuestos fenólicos del extracto acuoso de menta fueron de 505.55 mg AGE/g de hojas secas, observándose una capacidad antioxidante de 98.78% en el extracto acuoso, y del 81.88% en el recubrimiento, lo que permite su uso como coadyuvante en la prevención de la oxidación de los compuestos proteínicos y lipídicos del pescado. La comparación de la actividad antioxidante aunque es reportada en diversos artículos (Kanatt et al., 2008; Al-Hadi, 2011; Sampels, 2013;), es complicada, ya que los datos son significativamente influenciados por el método de extracción y el método analítico para la determinación, coincidiendo con lo reportado por Kanatt et al. (2008), quien reporta un % de inhibición del 85%, Singh et al. (2015), reporta un % de inhibición del 70.3%.

6.2.4 Oxidación de lípidos y proteínas

La cuantificación de hidroperóxidos se emplea para determinar la formación de los productos primarios de la oxidación lipídica durante el periodo de almacenamiento (Li et al., 2012). El efecto del recubrimiento sobre el contenido de hidroperóxidos se muestra en la figura 11a. Los resultados mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) en las muestras durante el tiempo de almacenamiento, de 0.35 a 1.7 mM de HPOx /mg de proteína para el control, de 1.4 para C+RC, 1.27 para C+RCQ y 1,16 para C+RCQM, los resultados muestran que el recubrimiento con quitosano y la mezcla quitosano-menta, fueron significativamente efectivos ($p < 0.05$), retardando la producción de hidroperóxidos durante la refrigeración, disminuyendo la oxidación lipídica. Resultados similares fueron reportadas para otras especies al emplear quitosano (trucha, arañque y bacalao del atlántico (Ojagh et al., 2010; Li et al., 2012; Nowzari et al., 2013). Los recubrimientos con quitosano, muestran una buena barrera a la permeabilidad del oxígeno, retardando la difusión del oxígeno ambiental hacia la superficie de la carne de pescado (Nowzari et al., 2013).

Los valores de TBA se emplean ampliamente para reconocer le grado de oxidación lipídica, en la segunda etapa de la autooxidación donde peróxidos e hidroperóxidos son oxidados a aldehídos y cetonas. En este estudio los valores de TBA de las diferentes muestras se incrementan durante el almacenamiento en refrigeración (Figura 11b), obteniéndose valores finales de 33.44, 31.88, 29.40 y 29.21 de mM MDA/mg

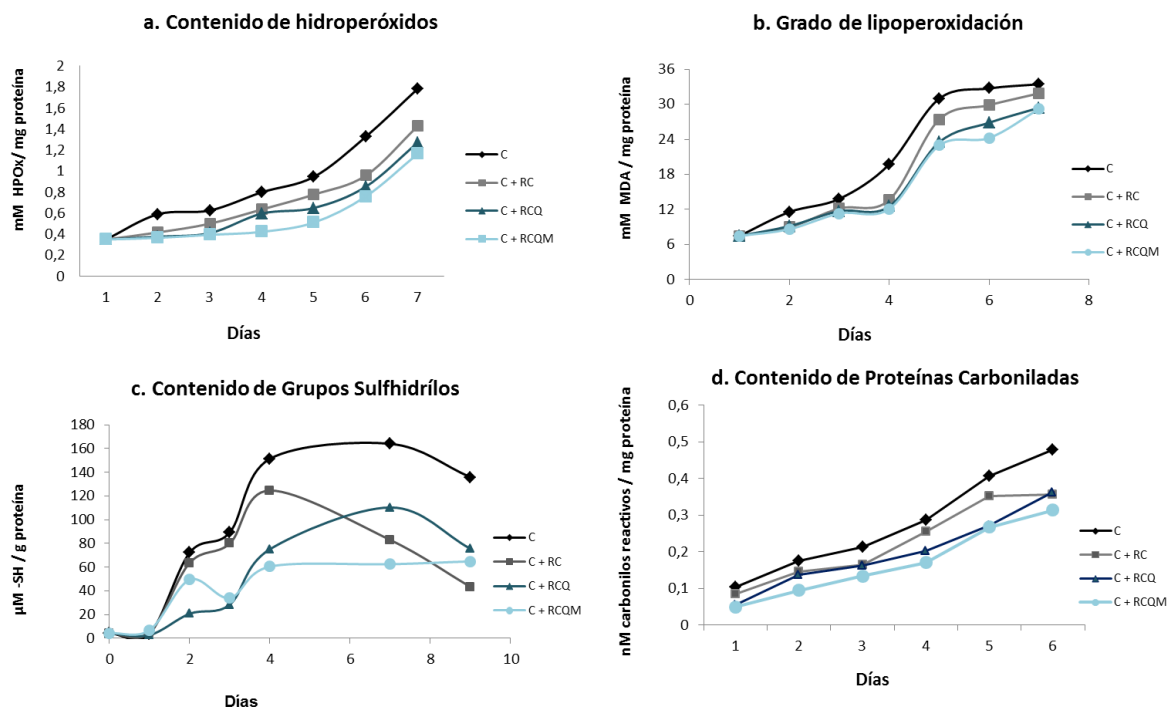


Fig.11. Cambios en los productos de oxidación lipídica y proteínica del filete de carpa común durante el almacenamiento, valores de filetes de carpa común almacenada a 4°C durante 9 días, donde; a. Contenido de hidroperóxidos, b. Grado de lipoperoxidación, c. Contenido de proteínas carboniladas y d. Contenido de grupos sulfhidrilo. Los resultados son el promedio de tres repeticiones. (C) lote control, (C +RC) filete de carpa con Recubrimiento Comestible base, (C + RCQ) Lote de filete de carpa con recubrimiento adicionado con quitosano, (C +RCQM) Lote de filete con recubrimiento adicionado con mezcla quitosano + menta. Se presentan resultados de muestras por triplicado.

de proteína para C, C+RC, C+RCQ y C+RCQM respectivamente, siendo el recubrimiento adicionado con la mezcla quitosano-menta quien mostró mejor efecto protector, esto podría ser debido al mecanismo antioxidante del quitosano que forma una fluorósfera estable con los aldehídos y las cargas positivas de los grupos primarios amino que lo componen, adicionalmente, de funcionar como quelantes de iones metálicos evitando así la oxidación lipídica, mientras que el contenido de taninos en el extracto acuoso de menta, puede romper la cadena de formación de radicales libres al donar protones de átomos de hidrogeno (Ojagh et al, 2010), teniendo un efecto sinergista en la actividad antioxidante.

Intermediarios es la oxidación lipídica y de factores externos como manipulación, ruido y estrés que pueden formar especies reactivas de oxígeno llevando a la oxidación proteínica (Estévez, 2011) lo cual se observa directamente con el incremento durante el almacenamiento de las proteínas carboniladas (Figura 11d)

El contenido de grupos sulfhidrilo indican cambios conformacionales en las proteínas durante el almacenamiento en frío, la disminución de éstos indican la formación de enlaces disulfuro (Eymard, Baron, & Jacobsen, 2009), en el contenido de sulfhidrilo se observa una fuerte disminución después del cuarto día de almacenamiento (Figura 11c), siendo el recubrimiento con la mezcla, quitosano-menta, el cual tuvo un efecto protector presentando mayor estabilidad durante el almacenamiento, seguido por el recubrimiento con quitosano.

6.2.5 Cambios estructurales

Debido a que la oxidación proteínica puede producir enlaces covalentes entre proteínas, e incluso la fragmentación de éstas, se llevó a cabo una electroforesis para detectar cambios en las PM de carpa común durante el almacenamiento en refrigeración (Figura 12), algunos cambios se observan en el control y los tratamientos, para el control después del almacenamiento se observa la desaparición de las bandas de paramiosina, para el caso de las muestras con recubrimiento se observa un comportamiento similar al control, para las muestras C+ RCQ y C + RCQM, se observa un efecto protector para esta proteína observándose bandas mejor definidas.

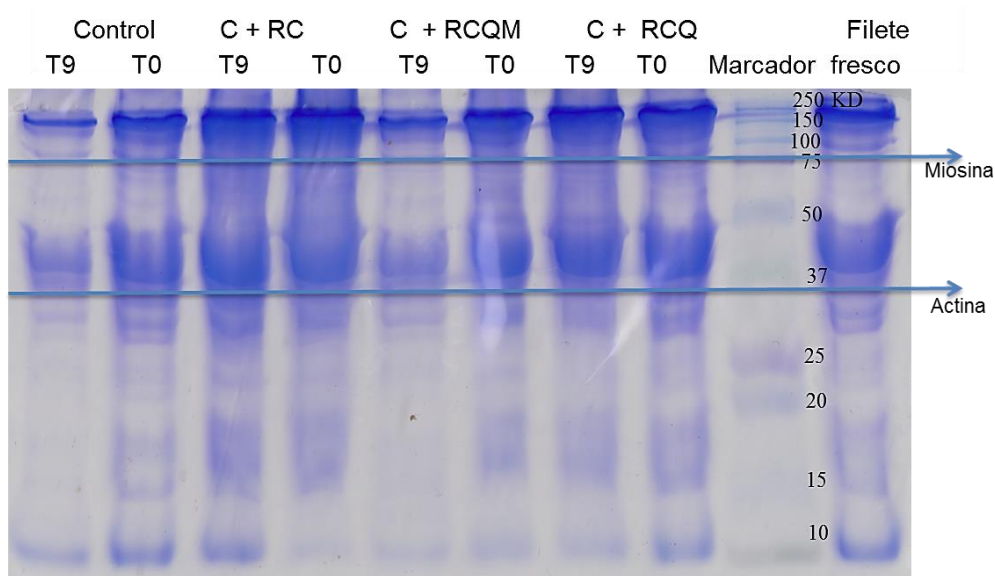


Fig. 12. Electroforesis de carpa común almacenada a 4°C. Control, (C + RC) Carpa con recubrimiento base, (C+ RCQ) Carpa con recubrimiento adicionado con quitosano, (C + RQM) Carpa con recubrimiento adicionado con mezcla de quitosano-menta. T0 y T9, indican del primer al noveno día de almacenamiento.

7 CONCLUSIONES

El uso de RC adicionados con quitosano permite mantener las características fisicoquímicas y nutrimentales de la carpa común por más tiempo durante el almacenamiento, disminuyendo la pérdida de humedad, crecimiento microbiano, y velocidad de oxidación lipídica y proteínica, evidenciado en los productos de oxidación (hidroperóxidos, lipoperoxidación y proteínas carboniladas) así como en el índice de aminoácidos presentes en el filete de carpa común con RC, ya que presenta un efecto protector sobre lisina, siendo una excelente alternativa como coadyuvante en la conservación por congelación de especies acuícolas de importancia económica a nivel mundial.

Adicionalmente, el almacenamiento en refrigeración ha probado ser una técnica efectiva en la prolongación de la vida útil del pescado, el empleo de recubrimientos comestibles con quitosano, y la mezcla quitosano-menta empleada en el presente trabajo, ha mostrado un efecto protector, extendiendo hasta 3 días más las propiedades fisicoquímicas y hasta 4 días más, las características microbiológicas consideradas aptas para su consumo, la combinación de esta tecnología de preservación tiene una amplia aplicación en almacenamiento en refrigeración.

8 REFERENCIAS

- Ahmad, M., S. Benjakul, P. Sumpavapol, Prakash, N, (2012). Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil, *International Journal of Food Microbiology*, 155, 171–178.
- Al-Hadi, L.M. (2011). The antibacterial activity of aqueous extract of peppermint and Bay leaf against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Baghdad College of Dentistry*, 23(2), 146-150.
- Ali Arfat, Y., Benjakul, S., Prodpran, T., & Osako, K. (2014). Development and characterization of blend films based on fish protein isolate and fish skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 39, 58-67.
- Analytical Methods Committee (AMC) of the Royal Society of Chemistry in 1979. *Analyst*, 104, 434.
- AOAC. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemistry. (1984) Association of Official Analytical Chemists, 14th ed, EUA.
- AOAC. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemistry. (2000). Association of Official Analytical Chemist, 14th ed, EUA
- Asgharzadeh, A., Shabanpour, B., Aubourgb, S.P., & Hosseinic, H. (2010). Chemical changes in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) minced muscle during frozen storage: Effect of a previous washing process, *Grasas y Aceites*, 61 (1), 95-101.
- Benítez, R., Ibarz, A., Pagan, J. (2008). Protein hydrolysates: processes and applications. *Acta Bioquím Clínica Latinoamericana*, 42 (2), 227-36.
- Bonilla, J., Atarés, L. Vargas, M., & Chiralt, A., (2012). Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering*, 110, 208–213.
- Bonilla, J., Talón, E. Atarés, L. Vargas, M., Chiralt, A., (2013). Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch–chitosan films. *Journal of Food Engineering*, 118, 271–278.
- Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Cerqueira. M.A., Rocha, C.M.F., Avides, M.C., Quintas, M.A.C., & Vicente, A.A. (2011). Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering*, 106, 111–118.

- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method, *British Journal of Nutrition*, *108*, S183–S211.
- Büege, J.A., & Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods of Enzymology*, *52*, 302-310.
- Burcham, P.C. (2007). Modified protein carbonyl assay detects oxidized membrane proteins: A new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *Journal of Pharmacology and Toxicology Methods*, *56*, 18–22.
- Cheret, R., Delbarre-Ladratb, C., Lamballerie-Antona, M., & Verrez-Bagnisb, V. (2007). Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry*, *101* (4), 1474-1479.
- Ciampa, A., G. Picone, G., Laghi, L., Nikzad, H., & Capozzi, F., (2012). Changes in the amino acid composition of bogue (*Boops boops*) fish during storage at different temperatures by 1H-NMR spectroscopy. *Nutrients*, *4*, 542-553, 2012.
- Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C., & Fuentes, R., (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control*, *22*, 485-489.
- Connell, J.J., (3rd Ed). (1990). Methods of assessing and selecting for quality. In *In control of fish quality*. Berlin, Germany: Springer, 1990.
- Conway, E.J., & Byrne, A. (1936). An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances I. The micro-determination of ammonia. *Journal of Biochemistry*, *27*, 419–429.
- Davies, M.J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1703*, 93–109.
- Dublan-García, O., Cruz-Camarillo, R., Guerrero-Legarreta, I., & Ponce-Alquicira, E. (2006). Effect of refrigerated storage on proteolytic activity and physicochemical and microstructural properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *Journal of Muscle Foods*, *17*, 291–310.
- Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, *114*, 1173–1182.
- Einen, O., Guerin, T., Fjaera, S.O., & Skjervold, P.O. (2002). Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon, *Aquaculture*, *212*, 129–140.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *82*, 70-77.

- Estevez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, 89, 259–279.
- Eymard, S., Baron, C.P., & Jacobsen, C. (2009). Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chemistry*, 114, 57–65.
- Falowo, A.B., Fayemi, P.O., Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 64, pp. 171–181, 2014.
- Fan, W. J., Sun, J. X., Chen, Y. C., Qiu, J., Zhang, Y., & Chi, Y. L. (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, 115, 66-70.
- FAO (2014a) Species Fact Sheets: *Cyprinus carpio*, en Fisheries and Aquaculture Department recuperado el 20 de Abril del 2014 en <http://www.fao.org/fishery/species/2957/en>.
- FAO (2014b) Species Fact Sheets: *Salmon salar*, en Fisheries and Aquaculture Department recuperado el 20 de Abril del 2014 en <http://www.fao.org/fishery/species/2929/en>.
- Fernández-Saiz P., Sánchez, G., Soler. C., Lagaron, J.M., Ocio, M.J. (2013). Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. *Food Control*, 34, 61-68.
- Freyre, M.R., Piagentini, A.M., & Espíndola, B.I. (2009). Calidad nutricional del pescado de agua dulce. En: Tecnología de productos de origen acuático. México, México: Limusa. 3-220.
- García Argueta. (2013) Tesis. Efecto de un recubrimiento comestible adicionado con *Lactobacillus casei shirota*, sobre las características fisicoquímicas, texturales, y sensoriales de una galleta tipo habanera. México, Mexico:UAEMex.
- Gao, L., Oomah, B. D., & Mazza, G. (2002). Wheat quality: antioxidant activity wheat millstreams. In: *Wheat quality elucidation*. St. Paul, MN: AACC International, AACC Press. 219-233
- García-Argueta, I., Quintero-Salazar, B., Dominguez-Lopez, A., Gómez-Oliván, L.M., Díaz-Bandera, D., & Dublán-García, O. (2016). Effect of edible coating based on whey, inulin and gelatine with *Lactobacillus casei* on the textural and sensorial properties of a cracker cookie. *Journal of Probiotics and Health*, 4,153.
- Gialamas, H., Zinoviadou, K.G., Biliaderis, C.G., Koutsoumanis, K.P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43, 2402–2408.
- Giménez, B., Roncalés, P., & Beltrán, J.A. (2002). Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1154–1159.

- Giménez, B., Moreno, S., López-Caballero, M.E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M.C. (2013). Antioxidant properties of green tea extract incorporated to fish gelatin films after simulated gastrointestinal enzymatic digestion. *Food Science and Technology*, 53, 445-451.
- Godiksen, H., Morzer, M., Hyldeg, G., Jessen, F. (2009). Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*, 113, 889–896.
- Gornall, A.J., Bardawill, C.J., & David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Biological chemistry*, 177, 751-766.
- Hosseini, S.F., Rezaei, M., Zandi, M., & Ghavic, F.F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 136, 1490-1495.
- Huang, J., Chen, Q., Qiu, M., Li, S., (2012). Chitosan-based edible coatings for quality preservation of postharvest whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Science*, 77 (2), 491-496.
- Huss, H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries technical paper No. 348, En Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 202.
- ICMSF “International Commission on Microbiological Specification for Foods” (2nd ed). (1986). Microorganisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. Buffalo, NY: University of Toronto Press.
- Indergard, E., Tolstorebrov, I., Larsen, H., Eikevik, I.M., (2014). The influence of long-term storage, temperature and type of packaging materials on the quality characteristics of frozen farmed Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *International Journal of Refrigeration*, 4 (I),27-36.
- INEGI. (2011). El sector alimentario en México, 2010. Serie Estadísticas Sectoriales. Recuperado el 15 de abril de 2014 en http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/SAM/2010/sam2010.pdf
- Jeon, Y.J., Janak, Y.V. A. & Shahidi F., (2002) Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5167-5178.
- Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., & Wolff, S.P. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analisis of Biochemistry*, 202, 384-389.

- Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry*, *107*, 845–852.
- Kilinceker, O., Dogan, I.S., Kucukoner, E. (2009). Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. *Food Science and Technology*, *42*, 868–873.
- Kjaersgard, I.V.H, Nørrelykke, M.R., Baron, C.P., & Jessen F., (2006). Identification of carbonylated protein in frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets and development of protein oxidation during frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 9437–9446.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor, general properties. *Journal of General Physiology*, *30*, 291-310
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature*, *227*, 680–685.
- Latou, E., Mexis, S.F., Badeka A.V. (2014). Combined effect of chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken breast fillets. *Food Science and Technology*, *55*, 263-268,
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods of Enzymology*, *233*, 346-357.
- Li, T., Hub, W., Li, J., Zhang, X., Zhu, J., & Li, X. (2012). Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Food Control*, *25*,101-106.
- Li, T., Li, J., Hu, W., & Li, X. (2013). Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. *Food Chemistry*, *138*, 821–826.
- Liu, D., Liang, L., Xia, W., Regenstein, J.M., & Zhou, P. (2013). Biochemical and physical changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets stored at -3 and 0 °C. *Food Chemistry*, *140*, 105–114.
- Liu, Q., Kong, B., Han, J., Chen, Q., & He, X. (2014). Effects of superchilling and cryoprotectants on the quality of common carp (*Cyprinus carpio*) surimi: Microbial growth, oxidation, and physiochemical properties. *Food Science and Technology*, *57*,165 -171.
- Lopez-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, *19*, 303–311

- Lund, M., Heinonen, M., Baron, C., & Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition Food Research*, 55, 83–95.
- Martínez-Damián, M.T., Cruz-Álvarez, O., Beryl Colinas-León, M.T., Rodríguez-Pérez, J.E., Ramírez-Ramírez, S.P. (2013). Actividad enzimática y capacidad antioxidante en menta (*Mentha piperita* L.) almacenada bajo refrigeración. *Agronomía Mesoamericana*, 24(1), 57-69.
- Mckay D.L., & Blumberg J.B. (2006). A review of the Bioactivity and potential health benefits of Peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20 (8), 619-633.
- Mehta, N.K., Elavarasan, K., Reddy, A.M., & Shamasundar, B.A. (2014). Effect of ice storage on the functional properties of proteins from a few species of fresh water fish (Indian major carps) with special emphasis on gel forming ability. *Journal of Food Science and Technology*, 51 (4), 655–663.
- Miliauskas G; Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85, 231-237.
- Mohan, C.O., Ravishankar, C.N., Lalitha, K.V., Srinivasa Gopal, T.K. (2012). Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. *Food Hydrocolloids*, 26, 167-174.
- Motalebi, A. & Seyfzadeh, M. (2011). Effects of whey protein edible coating on bacterial, chemical and sensory characteristics of frozen common Kilka (*Clupeonellia delitula*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11(1) 132-144.
- Nadarajah, K. (2005). Development and characterization of antimicrobial edible films from crawfish chitosan. Partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- Ngapo, T., Wilkinson, B., Chong, R. & Haisman, D. (1992). Gelation of bovine myofibrillar protein induced by 1, 5 Gluconolactone. En 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand, Francia. 1095-1098.
- Nickavar, B; Alinaghi, A; Kamalinejad, M. (2008). Evaluation of the antioxidant properties of five mentha species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 203-209.
- NMX-F-317- S-1978 “Determinación de pH en Alimentos” Normas Mexicanas. Dirección General De Normas: México.

- NOM-092-SSA1-1994, Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa, Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. 12-12-1995, México.
- NOM-110-SSA1- 1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Normas Oficiales Mexicanas. Dirección General de Normas: México.
- NOM-111-SSA1-1994, Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Dirección General de Normas: México.
- NOM-113-SSA1-1994, Método para la Cuenta de microorganismos Coliformes Totales en placa. Normas Oficiales Mexicanas. Dirección General de Normas: México.
- Nowzari, F., Shábanpour, B., & Ojagh, S.M. (2013). Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, *141*, 1667–1672.
- Ocaño-Higuera¹, V.M., Maeda-Martínez, A.N., Lugo-Sánchez, M.L., & Pacheco-Aguilar, R. (2006) Postmortem biochemical and textural changes in the adductor muscle of catarina scallop stored at 0 °C. *Journal of Food Biochemistry*, *30*, 373–389.
- Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H.M., & Hosseini, S.M.H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, *120*, 193–198.
- Olafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschager, J., Dalgaard, G.P., Jensen, B., Undelandd, I., Mackiee, I.M., Henehanf, G., Nielsenc, J., & Nilseng, H. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*, *8*, 258-265.
- Ouali, A. & Valin, C. (1980). Effect of muscle lysosomal enzymes and calcium activated neutral proteinase myofibrillar ATPase activity relationship with ageing changes. *Meat Science*, *5*, 233.
- Owen, J.E., Nuñez, F.A., Arias, M.T., De Cano, R., & Rios, O. (1982). Manual De Prácticas de Cursos de Tecnologías de la Carne. Facultad de Zootecnia, Universidad de Chihuahua, Chihuahua, Mexico.
- Pamplona R. (2011). Advanced lipoxidation end-products. *Chemico-Biological Interactions*, *192*, 14–20.
- Parvez, S, & Raisuddin, S. (2005). Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *20*, 112-117.
- Pazos, M., Maestre, R., Gallardo, J.M., Medina, I. (2013). Proteomic evaluation of myofibrillar carbonylation in chilled fish mince and its inhibition by catechin. *Food Chemistry*, *136*, 64–72.

- Pilosof, A.M. (2000). Solubilidad, in: A.M.R and Barholomai, G.B. (Edirs). Caracterización funcional y estructural de proteínas. Edit. Ceudeba CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo). 60-75.
- Ranilla, L. G., Kwon, Y. I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2010). Phenolic compounds antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, *101*(12), 4676–4689.
- Sabine Sampels (2013). Oxidation and Antioxidants in Fish and Meat from Farm to Fork, Food Industry, Dr. Innocenzo Muzzalupo (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/53169. Disponible en:
<https://www.intechopen.com/books/food-industry/oxidation-and-antioxidants-in-fish-and-meat-from-farm-to-fork>
- Sallam, K.I. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, *18*, 566–575.
- Sánchez-Alonso, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., & Borderías, A.J. (2008). Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. *LWT*, *41*, 42–50.
- Sebti, I., Coma, V., (2002). Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. *Carbohydrate Polymers*, *49* (2), 139–144.
- Singh, R., Shushni, M.A.M., & Belkheir, A. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, *8*, 322-328.
- Skibniewska, K.A., Zakrzewski, J., Kłobukowski, J., Białowiąs, H., Mickowska, B., Guziur, J., Walczak, Z. & Szarek, J. (2013). Nutritional Value of the Protein of Consumer Carp *Cyprinus carpio* L. *Czech Journal of Food Science*, *31* (4), 313–317.
- Soares N.M., Mendes, T.A. & Vicente, A.A. (2013). Effect of chitosan-based solutions applied as edible coatings and water glazing on frozen salmon preservation – A pilot-scale study. *Journal of Food Engineering*, *119*, 316–323.
- Soares, N.M, Oliveira, M.S.G., & Vicente A.A. (2015). Effects of glazing and chitosan-based coating application on frozen salmon preservation during six-month storage in industrial freezing chambers. *LWT-Food Science and Technology*, *61*, 524-531.
- Soazo, M., Pérez, L.M., Rubiolo, A.C., & Verdini, R.A. (2013). Effect of freezing on physical properties of whey protein emulsion films. *Food Hydrocolloids*, *31*, 256-263.

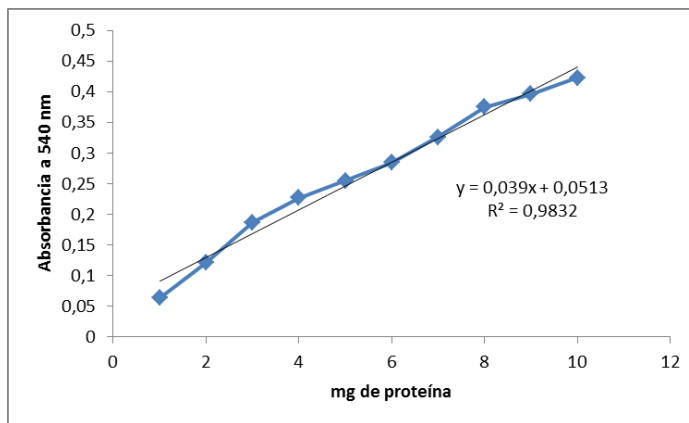
- Soriano, S.J. (2009). Calidad nutricional del pescado. En: Tecnología de productos de origen acuático. México, México: Limusa.
- Souza, B.W.S, M.A. Cerqueira, H.A. Ruiz (2010). Effect of chitosan-based coatings on the shelf life of salmon (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58, 11456–11462.
- Teixera, B., Fidalgo, L., Mendes, R., Costa, G., Cordeiro, C., Marques, A., Saraiva, J.A., & Nunes, M.L. (2013). Changes of enzymes activity and protein profiles caused by High-Pressure processing in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Fillets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2851–2860.
- Tokur, B. & Korkmaz, K. (2007). The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish. *Food Chemistry*, 104, 754–760.
- Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., & Adamczyk, M. (2009). Protein quality and amino acid profiles of fish products available in Poland. *Food Chemistry*, 119, 139-145.
- Wang, P., Vang, B., Pedersen, A., Martinez, I., & Olsen, R. (2011). Post-mortem degradation of myosin heavy chain in intact fish muscle: Effects of pH and enzyme inhibitors. *Food Chemistry*, 124, 1090–1095.
- Yamaguchi, T., Yamashita, Y., Takeda, I., & Kiso, H. (1982). Proteolytic enzymes in green asparagus, kiwifruit occurrence and partial characterization. *Agricultural and Biological Chemistry*. 46, 1983-1986.
- Zheng, L. Y., & Zhu, J. F. (2003). Study of antimicrobial activity of chitosan with different molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 527–530.
- Zheng, W., & Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49 (11), 5165–5170.
- Zhong, Y., Li, Y., Zhao, Y., (2012) Antibacterial properties of β -chitosan and kudzu starch composite films. *Journal of Food Science*. 77 (10), 280-286.

9 Anexos

9.1 Anexo 1. Curva patrón de sero-albúmina

Para la curva patrón se preparó una disolución acuosa de sero-albúmina de 10 mg/mL.

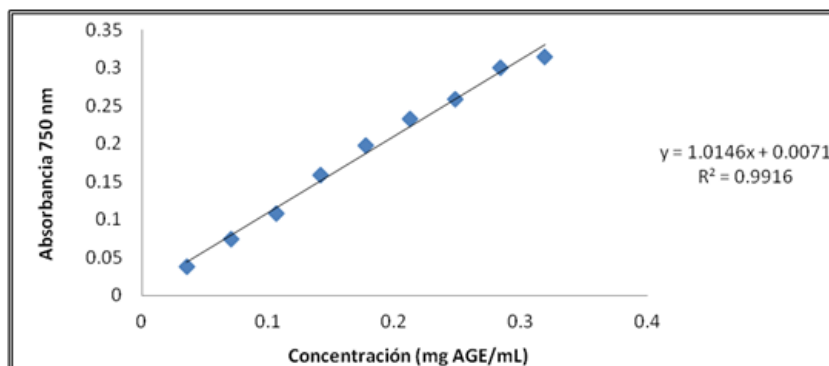
Concentración mg/mL	Absorbancia
1	0,063
2	0,121
3	0,187
4	0,227
5	0,255
6	0,284
7	0,326
8	0,375
9	0,396
10	0,423



9.2 Anexo 2. Curva patrón para determinación de polifenoles con ácido gálico

Para la curva patrón se preparó una disolución alcohólica de ácido gálico (0.354mg/mL), realizando las correspondientes diluciones para obtener las concentraciones que se muestran a continuación:

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
0.0354	0.038
0.0708	0.074
0.1062	0.108
0.1416	0.159
0.177	0.197
0.2124	0.232
0.2478	0.258
0.2832	0.3
0.3186	0.314



9.3 Anexo 3. Productos de Investigación

9.3.1 Artículo publicado

9/5/2017

Mail - gabrielamorachis@hotmail.com

Your article has been published

Amany Hemedda <amany.hemedda@hindawi.com>

Mon 5/29/2017 2:16 AM

To: gabrielamorachis@hotmail.com <gabrielamorachis@hotmail.com>;

Dear Dr. Morachis-Valdez,

I am pleased to let you know that your article has been published in its final form in "International Journal of Food Science."

Ana Gabriela Morachis-Valdez, "Effect of Chitosan Edible Coating on the Biochemical and Physical Characteristics of Carp Fillet (*Cyprinus carpio*) Stored at -18°C," International Journal of Food Science, vol. 2017, Article ID 2812483, 10 pages, 2017. doi:10.1155/2017/2812483.

You can access this article from the Table of Contents of Volume 2017, which is located at the following link:

<https://www.hindawi.com/journals/iifs/contents/>

Alternatively, you can access your article directly at the following location:

<https://www.hindawi.com/journals/iifs/2017/2812483/>

"International Journal of Food Science" is an open access journal, meaning that the full-text of all published articles is made freely available on the journal's website with no subscription or registration barriers.

Best regards,

Amany Hemedda
International Journal of Food Science
Hindawi
<https://www.hindawi.com/>

Research Article

Effect of Chitosan Edible Coating on the Biochemical and Physical Characteristics of Carp Fillet (*Cyprinus carpio*) Stored at -18°C

Ana Gabriela Morachis-Valdez,^{1,2} Leobardo Manuel Gómez-Oliván,¹
Imelda García-Argueta,³ María Dolores Hernández-Navarro,¹
Daniel Díaz-Bandera,² and Octavio Dublán-García²

¹Departamento de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, MEX, Mexico

²Departamento de Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, MEX, Mexico

³Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, MEX, Mexico

Correspondence should be addressed to Octavio Dublán-García; octavio_dublan@yahoo.com.mx

Received 29 December 2016; Revised 20 March 2017; Accepted 18 April 2017; Published 28 May 2017

Academic Editor: Alejandro Castillo

Copyright © 2017 Ana Gabriela Morachis-Valdez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The effect of an edible coating (EC) with 1.5% chitosan as an additive, on common carp (*Cyprinus carpio*) fillet, was determined evaluating the biochemical, physicochemical, textural, microbiological, and nutritional characteristics periodically during its storage in the freezer (-18°C), observing a decrease in the rate of biochemical reactions related to degradation ($p < 0.05$), hydroperoxides content (HPC) (0.8324 nM hydroperoxides/mg of protein versus 0.5540 nM/mg with regard to the EC sample), as well as protein carbonyl content (PCC) (0.5860 nM versus 0.4743 nM of reactive carbonyl groups/mg of protein of noncoated material), keeping properties for a longer period of time, and a lower protein solubility (7.8 mg of supernatant protein/mg of total protein versus 6.8 mg/mg) and less loss of moisture (8% less, with regard to EC); for the nutritional characteristics of the fillet, lysine is the limiting aminoacid in the sample without EC, while leucine is the limiting aminoacid for the EC sample. According to microbial growth, the count was 2.2×10^5 CFU/g of sample in mesophiles versus 4.7×10^4 in the EC sample. The results indicate that the use of EC added with chitosan maintains the quality of the product regarding lipid and protein oxidation until fourth month of storage, maintaining moisture content without variation for at least 3 months, and inhibits microbial growth up to 2 logarithmic units, during five months of frozen storage.

1. Introduction

The quality of fish is a complex concept, in which nutritional, microbiological, biochemical, and physicochemical attributes are involved. The freshness of fish decreases after its sacrifice; this is due to microbiological contamination and various biochemical reactions which produce changes in the protein fractions [1]. Some investigations have emphasized how the lipid compounds are altered due to oxidative deterioration [2]. Proteins including the sarcoplasmic, myofibrillar, and stromal proteins are susceptible to oxidative damage by intermediates of lipid oxidation [4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE), acrolein, malondialdehyde (MDA), glyoxal, and

4-oxo-trans-2-nonenal (ONE)], isoketals and metallic ions (such as the iron in the heme group or the copper and zinc found in enzymes and metalloenzymes) present in the muscles of animals, and those originated through processing (exposure of meat to oxygen, light, and temperature, cooling, use of additives, irradiation, and vacuum-packaging) that initiate oxidative damage, generating changes in flavor, color, texture/structure, and nutritional value [1–5]. The use of low temperatures such as freezing is a general method used for the control and decrease of biochemical changes that can occur during storage time; however, this does not completely inhibit the microbiological and chemical reactions that result in the deterioration of the quality of the fish,

for which the use of edible coatings (EC) as adjuvants of preservation have demonstrated to provide an increase in shelf-life, due to their function as a barrier to oxygen, besides being employed as a vehicle of diverse components such as essential oils, bacteriocins, organic acids, and chitosan, which help in the control of oxidation and diminish the deterioration by microorganisms [6–8]. Chitosan (poly-b-(1–4)-D-glucosamine) is a versatile biopolymer, having a broad range of applications in the food industry. It has been reported to have a number of functional properties that make chitosan useful in food preservation; these include its antimicrobial activity [2] and antioxidant activity [9] and its ability to form protective films or coatings [10]. Although studies have been carried out concerning the use of chitosan as an antioxidant and/or an antimicrobial agent in EC [3, 9–11], none have thoroughly discussed its effect on nutritional properties. The purpose of this study was the use of an EC containing 1.5% chitosan in order to reduce the speed of deterioration caused by oxidation and/or microbial growth, evaluating physicochemical, textural, and nutritional properties during storage at commercial freezing temperatures (-18°C) in common carp.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation and Treatment of Fish Samples

2.1.1. Chemicals. Chitosan, medium molecular weight, deacetylation value of 75–85%, and viscosity of 200–800 cP, was purchased from Aldrich Chemical Co.

Bovine serum albumin, acrylamide, N,N'-methylene-bisacrylamide, trichloroacetic acid (TCA), FeSO_4 , sulfuric acid, cumene hydroperoxide (CHP), butylhydroxytoluene, methanol, xylene orange, di-nitrophenylhydrazine (DNPH), guanidine, ethanol, ethyl acetate, hydrochloric acid, Coomassie Brilliant Blue R-250, thioglycolic acid, NBD-Cl, and o-phthalaldehyde (OPA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

Thiobarbituric acid was purchased (TBA) from Fluka (Sigma-Aldrich, Toluca, MX); sodium chloride, EDTA disodium salt, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), Tris (base), urea, β -mercaptoethanol, glycine, acetic acid glacial, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, and copper sulfate pentahydrate were purchased from J.T. Baker (Pennsylvania, USA); sodium carbonate and lactic acid were purchased from Fermont (Monterrey, MX); sodium dodecyl sulfate (SDS) and bromophenol blue were obtained from Hycel (Mexico, MX); and plate count agar was purchased from Bioxon, Becton and Dickinson (Mexico, MX). All reagents used were of analytical grade.

2.1.2. Fish Sample Preparation. A total of 40 freshwater carps (*Cyprinus carpio*), with an average weight of 550–650 g, were purchased at Tiacaque Aquacultural Center in Toluca, State of Mexico, Mexico, and were transferred to the Food Science Laboratory in the School of Chemistry, at the Universidad Autónoma del Estado de México, and were filleted by hand using knives and cutting boards sanitized in chlorine solution

and rinsed in sterile distilled water. The fish were harvested during May 2016. Two fillets were obtained from each fish after removing the head and bone and were then immersed in the coating solution.

2.1.3. Preparation of Coating Solution and Treated Fillets. Chitosan solution was prepared with 1.5% (w/v) chitosan in 1% v/v lactic acid. To achieve complete dispersion of chitosan, the solution was stirred at 40°C for 1.5 h, on a hotplate/magnetic stirrer; the final coating forming solution consisted of 13% whey, 6% gelatin, 13% glycerol, and 4% inulin, according to Garcia-Argueta et al. [12], with a final pH of 3.5. Fillet samples were randomly assigned to two treatment batches consisting of one control batch (uncoated) and one batch treated with the coating solution. For each coated batch, approximately 20 carp fillets (12–15 cm) were immersed for 15 s in the coating solution and then allowed to stand for 1 min. Then, the fish fillets were drained on a sterile metal net and air-dried for 20 min in order to form the edible coatings, placed on polyethylene containers, and then stored at $-18 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for subsequent quality assessment in a commercial freezer (Torrey, México, MX). Chemical and microbiological analyses were performed at monthly intervals to determine the overall quality of fish, for five months.

2.2. Chemical Analyses

2.2.1. Moisture and Total Protein Analysis. Moisture content was determined by difference in weight between the fresh sample of minced fillet and the dried sample after drying in an oven at 105°C until reaching constant weight. The result is expressed as a percentage of moisture. The content of total protein was determined through the Kjeldahl method and results are expressed as g of protein/100 g of fish, as described in AOAC [13].

2.2.2. pH. 10 g of fillet muscle was weighed and homogenized at high speed in mixer/blender (Osterizer 450-20) for 1 min with 90 mL of distilled water. Connective tissue was eliminated by filtering with cloth, in accordance with that described by Owen et al. [14]. pH was determined with a digital pH meter (Conductronic pH 120, New York, USA).

2.2.3. Myofibrillar Protein Extraction. Myofibrillar protein (MP) was obtained in accordance with the methodology described by Ngapo et al. [15], with slight modifications. 100 g of common carp muscle was homogenized with a blender for 10 min with a mixture of ice-cold water 1:1:1 (w/w/v) and was then placed in an ice bath with a magnetic stirrer. The myofibrillar suspension was filtered through two layers of cloth in order to remove the connective tissue; this procedure was carried out twice. The homogenized muscle was then centrifuged at $3000 \times g$ at 4°C for 25 min and the supernatant was discarded. The protein concentration of the myofibrillar precipitate was determined using the Biuret method [16]. 25 mg/mL of MP was stored in a glass container with a lid for the formation of the gel. Gel forming was developed in two-step heating, first, incubation at 40°C for 30 min followed by

heating with a gradual increase until 90°C was reached with constant stirring and then maintaining it for 20 min. Finally glass containers were removed and stored at 4°C.

2.2.4. Solubility. According to Pilosof [17], 2 g of MP was centrifuged at 2500 ×g at 4°C for 30 min. The protein content in the supernatant was determined, as well as the total protein content in the MP sample prior to centrifugation. Solubility was defined by following equation:

$$\text{Solubility} = \frac{\text{Protein content in supernatant}}{\text{Protein content in the sample}} \times 100. \quad (1)$$

2.2.5. Total Sulfhydryl Content. The total content of sulfhydryls (SH) was determined according to the method described by Ellman [18]. An aliquot of 1 mL of MP solution (5 mg/mL) reacted with 9 mL of Tris-glycine buffer (10.4 g of Tris-HCl, 6.9 g of glycine, 480 g of urea, and 1.2 g of EDTA/L at pH 8.0) at room temperature for 30 min. 0.05 mL of Ellman reagent (4 mg DTNB/mL) was added to aliquots of 3 mL and was incubated in darkness for 30 min. The reaction mixture was measured at 412 nm using a TU-1800 spectrophotometer (Beijing Purkinje General Instrument Co. Ltd., Beijing, China). The concentration of SH was expressed as total μM SH/mg of protein.

2.2.6. Determination of Total Volatile Base (TVB-N) Content. The content of TVB-N was determined according to the Conway and Byrne method [19], with slight modifications. 5 g of the homogenized sample was added to 4% TCA in a 1:2 (w/v) ratio. Then, it was filtered through Whatman Number 1 paper (Schleicher & Schuell, Maidstone, England). 1 mL of the filtrate obtained was placed in the outer ring of the Conway Camara, while, in the inner ring, a solution of 1% boric acid containing Shiro Tashiro indicator was added. To initiate the reaction, 2 mL of K₂CO₃ was mixed with the filtrate. The camera was incubated at 25°C for 24 hr. The solution of the inner ring was titrated using 0.01 N HCl until a change in the color to a pink tone.

2.2.7. Determination of Hydroperoxides (HPC). The content of HPC was determined by the Jiang et al. method [20] (FOX—ferrous oxidation-xylenol orange). A 100 μL aliquot of supernatant was obtained by the deproteinization of the sample with 10% TCA. 900 μL of the reaction mixture was added, consisting of 25 mM H₂SO₄, 0.25 mM FeSO₄, 0.1 mM, xylenol orange, and 4 mM butyl hydroxytoluene in 90% (v/v). The mixture obtained was incubated for 60 min at room temperature and absorbance was measured at 560 nm against the reaction blank in the spectrophotometer. The results were interpolated in a normal curve previously elaborated and were expressed as nM HPC/mg protein.

2.2.8. Determination of Lipoperoxides (LPX). For the determination of LPX, the technique described by Buege and Aust thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was employed, which consists of an aliquot of 100 μL of supernatant, obtained with prior deproteinization, that was added

until 1 mL of Tris-HCl buffer solution pH 7.4 is reached. The samples were incubated at 37°C for 30 min; then 2 mL of the TBA-TCA reagent (0.375% TBA in 15% TCA) was added and thoroughly mixed using a vortex. It was taken to boiling point in a hot water bath for 45 min and was left to cool, eliminating the precipitate formed by centrifugation at 3000 ×g for 10 min. Absorbance readings were carried out at a wavelength of 535 nm against a reaction blank. The content of malondialdehyde (MDA) was calculated utilizing the molar extinction coefficient (MEC) of MDA (1.56 × 10⁵ M/cm). The results were expressed as mM MDA/mg protein.

2.2.9. Determination of Protein Carbonyl Content (PCC). The method is described by Levine et al. [21] and modified by Parvez and Raisuddin [22] and Burcham [23]. To an aliquot of 100 μL of supernatant obtained from the deproteinized sample, 150 μL of 10 mM DNPH dissolved in 2 M HCl was added, allowing for the reaction to be carried out in the dark for an hour at room temperature, placing 500 μL of 20% TCA and placing the mixture at rest for 15 min at 4°C. The sample was centrifuged at 11,000 ×g for 5 min. The precipitate obtained was washed at least three times with a solution of ethyl acetate: ethanol (1:1). Using a 6 M guanidine (pH 2.3) solution, the button was dissolved and was incubated for 30 min at 37°C. Absorbance readings were obtained at 366 nm, employing the corresponding MEC of 21,000 M/cm. The results were expressed as nM reactive carbonyls formed (C=O)/mg protein.

2.2.10. SDS-PAGE. SDS gel electrophoresis was carried out according to Laemmli [24], with slight modifications in electrophoresis equipment, which consists of Bio-Rad Mini-PROTEAN II Cell camera, employing 10% acrylamide. MP extracts were added to 10% urea and buffer sample [0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.4% SDS, 10% glycerol, and 0.004% bromophenol blue]. The gel of 140 × 140 nm was prepared at a T = 10% in 1.2 M Tris-HCl (pH 8.8) and 0.3% SDS; the concentration gel at a T = 4% was prepared with 0.25 M Tris-HCl (pH 6.8) and 0.2% SDS. The electrode buffer contained 0.025 M Tris-HCl, 0.192 M glycine, and 0.15% SDS at pH 8.16. An electrophoretic run was carried out with a current of 200 volts; once the run was concluded, the gels were stained with a solution consisting of 40% methanol, 15% acetic acid, and 0.1% Coomassie R-250 Brilliant Blue.

2.2.11. Amino Acid Composition. 3 mg of the dehydrated simple was placed into tubes to carry out hydrolysis, with 6 N HCl and thioglycolic acid as antioxidants. Posteriorly, test tubes were heated for 6 hr at 150°C. At the end of hydrolysis, the reagent was evaporated in a Buchi rotary evaporator (Buchi, Flawil, Switzerland), obtaining a concentrate which was resuspended in 2 mL of 0.2 N sodium citrate buffer, pH 2.2.

For the determination of primary aminoacids, 250 μL of hydrolyzed extract was taken and mixed with 250 μL of o-phthalaldehyde (OPA); an aliquot of 20 μL was injected into the HPLC chromatograph (Varian 9012). For the determination of secondary aminoacids (proline and hydroxyproline),

125 μ L of the lyophilized extract was put in 0.5 mL of 0.4 M borate buffer, pH 10.4. From this solution, 250 μ L was taken and mixed with 250 μ L of the derivative solution (NBD-Cl, 2 mg/mL, in MeOH); once filtered, the solution was heated to 60°C during 5 min in a dark vial with a lid. The derivatization reaction was stopped with the addition of 50 μ L of 1 M HCl and was cooled to 0°C. For the analysis, 20 mL of the final extract was taken and injected into the HPLC; a 10 cm \times 4.6 mm \times 3 μ m Varian Microsorb C18 column was utilized for this analysis, as was HPLC-grade methanol (with 99% purity) and sodium acetate buffer (pH 7.2) as mobile phase. A 430020-02 Fluorichrom fluorescence detector was used, and the quantification was carried out using external standards as reference.

2.3. Total Viable Counts (TVC). A 10 g sample was homogenized in 90 mL of 0.1% peptone solution. Decimal dilutions were prepared from this solution and plated using plate count agar. The inoculated plates were incubated at 35°C for 48 h for total viable counts (log 10 CFU/g), as described by Ibrahim Sallam [25].

2.4. Statistical Analysis. All experiments were performed in triplicate and a completely randomized design was used. All data were statistically analyzed by SPSS/PC software (version 17). One-way analysis of variance, independent sampling, and paired Student's *t*-tests were used for comparison of the means.

3. Results and Discussion

3.1. Physicochemical Analysis

3.1.1. Moisture. During its storage under freezing, a significant ($p < 0.05$) decrease in moisture in both treatments was observed (Figure 1(a)). For the carp with the coating, the decrease was observed until the fourth month; this could be due to the chitosan in the EC, which might promote cross-linking in the gelatin, thus diminishing the free volume of the polymeric matrix, which reduces the diffusion rate of the water molecules through the coating film. The aforementioned results in a decrease in vapor permeability in the fillet, as well as with the coating itself [26]. According to Dutta et al. [8], this is a desirable characteristic in coatings and is not observed in the control sample of this study, since a loss in moisture occurs ($p < 0.05$) during all of its storage period. After five months of storage, the percentage of loss was similar in both the control sample and the sample with the treatment; this could be due to the fact that both treatments were stored in polyethylene containers, which act as protection, where the coating would be able to maintain the moisture of the product during the first four months of storage [27].

3.1.2. pH. A significant decrease ($p < 0.05$) in pH was observed (Figure 1(c)) at the end of both treatments, which could be associated with the production of lactic acid through anaerobic glycolysis and the liberation of inorganic phosphate, a product of ATP degradation. An increase in pH is observed by the second month for the control sample and by

the third month for the coated sample, which could be due to the accumulation of basic compounds such as ammonia and trimethylamine, a result of autolytic and microbial reactions [4, 28–30]. The greatest variation in percentage at the end of storage corresponds to the noncoated sample, a lower pH in the sample with the coating can bolster microbial inhibition and contribute to the preservation of the samples inhibiting the endogenous proteases, and this result suggests that, during storage, the coating diminished the decrease in pH [11, 28].

3.1.3. Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N). TVB-N is a group primarily composed of primary, secondary, and tertiary amines which are used as indicators of meat deterioration; the increase in these is related to the activity of endogenous enzymes and bacteria [28]. According to Connell [31] and Giménez et al. [32], 25–40 mg of N/100 g of tissue is considered as acceptable for consumption [9, 11, 28]. Although both samples have values below said limit (Figure 1(b)), the concentration of TVB-N is greater in the control sample in each stage of storage; this could be due to the fact that the presence of chitosan helps in reducing the capacity of bacteria for oxidative deamination of nonprotein nitrogenated compounds [11, 28]. The storage time was not enough to identify when the acceptable threshold is exceeded, due to the fact that enzymatic and microbial activity diminish at low temperatures. The carp utilized in this study presented adequate conditions for human consumption at the end of the storage period, coinciding with that reported by Soares et al. [27].

3.2. Microbiological Changes

3.2.1. Total Viable Count. Microbial activity is a limiting factor in the quality of the fish, and the total viable count has been used as indicator of acceptability of the same [29, 33]. The initial value for the carp without the coating was $2.3 \log 10^4$ CFU/g and $1.1 \log 10^4$ CFU/g for the carp with the coating; these values depend on the environment from which the fish is obtained as well as postmortem conditions [11]. The evolution of the aforementioned is detailed in Figure 1(d), observing significant differences ($p < 0.05$) by the second month, obtaining a time-dependent increase in both treatments; however, the limit recommended by the ICMSF, [34] of 5×10^5 CFU/g, for quality fish, is not exceeded [29]. The properties of the chitosan added to the coating had an inhibitory effect, thereby obtaining $4.7 \log 10^4$ CFU/g, while, for the control, a value of $2.2 \log 10^6$ CFU/g was obtained after five months of storage. The antimicrobial effect of this compound has been widely reported by Fernández-Saiz et al. [35], Jeon et al. [36], and López-Caballero et al. [37], and its mechanism of action is related to the rupture of the lipopolysaccharide layer of the external membrane of Gram-negative bacteria and its function as a barrier against the transfer of oxygen. Another mechanism of action could be the interaction with anionic groups on the cell surface, due to its polycationic nature [3, 9]; this demonstrates that the EC inhibits microbial growth up to 2 logarithmic units, decreasing reactions involved in deterioration by microorganisms during its storage in the freezer.

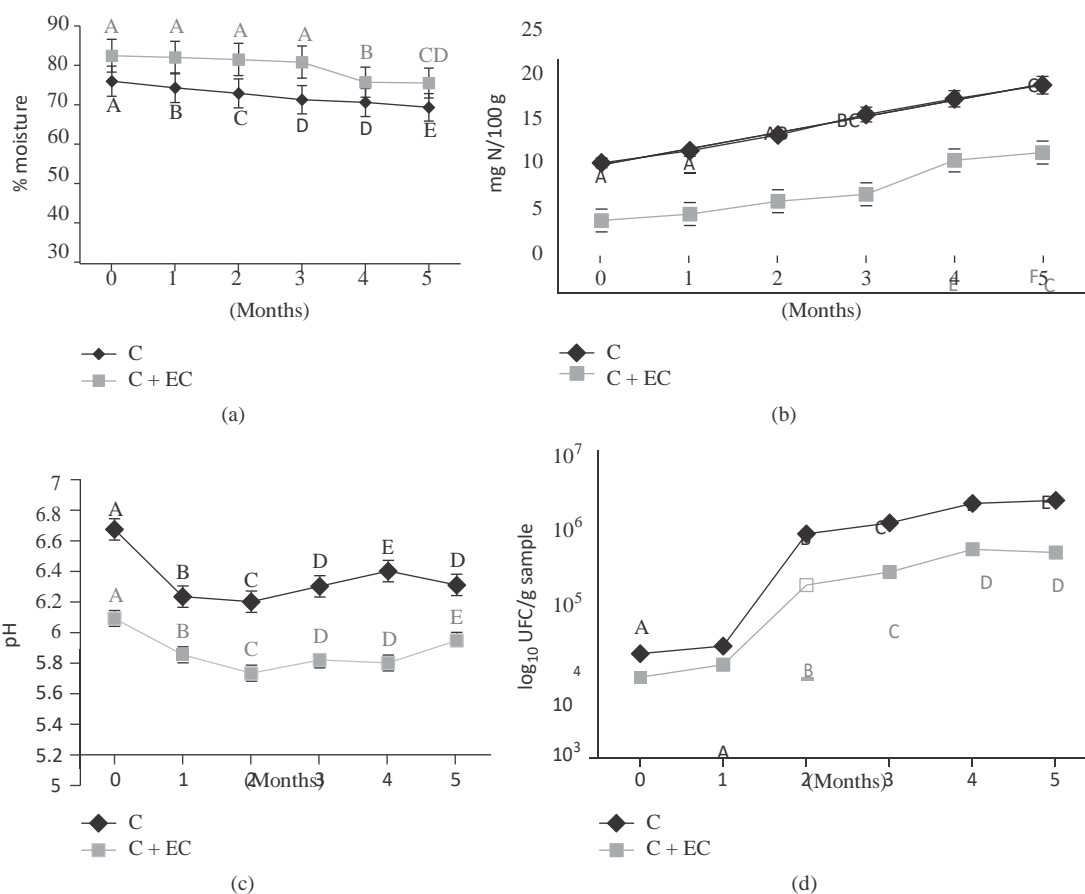


Figure 1: Changes in moisture (a), total volatile basic nitrogen TVB-N (b), pH (c), and total viable count (TVC) (d) values of common carp fillets stored at -18°C for 5 months. The results are the mean of three replications. C: fillet carp without coating; C + EC: fillet carp with edible coating. The different letters indicate significant differences between treatment times for the same treatment ($p < 0.05$).

3.3. Lipid Oxidation Products. The concentration of primary products of oxidation can be measured by the content of peroxides. The carp with coating shows a significant increase (< 0.05) in peroxides by the fourth month and presents a final value of 0.55 nM HPOx/mg of protein (Figure 2(a)) while the control sample presents an increase by the first month, having an increase of 59% with regard to the sample with coating; this demonstrates that the coating retards lipid oxidation in the carp fillet. These results are in accordance with Ojagh et al. [9], Nowzari et al. [10], Jeon et al. [36], and Li et al. [38] and those that report that additional coatings with chitosan retard production of oxidated primary compounds in herring, trout, cod, and croaker in freezer storage as well as in ice storage. Lipid oxidation in fish is influenced by various factors like fat content, the degree of microsome associated with the oxidation system, heme group content, and the presence of ions [10, 38]. Chitosan-added coatings act as excellent barriers to the permeability of oxygen, once they are applied directly over the meat's surface, retarding the diffusion of oxygen [10].

In storage at freezing temperature (-18°C), oxidation is the most important factor in deterioration, even over

microbial activity. TBARS quantifies the compounds responsible for the loss of flavor and scent and is also important in the stages of deterioration of foods. The value of TBA is an indicator of lipid oxidation widely used, which quantifies the content of malondialdehyde (MDA), formed from hydroperoxides, which are the initial products of the oxidation of unsaturated fatty acids by oxygen [29, 39]. In the present study, the values of TBA of both treatment samples presented a significant increase (< 0.05) by the second and fourth months; however, by the fourth month the control sample presented a 39% increase with regard to a 6% increase in the sample with coating; this is due to the absence of chitosan in the control sample's coating. This same behavior was observed by Jeon et al. [36], in herring and cod with a chitosan coating, and Ojagh et al. [9] in rainbow trout. The antioxidative mechanism of the chitosan is due to the fact that its primary amino groups form a stable fluorosphere with volatile aldehydes such as malondialdehyde, derived from the rupture of fats during oxidation [38].

The results indicate that the chitosan employed in a 1.5% EC preserves the fish fillet through reduction of lipid oxidation.

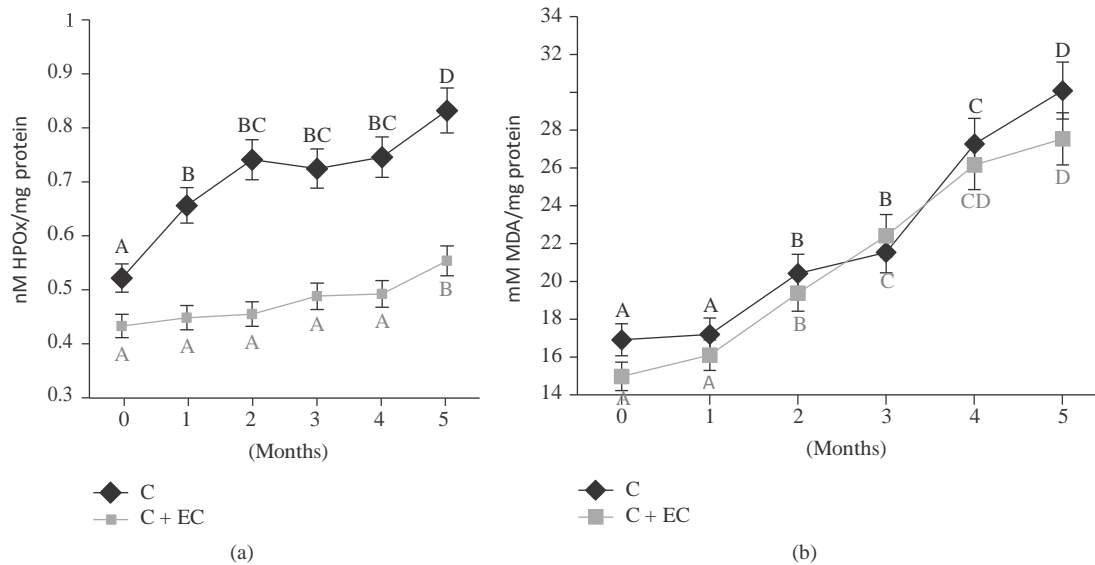


Figure 2: Changes in HPOx content (a) and MDA content (b) values of common carp fillets stored at -18°C for 5 months. The results are the mean of three replications. C: fillet carp without coating; C + EC: fillet carp with edible coating. The different letters indicate significant differences between treatment times for the same treatment ($p < 0.05$).

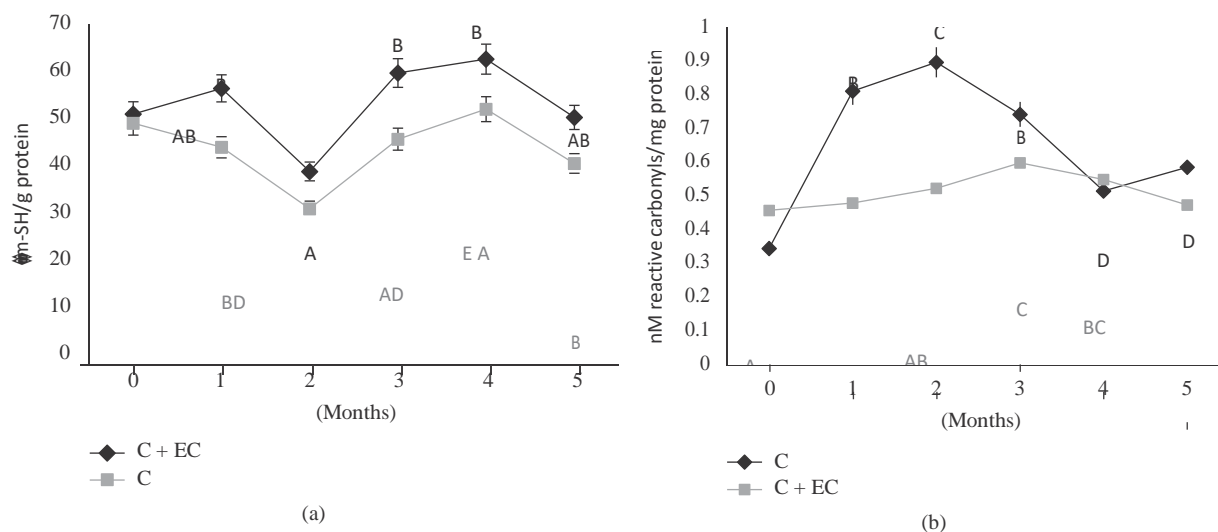


Figure 3: Changes in sulfhydryl content (a) and protein carbonyl content (b) values of common carp fillets stored at -18°C for 5 months. The results are the mean of three replications. C: fillet carp without coating; C + EC: fillet carp with edible coating. The different letters indicate significant differences between treatment times for the same treatment ($p < 0.05$).

3.4. Products of Protein Oxidation. Protein oxidation in carp fillet during freezer storage is shown in Figure 3; there was a significant increase ($p < 0.05$) in the formation of carbonylated proteins during storage in the control sample by the first month, while the sample with coating presented an increase until the third month and does not present differences at the end of storage. The increase was from 0.35 to 0.89 nmol/mg of protein for the control sample and from 0.45 to 0.59 nmol/mg of protein at maximum oxidation point. The samples of processed fillet include red and white muscle, and thus it is possible to find a high proportion of heme proteins (hemoglobin and myoglobin) and, consequently,

a concentration of iron, in addition to what can be found chelated to proteins, favoring protein and lipid oxidation. By the fourth month, both samples present a reduction in the concentration of carbonyl groups, which has been reported by other authors during a storage at -20°C , suggesting interactions between carbonyls and other cell components, for which the formation of carbonyl groups should be considered as a step in oxidation processes and not as a sole, stable marker of protein oxidation [40]. The oxidation of proteins is associated with the decrease in sulfhydryl groups, which are converted to disulfides. During freezer storage, a significant decrease ($p < 0.05$) was observed during the second month

in both samples. Proteins are attacked by reactive oxygen species (ROS), where its creation in fish is due to diverse external factors, such as noise, manipulation, slaughter, or the presence of metals such as iron. The interaction can lead to the formation of carbonyl groups and the loss of sulphydryl groups [3, 40], affecting structural, functional, and

could reduce mentioned effects.

3.5. Aminoacid Content. The protein content in fresh carp is similar to that reported by FAO (21%), in frozen species, as well as frozen species but with coating (Table 1). The protein of fish is considered of the highest quality compared to standard proteins reported by FAO and although the information concerning its nutritional value is widely known, few are the studies that refer to its composition, the scarcest being in common carp [41]. It is known that the content and bioavailability of aminoacids can be affected by different operations such as drying, fermentation, extrusion, and even germination [42]. In this study, it was observed that the aminoacid content in carp suffered a significant decrease ($p < 0.05$) after 5 months of storage due to freezing, while

the levels of Cys, His, Tyr, Thr, Met, and Lys; this could be due to protein oxidation by intermediaries of lipid oxidation and environment factors such as pH, temperature, water activity, and the presence of promoters and inhibitors like phenolic compounds [43]. The sulfur aminoacids such as Met and Cys are highly susceptible to oxidation in the presence of oxidized lipid products which lead to the formation of a variety of compounds such as sulphone, sulfoxides, and disulfide derivatives [44]. In the present study, a decrease in Met and Cys can be observed in the frozen fillet with regard to the control. Once the edible coating is added, a protective activity can be observed for Cys (0.84 g/100 g in frozen fillet and 0.91 g/100 g in coated fillet); this can be due to cross-linking, which is usually attributed to the formation of Cys (disulfide bonds) and dityrosines (from two Cys and two Tyr residues) [45]. The loss of Thr and Lys could be due to the formation of intermediary adducts such as α -amino-3-keto butyric acid and α -amino adipic semialdehyde, as a consequence of oxidation catalyzed by metals from the metalloproteins of the food matrix [43].

Common carp protein is characterized by a high content of essential aminoacids, compared to the standard protein established by the FAO, exceeding values in the case of Met + Cys and Val (Table 2) in fresh carp, having Leu as the limiting aminoacid and presenting a “limiting aminoacid” index (or chemical index) of 82.27; this index is a basic parameter used for the evaluation of the nutritional value of a food, which refers to the minor content of an essential aminoacid with regard to a given standard protein, called the “limiting aminoacid.” In this study, the essential aminoacids in the sample in freezing without EC decreased, only maintaining Val as the excess aminoacid and having Lys as the limiting aminoacid. This change in the limiting aminoacid could be a consequence of enzymatic reactions and/or bacterial growth during storage [46]. On the other hand, the frozen carp with EC continued to present

Table 1: Aminoacid composition of common carp fillet proteins, 5-month frozen carp, and 5-month frozen carp + edible coating, stored at -18°C .

Aminoacids	Carp	5-month frozen carp	5-month frozen carp + edible coating
Glutamic acid	10.75 ± 0.22 ^a	8.53 ± 0.18 ^c	9.05 ± 0.15 ^b
Alanine	4.98 ± 0.18 ^a	3.76 ± 0.15 ^c	4.28 ± 0.23 ^b
Arginine	3.74 ± 0.10 ^a	3.11 ± 0.12 ^b	3.45 ± 0.18 ^a
Cysteine	0.98 ± 0.07 ^a	0.84 ± 0.08 ^b	0.91 ± 0.06 ^a
Phenylalanine	3.51 ± 0.24 ^a	2.71 ± 0.28 ^b	3.29 ± 0.19 ^a
Glycine	3.34 ± 0.12 ^a	2.76 ± 0.19 ^b	3.11 ± 0.16 ^a
Histidine	2.48 ± 0.08 ^a	1.5 ± 0.05 ^c	2.01 ± 0.12 ^b
Isoleucine	3.89 ± 0.24 ^a	2.31 ± 0.22 ^b	3.28 ± 0.17 ^a
Leucine	5.43 ± 0.32 ^a	4.76 ± 0.38 ^b	5.21 ± 0.34 ^a
Lysine	5.53 ± 0.28 ^a	4.12 ± 0.22 ^b	5.3 ± 0.19 ^c
Methionine	2.73 ± 0.08 ^a	1.08 ± 0.07 ^b	2.06 ± 0.09 ^c
Serine	2.72 ± 0.07 ^a	1.97 ± 0.08 ^c	2.25 ± 0.11 ^b
Tyrosine	2.67 ± 0.15 ^a	1.86 ± 0.21 ^b	2.22 ± 0.13 ^c
Threonine	3.16 ± 0.22 ^a	2.42 ± 0.12 ^b	3.08 ± 0.15 ^a
Valine	4.28 ± 0.19 ^a	3.76 ± 0.32 ^b	4.12 ± 0.23 ^a
Protein(%)	22.39±1.7 ^a	22.65±1.2 ^a	22.87±1.4 ^a

^{a,b,c} $p < 0.05$.

a higher concentration in the aforementioned aminoacids (Iso, Met + Cys, and Val), thereby presenting a protective effect in Lys, which results in great benefit since fish could be maintained as an important source of this aminoacid after 5 months of storage in the freezer [42, 47]. The chemical index diminishes 11 units in the fillet without EC and 3 units for the fillet with the EC after freezing, which suggests that EC has a protective effect over essential aminoacids.

3.6. SDS-PAGE. The molecular weight profiles obtained through SDS-PAGE of the MPs extracted from the different treatments during storage are shown in Figure 4, in which the composition of the MPs of common carp was myosin heavy chains (MHC), actin (A), and troponin (T), observing that the sample without coating presents, after 5 months of storage, molecular weight bands lower than those of myosin, with an interval of 150, 100, and 75 kDa, approximately; this is probably due to carbonylation of MHC, coinciding with that reported by Kjærsgård et al. [48] in rainbow trout. Likewise, Passi et al. (2005) reported an increase of oxidized proteins in different species of Mediterranean fish after lipid oxidation, possibly due to the presence of the heme group in myoglobin [49]. For the samples with coating, no notable changes were observed in the SDS-PAGE profile, which could suggest that the coating is retarding the oxidation mechanism, showing that actin was the least oxidized during freezing, coinciding with that reported by Eymard et al. [40]. In spite of the high susceptibility of myofibrillary proteins to oxidation, edible coatings could help in the preservation of protein integrity

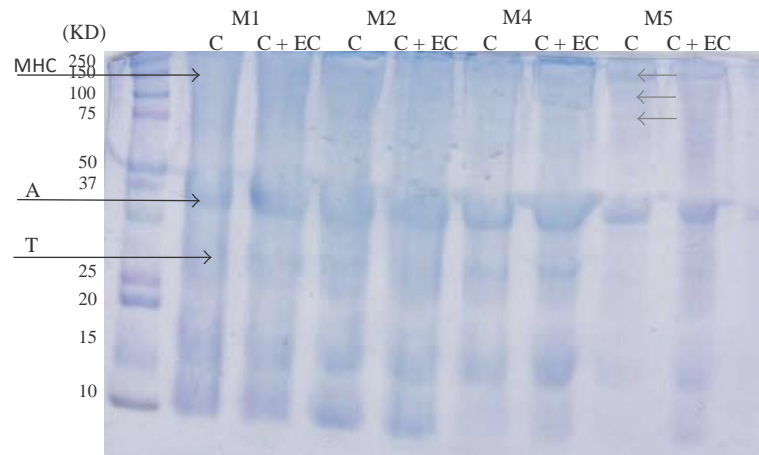


Figure 4: SDS-PAGE of common carp fillets stored at -18°C ; control batch (C) fillet without coating and filleted carp with edible coating (C + EC); M1, M2, M4, and M5 from first to fifth month during storage.

Table 2: Values of the limiting aminoacid index (%).

Aminoacids	Standard FAO/WHO (1991) ^c	Carp		5-month frozen carp		5-month frozen carp + edible coating	
		g/100 g protein	%	g/100 g protein	%	g/100 g protein	%
Phe + Tyr ^a	6,30	6,18	98,10	4,57	72,54	5,51	87,46
Isoleucine	2,80	3,89	138,93	2,31	82,50	3,28	117,14
Leucine	6,60	5,43	82,27	4,76	72,12	5,21	78,94
Lysine	5,80	5,53	95,34	4,12	71,03	5,30	91,38
Met + Cys ^b	2,50	3,71	148,40	1,92	76,80	2,97	118,80
Threonine	3,40	3,16	92,94	2,42	71,18	3,08	90,59
Valine	3,50	4,28	122,29	3,76	107,43	4,12	117,71
Amino acid index			82,27		71,03		78,94

^aPhenylalanine + tyrosine; ^bmethionine + cysteine; ^caccording to Usyudus et al. [47].

of aquatic/marine species stored during freezing, keeping functional and nutritional properties for more time.

4. Conclusions

The use of EC added with chitosan allows retention of the physicochemical and nutritional characteristics of the common carp for more time during storage, diminishing the loss of moisture, bacterial growth, nutritional value, and speed of lipid and protein oxidation in oxidation products (hydroperoxides, lipoperoxidation, and carbonyl proteins), as well as an indication of the aminoacids present in the common carp fillet with EC, being an excellent alternative as an adjuvant in the conservation through freezing of aquatic species of economic importance on a global scale.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

Ana Gabriela Morachis Valdez thanks the National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico) for a graduate scholarship.

References

- [1] T. Li, J. Li, W. Hu, and X. Li, "Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives," *Food Chemistry*, vol. 138, no. 2-3, pp. 821–826, 2013.
- [2] A. B. Falowo, P. O. Fayemi, and V. Muchenje, "Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: a review," *Food Research International*, vol. 64, pp. 171–181, 2014.
- [3] C. O. Mohan, C. N. Ravishankar, K. V. Lalitha, and T. K. Srinivasa Gopal, "Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage," *Food Hydrocolloids*, vol. 26, no. 1, pp. 167–174, 2012.
- [4] E. Indergård, I. Tolstorebrov, H. Larsen, and T. M. Eikevik, "The influence of long-term storage, temperature and type of packaging materials on the quality characteristics of frozen farmed Atlantic Salmon (*Salmo Salar*)," *International Journal of Refrigeration*, vol. 41, pp. 27–36, 2014.
- [5] R. Pamplona, "Advanced lipoxidation end-products," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 192, no. 1-2, pp. 14–20, 2011.
- [6] E. Latou, S. F. Mexis, A. V. Badeka, S. Kontakos, and M. G. Kontominas, "Combined effect of chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken breast fillets," *LWT—Food Science and Technology*, vol. 55, no. 1, pp. 263–268, 2014.

- [7] M. Ahmad, S. Benjakul, P. Sumpavapol, and N. P. Nirmal, "Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 155, no. 3, pp. 171–178, 2012.
- [8] P. K. Dutta, S. Tripathi, G. K. Mehrotra, and J. Dutta, "Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications," *Food Chemistry*, vol. 114, no. 4, pp. 1173–1182, 2009.
- [9] S. M. Ojagh, M. Rezaei, S. H. Razavi, and S. M. H. Hosseini, "Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout," *Food Chemistry*, vol. 120, no. 1, pp. 193–198, 2010.
- [10] F. Nowzari, B. Shábanpour, and S. M. Ojagh, "Comparison of chitosan-gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout," *Food Chemistry*, vol. 141, no. 3, pp. 1667–1672, 2013.
- [11] J. Huang, Q. Chen, M. Qiu, and S. Li, "Chitosan-based Edible Coatings for Quality Preservation of Postharvest Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)," *Journal of Food Science*, vol. 77, no. 4, pp. C491–C496, 2012.
- [12] I. Garcia-Argueta, O. Dublan-Garcia, B. Quintero-Salazar, A. Dominguez-Lopez, L. M. Gomez-Olivan, and A. F. Z. M. Salem, "Effect of lactic acid bacteria on the textural properties of an edible film based on whey, inulin and gelatin," *African Journal of Biotechnology*, vol. 12, pp. 2659–2669, 2013.
- [13] AOAC, *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry*, Association of Official Analytical Chemists, 4th edition, 1984.
- [14] J. E. Owen, F. A. Nuñez, M. T. Arias et al., *Manual De Prácticas de Cursos de Tecnologías de la Carne*, Facultad de Zootecnia, Universidad de Chihuahua, Chihuahua, Mexico, 1982.
- [15] T. Ngapo, B. Wilkinson, R. Chong et al., "Gelation of bovine myofibrillar protein induced by 1,5 Gluconolactone," in *Proceedings of the 38th International Congress of Meat Science and Technology*, pp. 1095–1098, Clermont Ferrand, France, 1992.
- [16] A. G. Gornall, C. J. Bardawill, and M. M. David, "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 177, no. 2, pp. 751–766, 1949.
- [17] A. M. Pilosof, "Solubilidad," in *Caracterización funcional y estructural de proteínas*, A. M. R and G. B. Barholomai, Eds., pp. 60–75, Ceudeba CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo), 2000.
- [18] G. L. Ellman, "Tissue sulfhydryl groups," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 82, no. 1, pp. 70–77, 1959.
- [19] E. J. Conway and A. Byrne, "An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances I. The micro-determination of ammonia," *Journal of Biochemistry*, vol. 27, pp. 419–429, 1936.
- [20] Z. Y. Jiang, J. V. Hunt, and S. P. Wolff, "Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein," *Analytical Biochemistry*, vol. 202, no. 2, pp. 384–389, 1992.
- [21] R. L. Levine, J. A. Williams, E. R. Stadtman, and E. Shacter, "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins," *Methods in Enzymology*, vol. 233, pp. 346–357, 1994.
- [22] S. Parvez and S. Raisuddin, "Protein carbonyls: Novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch)," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 20, no. 1, pp. 112–117, 2005.
- [23] P. C. Burcham, "Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: A new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 56, no. 1, pp. 18–22, 2007.
- [24] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [25] K. Ibrahim Sallam, "Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon," *Food Control*, vol. 18, no. 5, pp. 566–575, 2007.
- [26] S. Fakhreddin Hosseini, M. Rezaei, M. Zandi, and F. F. Ghavi, "Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films," *Food Chemistry*, vol. 136, no. 3–4, pp. 1490–1495, 2013.
- [27] N. M. Soares, M. S. Oliveira, and A. A. Vicente, "Effects of glazing and chitosan-based coating application on frozen salmon preservation during six-month storage in industrial freezing chambers," *LWT—Food Science and Technology*, vol. 61, no. 2, pp. 524–531, 2015.
- [28] W. Fan, J. Sun, Y. Chen, J. Qiu, Y. Zhang, and Y. Chi, "Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage," *Food Chemistry*, vol. 115, no. 1, pp. 66–70, 2009.
- [29] N. M. Soares, T. S. Mendes, and A. A. Vicente, "Effect of chitosan-based solutions applied as edible coatings and water glazing on frozen salmon preservation—a pilot-scale study," *Journal of Food Engineering*, vol. 119, no. 2, pp. 316–323, 2013.
- [30] D. Liu, L. Liang, W. Xia, J. M. Regenstien, and P. Zhou, "Biochemical and physical changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) filets stored at -3 and 0 °C," *Food Chemistry*, vol. 140, no. 1–2, pp. 105–114, 2013.
- [31] J. J. Connell, "Methods of assessing and selecting for quality," in *Control of Fish Quality*, Springer, Berlin, Germany, 3rd edition, 1990.
- [32] B. Giménez, P. Roncalés, and J. A. Beltrán, "Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 82, no. 10, pp. 1154–1159, 2002.
- [33] G. Olafsdóttir, E. Martinsdóttir, J. Oehlenschager et al., "Methods to evaluate fish freshness in research and industry," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 8, pp. 258–265, 1997.
- [34] ICMSE, *Microorganisms in Foods 2. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications*, University of Toronto Press, New York, NY, USA, 2nd edition, 1986.
- [35] P. Fernández-Saiz, G. Sánchez, C. Soler, J. M. Lagaron, and M. J. Ocio, "Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake filets," *Food Control*, vol. 34, no. 1, pp. 61–68, 2013.
- [36] Y.-J. Jeon, J. Y. V. A. Kamil, and F. Shahidi, "Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 18, pp. 5167–5178, 2002.
- [37] M. E. López-Caballero, M. C. Gómez-Guillén, M. Pérez-Mateos, and P. Montero, "A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties," *Food Hydrocolloids*, vol. 19, no. 2, pp. 303–311, 2005.
- [38] T. Li, W. Hu, J. Li, X. Zhang, J. Zhu, and X. Li, "Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)," *Food Control*, vol. 25, no. 1, pp. 101–106, 2012.
- [39] B. W. S. Souza, M. A. Cerqueira, H. A. Ruiz et al., "Effect of Chitosan-based coatings on the shelf life of Salmon (*Salmo salar*)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 21, pp. 11456–11462, 2010.

- [40] S. Eymard, C. P. Baron, and C. Jacobsen, "Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage," *Food Chemistry*, vol. 114, no. 1, pp. 57–65, 2009.
- [41] K. A. Skibniewska, J. Zakrzewski, J. Kłobukowski et al., "Nutritional value of the protein of consumer carp *Cyprinus carpio* L.," *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 31, no. 4, pp. 313–317, 2013.
- [42] J. Boye, R. Wijesinha-Bettoni, and B. Burlingame, "Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method," *British Journal of Nutrition*, vol. 108, no. 2, pp. S183–S211, 2012.
- [43] M. Estévez, "Protein carbonyls in meat systems: a review," *Meat Science*, vol. 89, no. 3, pp. 259–279, 2011.
- [44] R. L. Levine, N. Wehr, J. A. Williams et al., "Determination of carbonyl groups in oxidized proteins," *Methods Molecular Biology*, vol. 99, pp. 15–24, 2000.
- [45] M. N. Lund, M. Heinonen, C. P. Baron, and M. Estévez, "Protein oxidation in muscle foods: a review," *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 55, no. 1, pp. 83–95, 2011.
- [46] A. Ciampa, G. Picone, L. Laghi, H. Nikzad, and F. Capozzi, "Changes in the amino acid composition of Bogue (*Boops boops*) fish during storage at different temperatures by 1H-NMR spectroscopy," *Nutrients*, vol. 4, no. 6, pp. 542–553, 2012.
- [47] Z. Usydus, J. Szlinder-Richert, and M. Adamczyk, "Protein quality and amino acid profiles of fish products available in Poland," *Food Chemistry*, vol. 112, no. 1, pp. 139–145, 2009.
- [48] I. V. H. Kjærsgård, M. R. Nørrelykke, C. P. Baron, and F. Jessen, "Identification of carbonylated protein in frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets and development of protein oxidation during frozen storage," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 25, pp. 9437–9446, 2006.
- [49] S. Passi, S. Cataudella, L. Tiano, and G. P. Littarru, "Dynamics of lipid oxidation and antioxidant depletion in Mediterranean fish stored at different temperatures," *BioFactors*, vol. 25, no. 1-4, pp. 241–254, 2005.

[Escriba texto]

9.3.2 Artículo enviado

9/5/2017

Your recent submission to FOODCONT - gabriela morachis

Your recent submission to FOODCONT

Food Control <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Thu 8/10/2017 4:09 PM

To: gabrielamorachis@hotmail.com <gabrielamorachis@hotmail.com>;

Dear Dr. Ana Morachis-Valdez,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Food Control

Corresponding Author: Octavio Dublán-García

Co-Authors: Ana G Morachis-Valdez; Leobardo M Gómez-Oliván; Imelda García-Argueta; Hariz Islas-Flores; Francisco A López-Medina; Karinne Saucedo-Vence;

Title: Effects of peppermint extract and chitosan based edible coating on storage quality of common carp (*Cyprinus carpio*) fillets

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at octavio_dublan@yahoo.com.mx; odublang@uaemex.mx; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<https://ees.elsevier.com/foodcont/!asn?i=95972&l=LJDSYR8AH>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/n/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Food Control

<https://outlook.live.com/owa/?viewmodel=ReadMessageItem&itemID=AQMkADAwATEwATQSLTRjNGUyZUzYyOWMAjMDAKAEYAAAC0B7CaNgZAG...> 1/1

[Escriba texto]

1 **Effects of peppermint extract and chitosan based edible coating on storage quality of common carp**
2 **(*Cyprinus carpio*) fillets**

3

4 *Ana Gabriela Morachis-Valdez^{ac}, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a**}, Imelda García-Argueta^b, Hariz Islas*
5 *Flores^a, Francisco Antonio López Medina^c, Karinne Saucedo Vence^{ac}, Octavio Dublán-García^{c*}*

6

7 a Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de
8 México, Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de
9 México, México.

10 b Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Av Paseo Tollocan 134 502,
11 Residencial Colón y Col Ciprés, 50120 Toluca de Lerdo, México

12 c Laboratorio de Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Km. 15
13 Carr. Toluca-Ixtlahuaca. El Cerrillo Piedras Blancas, C. P. 50200 Toluca, México.

14

15 * Corresponding author: Octavio Dublán-García; Email: octavio_dublan@yahoo.com.mx;
16 odublang@uaemex.mx. Corresponding Author's Address: Facultad de Química, Universidad Autónoma
17 del Estado de México, Km. 15 Carr. Toluca-Ixtlahuaca. El Cerrillo Piedras Blancas, C. P. 50200 Toluca,
18 México.

[Escriba texto]

19 **Corresponding author: Leobardo M. Gómez-Oliván; Email: lgolivan74@gmail.com; Address: Facultad
20 de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón intersección Paseo Tolloca s/n.
21 Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, México.

22

23

24 **Abstract**

25 The effects of chitosan based edible coating enriched with peppermint extract on common carp
26 (*Cyprinus carpio*) quality were evaluated during refrigerated storage ($4 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Three treatments were
27 used: edible coating (C+EC), edible coating + 1.5% chitosan (C+ECCh), and edible coating + 1.5% chitosan
28 + 10% peppermint (C+ECChP). Prior to coating of carp fillets, antibacterial activity and antioxidant
29 capacity were evaluated in peppermint extract and coating solutions. After coating and during storage,
30 the following were determined on fillet samples: microbiological properties (total viable count, aerobic
31 psychrophiles, and total coliforms), physicochemical characteristics (pH, sulfhydryl groups, total volatile
32 basic nitrogen, and solubility) and biomolecules oxidation (lipid peroxidation, hydroperoxide content,
33 protein carbonyl content, gel electrophoresis). Results indicate that treatments C+ECCh and C+ECChP
34 extend shelf life for 3-5 days with respect to microbiological properties and 4-5 days with respect to
35 physicochemical characteristics. A reduction in products of lipid and protein oxidation was also observed
36 during refrigerated storage.

37

38 **Keywords:** *chitosan, peppermint extract, Cyprinus carpio, physicochemical properties, microbiological*
39 *quality*

[Escriba texto]

40 1. Introduction¹

41 Biopolymers have become an alternative for synthetic packaging that is non-biodegradable and has a
42 negative impact on the environment. Biopolymer based edible coatings (ECs) can increase the shelf life
43 and quality of food, acting as selective barriers against humidity and oxygen, lipid oxidation and loss of
44 volatile aromatic compounds (Ali Arfat et al., 2014). Commonly used polymeric materials include
45 polysaccharides and proteins. Chitosan is a cationic polysaccharide composed of (1, 4)-2-amino-deoxy-
46 beta-D-glucan, the deacetylated form of chitin. Because of its non-toxic character, antifungal and
47 antimicrobial activity, biodegradability and biocompatibility as well as film-forming and antioxidant
48 properties, chitosan has been widely applied in preservation of meat products such as beef, chicken,
49 mutton and fish (López-Caballero et al., 2005; Dutta et al., 2009; Ojagh et al., 2010).

50 Fresh fish is highly perishable as a result of its biological composition. Decomposition of fish muscle is
51 the result of biological reactions such as lipid and protein oxidation which are due to enzymatic activity
52 characteristic of the species or the metabolic activity of the microorganisms present. In either case,
53 muscle decomposition leads to shelf life reduction in fish and fish products (Sánchez-Alonso et al., 2008;
54 Nowzari et al., 2013). Numerous studies indicate that chitosan use reduces such deterioration reactions
55 (Ojagh et al., 2010; Li et al., 2012; Li et al., 2013; Nowzari et al., 2013). While López-Caballero et al.
56 (2005) make reference to the antioxidant capacity of chitosan, Kanatt et al. (2008) imply that it has poor
57 antioxidant activity and therefore suggest using peppermint extracts as coadjuvants in this activity.
58 *Mentha piperita* L. is a medicinally valuable plant of the family Lamiaceae, and is commonly known as
59 peppermint. It is a hybrid of *M. spicata* L. (spearmint) and *M. aquatica* (water mint). At present, it is

¹ **Abbreviations:** CFU: colony-forming unit; CHP: cumene hydroperoxide; EC: edible coating; GAE: gallic acid equivalent; HPC: hydroperoxide content; LPX: lipid peroxidation; MDA: malondialdehyde; MEC: molar extinction coefficient; MP: myofibrillar protein; PCC: protein carbonyl content; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SH: sulfhydryl; SN: supernatant; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; TVB-N: total volatile basic nitrogen; TVC: total viable count.

[Escriba texto]

60 grown in temperate zones in almost all regions of the world (Singh et al., 2015). It has antiviral and
61 antimicrobial activity, is a strong antioxidant, has antitumoral, antispasmodic, anti-inflammatory and
62 antiseptic action, and anti-allergenic potential (McKay & Bloomberg, 2006). The volatile oil of
63 peppermint is composed mainly of menthol (29-48%), menthone (20-31%), menthofuran (6.8%) and
64 menthyl acetate (3-10%). Other active compounds include bitter substances such as caffeic acid,
65 flavonoids (12%), polymerized polyphenols (19%), carotenes, tocopherols, betaine, choline and tannins,
66 the latter being present in aqueous extracts with antioxidant activity (Zheng & Wang, 2001; Singh et al.,
67 2015).

68 The development of ECs enriched with natural preservatives that have both antibacterial and
69 antioxidant activity, and extend the shelf life of fresh fish is of great interest. The present study aimed to
70 determine the effects of chitosan based ECs enriched with aqueous peppermint extract – which may
71 extend the quality of fillets of common carp (*Cyprinus carpio*), a valuable fish farm species worldwide –
72 through the evaluation of antioxidant and antibacterial activity.

73

74 **2. Materials and methods**

75 **2.1 Materials**

76 Chitosan, medium molecular weight, deacetylation value 75-85%, viscosity 200-800 cP, was purchased
77 from Aldrich Chemical.

78 Bovine serum albumin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), acrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide,
79 trichloroacetic acid (TCA), FeSO₄, sulfuric acid, cumene hydroperoxide (CHP), butylhydroxytoluene,
80 methanol, xylenol orange, di-nitrophenylhydrazine (DNPH), guanidine, ethanol, ethyl acetate,

[Escriba texto]

81 hydrochloric acid, Coomassie Brilliant Blue R-250, thioglycolic acid, 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-
82 Cl), and o-phthalaldehyde (OPA) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

83 Thiobarbituric acid (TBA) was purchased from Fluka (Sigma-Aldrich, Toluca, Mexico); sodium chloride,
84 EDTA disodium salt, N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine (TEMED), Tris Base, urea, β -
85 mercaptoethanol, glycine, glacial acetic acid, monobasic sodium phosphate, dibasic sodium phosphate
86 and copper sulfate pentahydrate from J.T. Baker (Pennsylvania, PA); sodium carbonate and lactic acid
87 from Fermont (Monterrey, Mexico); sodium dodecyl sulfate (SDS) and bromophenol blue from Hycl
88 (Mexico City, Mexico) and plate count agar from Bioxon (Becton Dickinson, Mexico City). All reagents
89 used were of analytical grade.

90

91 2.1.1 Fish sample preparation

92 Fresh specimens of common carp (*Cyprinus carpio*) with an average weight of 550-650 g were purchased
93 from Centro Acuícola Tiacaque in Toluca (State of Mexico), taken to the Food Laboratory in the
94 Chemistry Department at Universidad Autónoma del Estado de México, and filleted by hand. Fish were
95 harvested during July, 2016. Fillets were obtained after removing the head and bones, and immediately
96 immersed in the coating solutions.

97

98 2.1.2 Extract with antioxidant activity

99 Aqueous extract of peppermint was prepared from leaves purchased at the Morelos Market (Toluca).
100 Dried leaves were placed on trays and exposed to UV light for approximately 6 h to reduce the bacterial

[Escriba texto]

101 load. Next, 25 g of chopped, dried leaves were infused in 100 mL distilled water, and left at ambient
102 temperature for 12 h, stirring occasionally by hand.

103

104 2.1.3 Preparation of coating solutions and treated fillets

105 The solution for the EC base was prepared according to the formulation in García-Argueta et al. (2016),
106 consisting in 13% whey, 6% gelatin, 13% glycerol, 4% inulin and 1.5% lactic acid. The solution was stirred
107 constantly at 40°C until all components were fully dissolved, the final pH being 3.5.

108 Fillets were assigned at random to four lots: an uncoated control lot (C), a second lot coated with the EC
109 base (C+EC), a third lot coated with the EC base + 1.5% chitosan (C+ECCh), and a final lot coated with the
110 EC base + 1.5% chitosan and 5% aqueous peppermint extract (C+ECChP).

111 Approximately 15 fillets (12-15 cm) were used per lot. The EC was applied by immersion in the coating
112 solution for 15 s, after which fillets were placed on a mesh to drain and air-dry for 1 min, enabling film
113 formation, then stored at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ in a commercial refrigerator (Mabe, Mexico City) for nine days to carry
114 out subsequent analyses. Microbiological and physicochemical analyses were conducted on days 0, 1, 3,
115 7 and 9 to determine fish quality during storage.

116

117 2.2 Microbiological analyses

118 2.2.1 Determination of antibacterial activity

119 2.2.2.1 Bacterial strains

[Escriba texto]

120 One gram-positive strain (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) and two gram-negative strains
121 (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Escherichia coli* ATCC 25922) were used. Bacterial cultures
122 were maintained on agar at 4°C during the study, and were used as stock cultures.

123

124 2.2.2 Antibacterial activity

125 Bacterial suspensions were prepared as described by Singh et al. (2015). Turbidity was measured in a
126 Genesys 10S Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Madison, WI) and compared to a BaSO₄ 0.5
127 McFarland standard suspension equivalent to 1.5 x 10⁸ cells/mL. The suspensions were spread on
128 Muller-Hinton agar, and cellulose circles (5-mm diameter) imbued with peppermint extract or coating
129 solutions were placed on top. The plates were incubated at 35°C for 18-22 h. Antibacterial activity was
130 determined by the width of the zone of inhibition (clear of growth), and results were expressed as
131 inhibition zone diameter. All tests were performed in triplicate.

132

133 2.2.2 Bacteriological analyses

134 The plate count method was used. Fish fillet (10 g) was homogenized with 90 mL of 0.1% peptone.
135 Decimal dilution series were prepared from the latter dilution and placed in Petri dishes containing plate
136 count agar. These inoculated plates were incubated at 35°C for 48 h to determine total viable count
137 (TVC), and at 0°C for 7 days to determine psychrophilic bacteria count. To determine total coliforms,
138 inoculated plates were added violet red bile agar (VRBA) and incubated at 36°C for 24 h. Counts were
139 expressed as log₁₀ CFU/g, and were carried out in duplicate (NOM-092-SSA1-1994; Sallam, 2007).

140

[Escriba texto]

141 **2.3 Antioxidant capacity**

142 2.3.1 Determination of total phenolic compounds

143 The total content of phenolic compounds was determined by the method described in Gao et al. (2002).
144 To 100 μL of peppermint extract or coating solution in a test tube was added 700 μL of a 0.2 N solution
145 of Folin-Ciocalteu reagent. Test tube contents were mixed and left to rest for 3 min at 25°C, then
146 supplemented with 900 μL sodium carbonate, and the mixture left for 90 min in the dark, following
147 which absorbance was determined at 765 nm with the spectrophotometer. Total phenolic compounds
148 were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE)/g, based on a type curve.

149

150 2.3.2 Free-radical scavenging activity

151 Antiradical activity was determined by the method proposed by Ranilla et al. (2010), with modifications:
152 100 μL of peppermint extract or coating solution (at a concentration of 0.7 mg/mL total phenolic
153 compounds) was transferred to conical-bottom polypropylene tubes, supplemented with 2.8 mL DPPH
154 (98.9 μM in methanol) and Vortex-shaken for 15 s. The tubes were left to rest in the dark for 30 min,
155 after which absorbance was read at 515 nm. Methanol was used as the reaction blank and Trolox
156 solution (0.02 mM) as the antioxidant control sample. Antioxidant activity was expressed as the
157 percentage of inhibition:

$$158 \quad (1) \text{ \% inhibition} = [(A_{0515} - A_t515) / A_{0515}] \times 100$$

159 Where: A_{0515} = absorbance in absence of the extract or coating solution, and A_t515 = absorbance in
160 presence of the extract or coating solution.

161

[Escriba texto]

162 **2.4 Physicochemical analyses**

163 2.4.1 Myofibrillar protein extraction

164 Myofibrillar protein (MP) was obtained according to the methodology described by Ngapo et al. (1992),
165 with slight modifications. Fish muscle (100 g) was homogenized in a blender for 10 min with ice and cold
166 water in a 1:1:1 (w/w/v) ratio, then placed for 10 min in an ice bath with a magnetic stirrer. The
167 myofibrillar suspension was strained twice through two cheesecloth layers to remove connective tissue.
168 The homogenate was centrifuged at 3000 x g and 4°C for 25 min and the supernatant was discarded.
169 Protein content in the myofibrillar precipitate was determined by the biuret method (Gornall et al.,
170 1949), and 25 mg/mL of MP was stored in a lidded jar for gel formation. The gelation process was
171 carried out in two steps: first incubating at 4°C for 60 min, then heating in a water bath with constant
172 stirring and gradual temperature increases for 20 min until 90°C was reached. The lidded jars were then
173 removed and stored at 4°C for later analysis.

174

175 2.4.2 Solubility

176 As per Pilosof (2000), 2 g of MP were centrifuged at 2500 x g and 4°C for 30 min. Protein content was
177 determined in the supernatant, and total protein content in the MP sample prior to centrifuging.
178 Solubility was determined by the ratio: protein content in the supernatant to total protein content in the
179 MP sample, x 100, and was expressed as mg supernatant (SN) protein/mg total protein.

180

181 2.4.3 pH

[Escriba texto]

182 As described by Owen et al. (1982), to 10 g of fish muscle was added 90 mL distilled water prior to
183 homogenizing for 1 min in the blender. Connective tissue was removed by straining through
184 cheesecloth. A digital potentiometer (Conductronic PH120, Mexico City) was used to determine pH.

185

186 2.4.4 Determination of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content

187 To quantify TVB-N content, the method of Conway & Byrne (1936) was used, with slight modifications.
188 To 5 g of homogenized fish fillet, was added 4% TCA in a 1:2 (w/v) ratio, and the resulting mixture was
189 filtered through Whatman No. 1 paper (Schleicher & Schuell, Maidstone, UK). Filtrate (1 mL) was
190 transferred into the outer ring of the Conway unit, and a 1% boric acid solution containing Shiro-Tashiro
191 indicator was pipetted into the inner ring. To start the reaction, 2 mL K_2CO_3 were mixed with the filtrate.
192 The unit was incubated at 25°C for 24 h. The inner ring solution was titrated with 0.1 N HCl until a color
193 change to pink ensued. Results were expressed as mg N/100 g fish muscle.

194

195 **2.5 Biomolecules oxidation**

196 2.5.1 Determination of lipid peroxidation (LPX)

197 To determine LPX the technique described by Buege & Aust (1978) for thiobarbituric acid reactive
198 substances (TBARS) was used. To a 100- μ L aliquot of supernatant obtained from previously
199 deproteinized fish fillet, was added Tris-HCl buffer solution pH 7.4 to attain a final 1-mL volume. The
200 samples were incubated at 37°C for 30 min, then supplemented with 2 mL TBA-TCA reagent (0.375%
201 TBA in 15% TCA) and homogenized in a Vortex shaker. The homogenate was heated to boiling point in a
202 hot water bath for 45 min, left to cool, centrifuged at 3000 x g for 10 min and the resulting precipitate

[Escriba texto]

203 discarded. Absorbance was determined at 535 nm against a reaction blank. Malondialdehyde (MDA)
204 content was calculated using the molar extinction coefficient (MEC) of MDA (1.56×10^5 M/cm). Results
205 were expressed as mM MDA/mg protein.

206

207 2.5.2 Determination of hydroperoxide content (HPC)

208 HPC was determined by the ferrous oxidation-xylene orange (FOX) method of Jiang et al. (1992). Fish
209 fillet samples were deproteinized with 10% TCA. To 100 μ L of the resulting supernatant was added 900
210 μ L of a reaction mixture [25 mM H_2SO_4 , 0.25 mM $FeSO_4$, 0.1 mM xylene orange and 4 mM of 90%
211 butylhydroxytoluene (v/v)] and the resulting mixture was incubated for 60 min at ambient temperature.
212 Absorbance was read at 560 nm against a reaction blank. Results were interpolated on a previously
213 constructed type curve and were expressed as nM cumene hydroperoxide (CHP)/mg protein.

214

215 2.5.3 Determination of protein carbonyl content (PCC)

216 The method of Levine et al. (1994) was used, as modified by Parvez & Raisuddin (2005) and Burcham
217 (2007). To a 100- μ L aliquot of the supernatant obtained from a fish fillet sample deproteinized with 10%
218 TCA, was added 150 μ L of 10 mM DNPH dissolved in 2 M HCl, and the resulting mixture was left at
219 ambient temperature in the dark for 1 h. To stop the reaction, 500 μ L of 20% TCA was added and the
220 mixture was left to rest for 15 min at 4°C. A precipitate was obtained by centrifuging at 11,000 x g for 5
221 min; this was washed thrice with 1:1 ethyl acetate:ethanol solution. To dissolve the bud, 1 mL of 6 M
222 guanidine pH 2.3 was added and the resulting mixture left for 30 min at 37°C. Absorbance was read at

[Escriba texto]

223 366 nm. The MEC of 21,000 M/cm was used. Results were expressed as nM reactive carbonyls formed
224 (C=O)/mg protein.

225

226 2.5.4 Total sulfhydryl (SH) content

227 Total SH content was quantified according to Ellman (1959). To 1 mL of MP solution at a concentration
228 of 5 mg/mL, was added 9 mL Tris-glycine buffer (10.4 g Tris-HCl, 6.9 g glycine, 480 g urea and 1.2 g
229 EDTA/L at pH 8.0) and the resulting mixture was maintained at ambient temperature for 30 min. Series
230 of three tubes with 3-mL aliquots of this reaction mixture were supplemented with 0.05 mL Ellman's
231 reagent (4 mg DTNB/mL), incubating for 30 min in the dark. Absorbance was determined at 412 nm
232 using a spectrophotometer. Total SH content was expressed as μM total SH/mg protein.

233

234 2.5.5 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

235 Gel electrophoresis was performed according to Laemmli's (1970) method in a system with a Mini-
236 PROTEAN II electrophoresis cell (Bio-Rad, Hercules, CA), using 10% acrylamide. To MP extracts were
237 added 10% urea and sample buffer [0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.4% SDS, 10% glycerol and 0.004%
238 bromophenol blue]. The running gel (140 x 140 mm) was fixed at 10%T in 1.2 M Tris-HCl (pH 8.8) and
239 0.3% SDS; and the stacking gel at 4%T in 0.25 M Tris-HCl (pH 6.8) and 0.2% SDS. The electrode buffer
240 contained 0.025 M Tris-HCl, 0.192 M glycine and 0.15% SDS at pH 8.16. Electrophoresis was performed
241 at 200 V. After the run, gels were stained with a solution of 40% methanol, 15% acetic acid and 0.1%
242 Coomassie® Brilliant Blue R-250.

243

[Escriba texto]

244 **2.6 Statistical analysis**

245 All statistical tests were performed in triplicate and a fully randomized design was used. All data were
246 statistically analyzed with SPSS/PC v17 software. One-way analysis of variance (ANOVA), and
247 independent samples and paired Student's t-tests were used for comparison of means.

248

249 **3. Results and Discussion**

250 **3.1 Microbiological analyses**

251 3.1.1 Determination of the antibacterial activity of peppermint extract and coating solutions

252 The antibacterial activity of ECs enriched with aqueous peppermint extract (ECP), chitosan (ECCh) or the
253 chitosan-peppermint mixture (ECChP) was evaluated by the agar diffusion method, measuring inhibition
254 zone diameter in the samples, for both gram-positive (*S. aureus*) and gram-negative (*S. typhimurium* and
255 *E. coli*) bacteria. Figure 1a shows the results of bacterial activity. In the case of ECP, sensitivity to *S.*
256 *aureus* was observed, with a halo of inhibition of 14.3 mm that was not present in gram-negative
257 species. ECCh evidenced sensitivity to both groups of bacteria, with halos of 17.6 mm for *S. aureus*,
258 followed by *S. typhimurium* (17.1 mm) and *E. coli* (16.5 mm). In ECChP, a synergistic effect was observed
259 on *S. aureus* since a large zone of growth inhibition (20 mm) was found, unlike *S. typhimurium* and *E. coli*
260 which had inhibition zones of 17 to 16.8 mm. The low levels of gram-negative species inhibition by ECP
261 may be due to the presence of lipopolysaccharides in the external membrane of these bacteria, which
262 permit increased resistance to the antibacterial substances present in the aqueous peppermint extract
263 (Singh et al., 2015). As regards gram-positive species, Al-Hadi (2011) mentions that the effect of the
264 latter extract on *S. aureus* is due mainly to the compounds 1,8-cineole, eugenol, sabinene and 4-

[Escriba texto]

265 terpineol, which show antibacterial activity as a result of their capacity to inactivate microbial and cell
266 envelope proteins. In the case of ECCh, Dutta et al. (2009) suggest that the antimicrobial character of
267 chitosan is due to interaction of positive charges in the amine group with negative charges in the cell
268 membrane of bacterial species. Zheng & Zhu (2003) state that the mechanism of action of chitosan
269 differs in gram-positive and gram-negative species. In *S. aureus*, antimicrobial activity may have
270 increased due to the degree of deacetylation of chitosan, which can form on the cell surface a polymeric
271 membrane inhibiting nutrient entry into the cell. And, as degree of deacetylation decreases,
272 antimicrobial activity against gram-negative species increases, resulting in low molecular weight
273 chitosan entering the cell through diffusion. In our study, the use of chitosan with a higher degree of
274 deacetylation showed low antimicrobial activity against gram-negative species (*S. typhimurium* and *E.*
275 *coli*). The antimicrobial effect of chitosan increases in the presence of extracts, as reported by Dutta et
276 al. (2009); in the present study, ECChP (the chitosan-peppermint mixture) had a synergistic effect on *S.*
277 *aureus*.

278

279 3.1.2 Bacteriological analyses

280 Results of bacteriological analyses are shown in Figure 1b. TVC variations were observed during
281 refrigerated storage. Basal values (Log₁₀ CFU/g) for carp fillet treatments were 4.7. In control group fish
282 muscle (C), TVC had increased to 7.3 on day 4, reaching the maximum recommended limit of 7 Log₁₀
283 CFU/g in raw fish (Sallam, 2007), while in treatment C+EC, this limit was reached on day 7, and in
284 C+ECCh and C+ECChP on day 9, the latter indicating a five-day extension of shelf life, and consistent with
285 reports by Ojagh et al. (2010) and Li et al. (2012).

[Escriba texto]

286 Psychrophiles are among the major microorganisms eliciting damage to fish in refrigerated storage
287 (Sallam, 2007). In the present study, psychrophilic bacteria count increased from day 2 on (Fig. 1c), with
288 the highest increase (9.1) occurring in the control group, while fish fillets with chitosan based ECs
289 reached 6.9 (C+ECCh) and 6.5 (C+ECChP), consistent with behavior in gram-negative psychrotrophs as
290 reported by Li et al. (2013) and Sallam (2007), psychrophiles being a subgroup within the psychrotrophs
291 (ICMSF, 2011).

292 As regards total coliforms (Fig. 1d), the control group reached 6.3 Log₁₀ CFU/g at the end of the storage
293 period, while fish fillets with EC remained below this value, with treatment C+ECChP recording the
294 lowest value of all (4.4 Log CFU/g).

295 Chitosan is widely known for its antimicrobial properties, which may be due to interaction between
296 positive charges in the molecule and negative charges in the microbial membrane, inducing leakage of
297 cell proteins and other intracellular constituents (Li et al., 2013). Also, chitosan based ECs act as an
298 oxygen barrier that inhibits growth of aerobic bacteria, while peppermint extracts act as coadjuvants in
299 inhibition of bacterial growth, since presence of the latter extract induced reductions in bacterial counts
300 during storage (Fig. 1a). According to Al-Hadi (2011), this may be due to the peppermint components
301 present in the aqueous extract (menthol, menthone and certain tannins). Additionally, the reductions in
302 TVC, psychrophilic bacteria count and total coliforms evidenced in treatment C+EC may be due to the
303 whey component in EC. Motalebi & Seyfzadeh (2011) observed such antimicrobial activity in gram-
304 positive and gram-negative species.

305

306

[Escriba texto]

307 **3.2 Physicochemical analyses**

308 3.2.1 Solubility, pH and TVB-N content

309 Near the isoelectric point (pI) of a protein, solubility generally increases with hydrolysis, since it is mainly
310 the result of molecular weight reduction and increase in the number of polar groups (Benítez et al.,
311 2008). In the present study, all treatments showed increased solubility during storage (Fig. 2a), such
312 increases being higher in uncoated fish fillets (C) which reached a value of 46.7 mg SN protein/mg total
313 protein. Significantly lower values ($P<0.05$) were found in fillets with EC (C+EC > C+ECCh > C+ECChP
314 respectively), the C+ECChP treatment attaining 29.1 mg SN protein/mg total protein at the end of the
315 storage period. This increased solubility may be due to weakening of fibrous linkages in muscular
316 structure (Mehta et al., 2014). Results of the present study show that independently of the type of
317 coating, ECs have a protective activity on muscle proteins, with C+ECChP exerting the best protective
318 effect during refrigerated storage, preventing loss of structural proteins. This may be due to decreased
319 microbial metabolism (Fig. 1b) and/or enzymatic activity.

320 Changes in pH values during the nine days of cold storage are shown in Figure 2b. Basal pH in carp fillets
321 was 5.74. Basal pH values differ depending on species, diet, season and stress levels at capture. In our
322 study, pH values increased during storage (except on day 1) in fillets with EC remaining throughout at
323 5.4-6.0, but ranged from 5.8 to 6.4 in uncoated fillets. This may be due to the pH value of the film itself,
324 since the gradual pH increase can be attributed to volatile base increases (Ocaño-Higuera et al., 2011; Li
325 et al., 2012; Li et al., 2013) reflected in Figure 2c, induced by microbial or endogenous enzymes. The
326 maximum permissible value for this parameter is 25 mg N/100g fish muscle, as proposed by Giménez et
327 al. (2002). In the present study, TVB-N content increased from a basal value of 9.7 to 33.3 in the control
328 group (C), 27.2 in C+EC, 25.3 in C+ECCh and 23.3 in C+ECChP on day 9 of storage, so that fillets with

[Escriba texto]

329 chitosan based ECs avoided deterioration for up to five additional days. Production of ammonia,
330 dimethylamine, trimethylamine and formaldehyde is caused by spoilage bacteria, autolytic enzymes and
331 deamination of amino acids as well as nucleotide catabolites, so that high TVC values favor formation of
332 these compounds. In the present study, fillets with ECs had lower TVC values and therefore volatile base
333 production was lower in these treatments (Fan et al., 2009; Ojagh, 2010).

334

335

336 **3.3 Antioxidant capacity**

337 Total phenolic compounds in the aqueous peppermint extract were 505.55 mg GAE/g dried leaves, with
338 98.78% antioxidant capacity observed in the aqueous extract and 81.88% in the EC. This allows its use as
339 a coadjuvant in prevention of oxidation of fish lipidic and protein compounds. Comparison of
340 antioxidant activity, though reported in diverse studies (Kanatt et al., 2008; Al-Hadi, 2011; Sampels,
341 2013), is difficult, since data are significantly affected by the extraction method and analytical method of
342 determination used; however, our results are consistent with those of Kanatt et al. (2008), who report
343 85% inhibition, and Singh et al. (2015), who report 70.3% inhibition.

344

345 **3.4 Oxidation of lipids and proteins**

346 Quantification of hydroperoxides is used to determine the formation of primary products of lipid
347 oxidation during the storage period (Li et al., 2012). Figure 3a shows the effect of EC on HPC. Significant
348 increases ($P<0.05$) occurred in all treatments during storage, from 0.35 to 1.7 mM CHP/mg protein in the
349 control group (C), to 1.4 in C+EC, 1.27 in C+ECCh and 1.16 in C+ECChP. Results showed that the chitosan

[Escriba texto]

350 based EC and the chitosan-peppermint mixture were significantly effective ($P<0.05$) in delaying
351 hydroperoxide production during refrigerated storage, reducing lipid oxidation. Similar results were
352 obtained with chitosan in other species (trout, herring and Atlantic cod) (Ojagh et al., 2010; Li et al.,
353 2012; Nowzari et al., 2013). Chitosan coatings show good barrier properties against oxygen
354 permeability, delaying the diffusion of ambient oxygen towards the surface of fish flesh (Nowzari et al.,
355 2013).

356 TBARS assay values are widely used to determine degree of lipid peroxidation during the second phase
357 of autooxidation in which peroxides and hydroperoxides are oxidized to aldehydes and ketones. In the
358 present study, TBARS assay values increased in the different treatments during refrigerated storage (Fig.
359 3b), with final values of 33.44, 31.88, 29.40 and 29.21 mM MDA/mg protein in the control group (C) and
360 treatments C+EC, C+ECCh and C+ECChP respectively; the EC enriched with the chitosan-peppermint
361 mixture showing the best protective effect. This may be due to the antioxidant mechanism of chitosan
362 which forms a stable fluorosphere with aldehydes and the positive charges of the primary amine groups
363 that compose chitosan in addition to acting as a chelating agent of metal ions, thus preventing lipid
364 peroxidation. Also, the tannin content in aqueous peppermint extract can break the free-radical chain by
365 donating a hydrogen atom (Ojagh et al., 2010), exerting a synergistic effect on antioxidant activity.

366 Intermediaries of lipid oxidation and external factors such as handling, noise and stress can form
367 reactive oxygen species leading to protein oxidation (Estévez, 2011), the latter activity being evidenced
368 through changes in disulfide groups and increased protein carbonyls (Figs. 3c and 3d). Total SH group
369 content indicates protein conformational changes during cold storage; a reduction in these indicates
370 disulfide bond formation (Eymard et al., 2009). A marked decrease in SH content was observed after day

[Escriba texto]

371 4 of storage (Fig. 3c), the EC with the chitosan-peppermint mixture having a superior protective effect
372 and showing greater stability during storage, followed by the chitosan based EC.

373

374

375

376 **3.5 SDS-PAGE**

377 Since protein oxidation can produce covalent bonds between proteins, and even protein fragmentation,
378 SDS-PAGE was conducted to detect changes in carp MP during refrigerated storage (Fig. 4). Certain
379 changes were observed in both control and treatment groups. During storage, paramyosin bands
380 disappeared in control group (C). A similar behavior was found in treatment C+EC. In C+ECCh and
381 C+ECChP, a protective effect on this protein was observed, with appearance of more sharply defined
382 bands.

383

384

385 **4. Conclusions**

386 While refrigerated storage proves to be an effective technique in extending the shelf life of fish, the use
387 of chitosan based ECs and the chitosan-peppermint mixture employed in the present study has shown a
388 protective effect, extending up to three days the physicochemical properties and up to four days the
389 microbiological characteristics that make carp fillets apt for consumption. The combined use of these
390 food preservation technologies should have a wide application in refrigerated storage.

[Escriba texto]

391

392 **Acknowledgments**

393 Ana Gabriela Morachis-Valdez is grateful to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-
394 Mexico) for a graduate scholarship.

395

396 **5. References**

397 Al-Hadi, L. M. (2011). The antibacterial activity of aqueous extract of peppermint and Bay leaf against
398 *Staphylococcus aureus*. *J Bagh College Dentistry*, 23, 146-150.

399

400 Ali Arfat, Y., Benjakul, S., Prodpran, T., & Osako, K. (2014). Development and characterization of blend
401 films based on fish protein isolate and fish skin gelatin. *Food Hydrocoll*, 39, 58-67.

402

403 Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Protein hydrolysates: processes and applications. *Acta Bioquim*
404 *Clin Latinoam*, 42, 227-36.

405

406 Büege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, 302-310.

407

[Escriba texto]

408 Burcham, P. C. (2007). Modified protein carbonyl assay detects oxidized membrane proteins: A new tool
409 for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *J Pharmacol Toxicol Methods*, *56*, 18-22.

410

411 Conway, E. J., & Byrne, A. (1936). An absorption apparatus for the micro-determination of certain
412 volatile substances I. The micro-determination of ammonia. *J Biochem*, *27*, 419-429.

413

414 Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based
415 antimicrobial films in food applications. *Food Chem*, *114*, 1173-1182.

416

417 Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, *82*, 70-77.

418

419 Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci*, *89*, 259-279.

420

421 Eymard, S., Baron, C. P., & Jacobsen, C. (2009). Oxidation of lipid and protein in horse mackerel
422 (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chem*, *114*, 57-65.

423

424 Fan, W. J., Sun, J. X., Chen, Y. C., Qiu, J., Zhang, Y., & Chi, Y. L. (2009). Effects of chitosan coating on
425 quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chem*, *115*, 66-70.

[Escriba texto]

426

427 Gao, L., Oomah, B. D., & Mazza, G. (2002). Wheat quality: antioxidant activity wheat millstreams. In: B.D.
428 Oomah and G. Mazza. (Eds.), *Wheat quality elucidation* (pp. 219-233). St. Paul, MN: AACC International
429 Press.

430

431 García-Argueta, I., Quintero-Salazar, B., Dominguez-Lopez, A., Gómez-Oliván, L. M., Díaz-Bandera, D., &
432 Dublán-García, O. (2016). Effect of edible coating based on whey, inulin and gelatine with *Lactobacillus*
433 *casei* on the textural and sensorial properties of a cracker cookie. *J Prob Health*, 4, 153.

434

435 Giménez, B., Roncalés, P., & Beltrán, J. A. (2002). Modified atmosphere packaging of filleted rainbow
436 trout. *J Sci Food Agric*, 82, 1154-1159.

437

438 Gornall, A. J., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the
439 biuret reaction. *Biol Chem*, 177, 751-766.

440

441 ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods, (1986). *Microorganisms in*
442 *foods. 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications*. (2nd ed.). Buffalo,
443 NY: University of Toronto Press.

444

[Escriba texto]

445 Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for
446 detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem*, *202*, 384-389.

447

448 Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat
449 and meat products. *Food Chem*, *107*, 845-852.

450

451 Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage
452 T4. *Nature*, *227*, 680-685.

453

454 Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of
455 oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, *233*, 346-357.

456

457 Li, T., Hub, W., Li, J., Zhang, X., Zhu, J., & Li, X. (2012). Coating effects of tea polyphenol and rosemary
458 extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*).
459 *Food Control*, *25*, 101-106.

460

461 Li, T., Li, J., Hu, W., & Li, X. (2013). Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*)
462 fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. *Food Chem*, *138*, 821-826.

463

[Escriba texto]

464 López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A chitosan–
465 gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocoll*, *19*, 303-311.

466

467 McKay D. L., & Blumberg J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of
468 peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother Res*, *20*, 619-633.

469

470 Mehta, N. K., Elavarasan, K., Reddy, A. M., & Shamasundar, B. A. (2014). Effect of ice storage on the
471 functional properties of proteins from a few species of fresh water fish (Indian major carps) with special
472 emphasis on gel forming ability. *J Food Sci Technol*, *51*, 655-663.

473

474 Motalebi, A. & Seyfzadeh, M. (2011). Effects of whey protein edible coating on bacterial, chemical and
475 sensory characteristics of frozen common Kilka (*Clupeonellia delitula*). *Iran J Fish Sci*, *11*, 132-144.

476

477 Ngapo, T., Wilkinson, B., Chong, R., & Haisman, D. (1992). Gelation of bovine myofibrillar protein
478 induced by 1,5 Gluconolactone. In: *Proceedings of the 38th International Congress of Meat Science and*
479 *Technology* (pp. 1095-1098). Clermont-Ferrand, France.

480

481 NOM-092-SSA1-1994 (1994). Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Mexico City:
482 Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. 12-12-1995.

[Escriba texto]

483

484 Nowzari, F., Shábanpour, B., & Ojagh, S. M. (2013). Comparison of chitosan-gelatin composite and
485 bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chem*, *141*, 1667-1672.

486

487 Ocaño-Higuera, V. M., Maeda-Martínez, A. N., Márquez-Ríos, E., Canizales-Rodríguez, D., Castillo-Yáñez,
488 F. J., Ruíz-Bustos, E., Graciano-Verdugo, A. Z., & Plascencia-Jatomea, M. (2011). Freshness assessment of
489 ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. *Food Chem*, *125*, 49-54.

490

491 Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. M., & Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched
492 with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chem*, *120*, 193-198.

493

494 Owen, J. E., Nuñez, F. A., Arias, M. T., De Cano, R., & Rios, O. (1982). *Manual de prácticas de cursos de*
495 *tecnologías de la carne*. Chihuahua, Mexico: Facultad de Zootecnia, Universidad de Chihuahua.

496

497 Parvez, S., & Raisuddin, S. (2005). Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-
498 inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ Toxicol Pharmacol*, *20*, 112-117.

499

[Escriba texto]

500 Pilosof, A. M. R. (2000). Solubilidad. In: A. M. R. Pilosof, & G. B. Barholomai (Eds.), *Caracterización*
501 *funcional y estructural de proteínas* (pp. 60-75). ciudad: Ceudeba CYTED (Programa Iberoamericano de
502 Ciencia y Tecnología para el Desarrollo).

503

504 Ranilla, L. G., Kwon, Y. I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2010). Phenolic compounds antioxidant activity
505 and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of
506 commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresour Technol*, *101*, 4676-4689.

507

508 Sallam, K. I. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium
509 citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, *18*, 566-575.

510

511 Sample, S. (2013). Oxidation and antioxidants in fish and meat from farm to fork. In I.

512 Muzzalupo (Ed.), *Food industry* (pp. 114–144). Croatia: InTech Publishing.

513

514 Sánchez-Alonso, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., & Borderías, A. J. (2008). Antioxidant protection
515 of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage, *LWT-Food Sci Technol*, *41*,
516 42-50.

517

[Escriba texto]

518 Singh, R., Shushni, M. A. M., & Belkheir, A. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha*
519 *piperita* L. *Arab J Chem*, 8, 322-328.

520

521 Zheng, L. Y., & Zhu, J. F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular
522 weights. *Carbohydr Polym*, 54, 527-530.

523

524 Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric*
525 *Food Chem*, 49, 5165-5170.

526

527

528

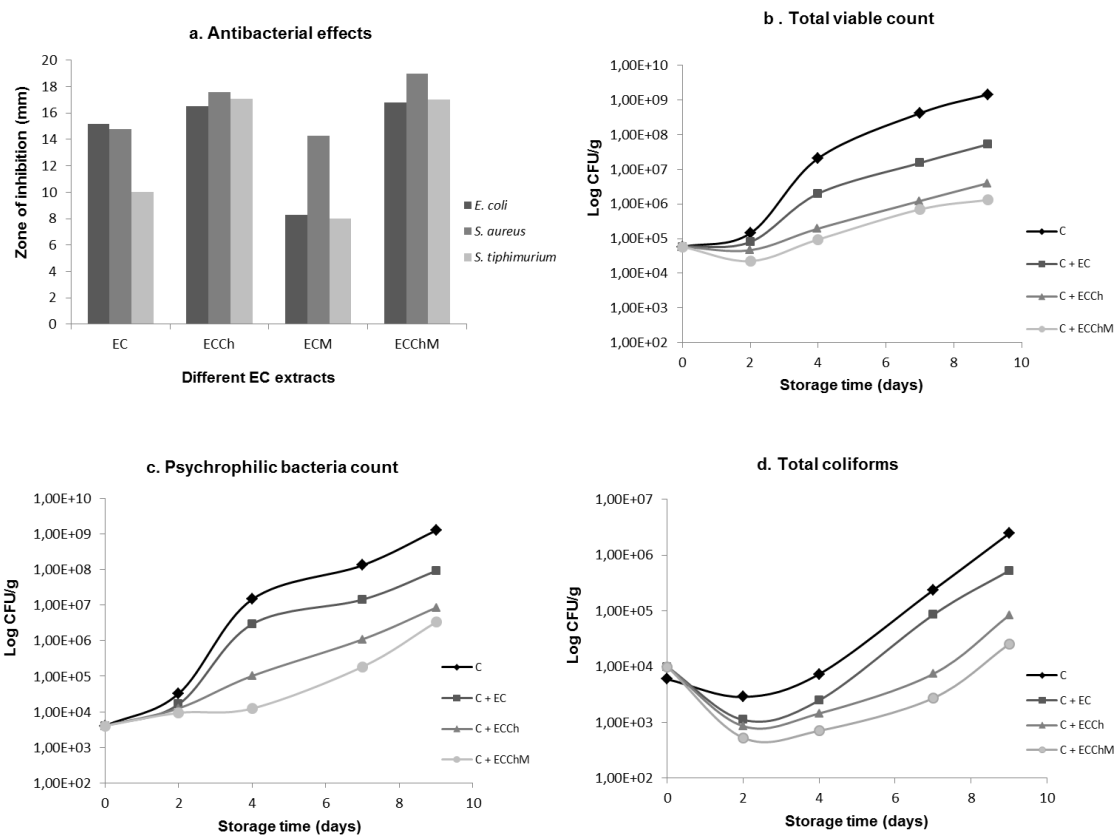
529

530

531

532 **Figure caption**

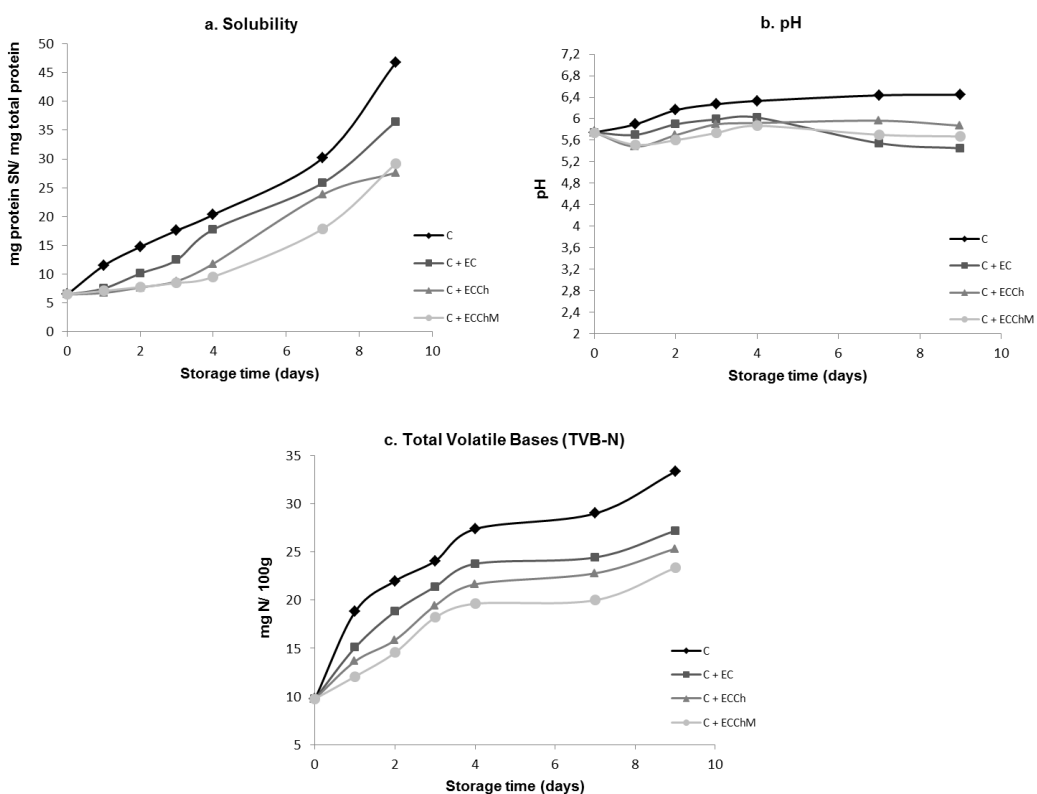
[Escriba texto]



533

534 **Figure 1.** Changes in the microbiological characteristics of: (a) peppermint extract and coating solutions; and (b),
535 (c) and (d) common carp (*Cyprinus carpio*) fillets stored at 4°C for nine days. Values are the mean of three
536 replicates. C = uncoated fillet (control); C+EC = carp fillet with edible coating; C+ECCh = carp fillet with chitosan
537 based coating; C+ECChP = carp fillet with chitosan based coating enriched with peppermint extract; CFU = colony-
538 forming units.

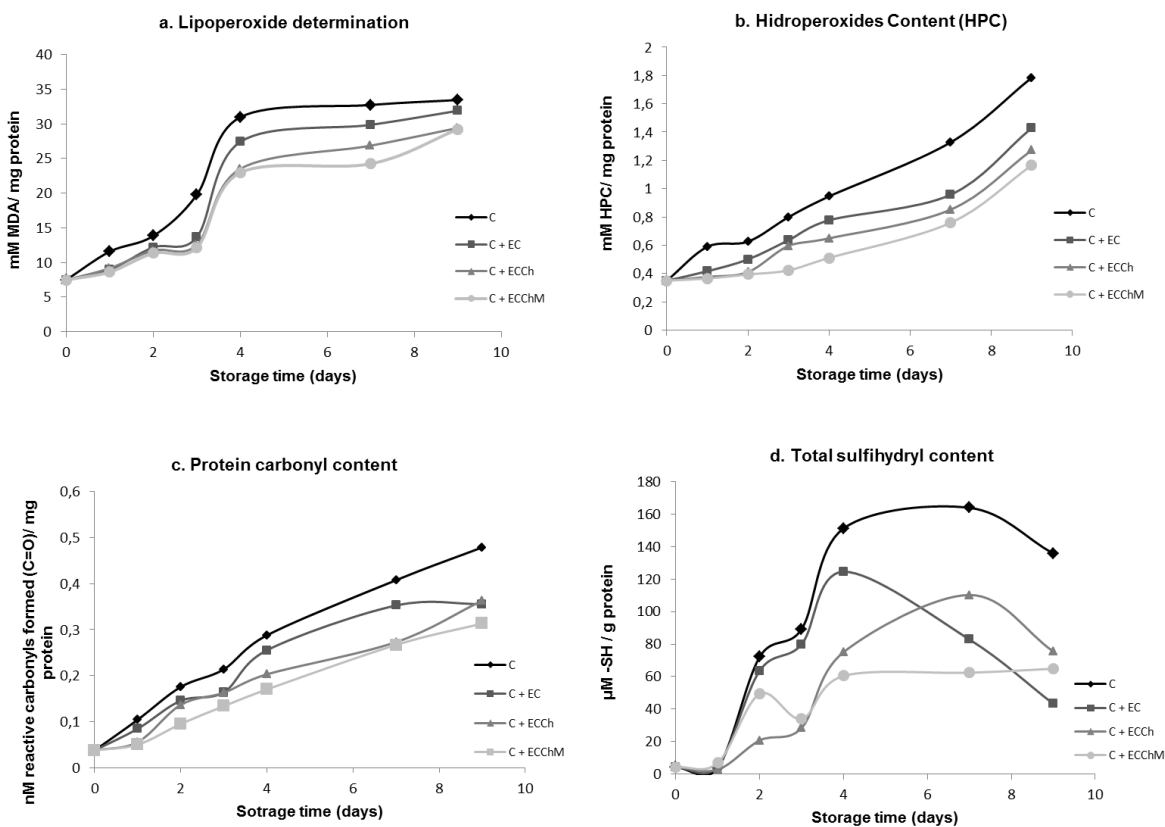
[Escriba texto]



539

540 **Figure 2.** Changes in the physicochemical properties of common carp (*Cyprinus carpio*) fillets stored at 4°C for nine
541 days. Values are the mean of three replicates. C = uncoated fillet (control); C+EC = carp fillet with edible coating;
542 C+ECCh = carp fillet with chitosan based coating; C+ECChP = carp fillet with chitosan based coating enriched with
543 peppermint extract; SN = supernatant.

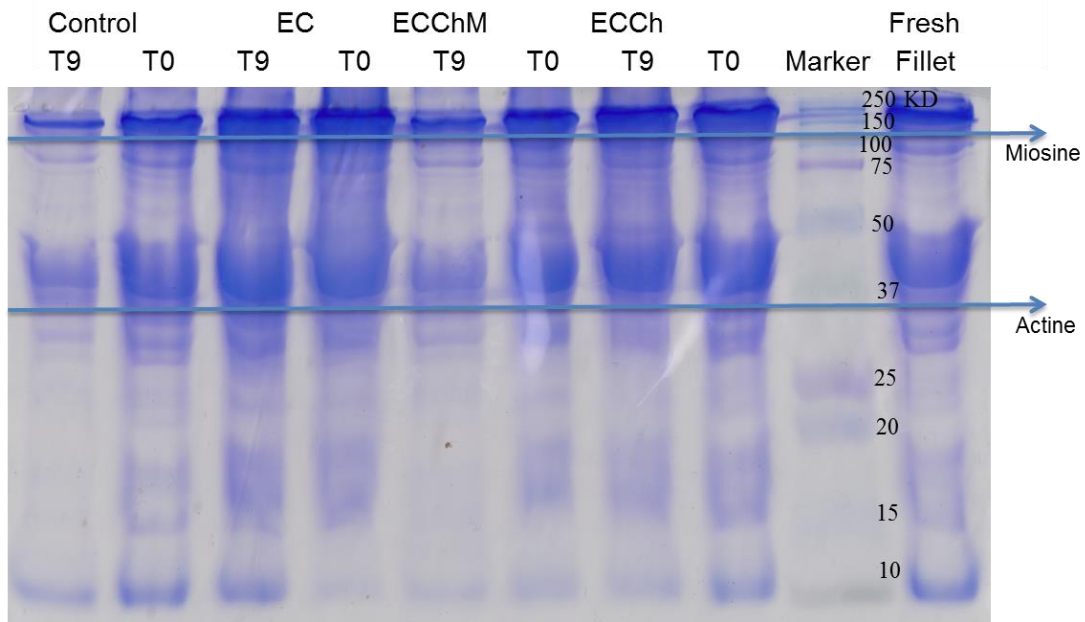
[Escriba texto]



544

545 **Figure 3.** Changes in formation of oxidation products in common carp (*Cyprinus carpio*) fillets stored at 4°C for nine
546 days. Values are the mean of three replicates. C = uncoated fillet (control); C+EC = carp fillet with edible coating;
547 C+ECCh = carp fillet with chitosan based coating; C+ECChP = carp fillet with chitosan based coating enriched with
548 peppermint extract; MDA = malondialdehyde; CHP = cumene hydroperoxide; -SH = sulfhydryl.

[Escriba texto]



549

550 **Figure 4.** SDS-PAGE of MP during refrigerated storage. EC = edible coating base; ECCh = chitosan based edible
551 coating; ECChP = chitosan based edible coating enriched with peppermint extract.

552

553