



Effects of 4-hexilresorcinol and sodium metabisulfite on melanosis in fresh shrimps (*Penaeus vannamei*)

Efectos del 4-hexilresorcinol y metabisulfito de sodio sobre la melanosis en camarones frescos (*Penaeus vannamei*)

Bermúdez-Medranda, A. E.*^{ID}; Panta-Vélez, R. P.^{ID}

Escuela en Acuicultura y Pesquerías, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Técnica de Manabí, Ciudadela Universitaria, Bahía de Caráquez, Manabí, Ecuador.

Cite this paper/Como citar este artículo: Bermúdez-Medranda, A. E.; Panta-Vélez, R. P. (2019). Effects of 4-hexilresorcinol and sodium metabisulfite on melanosis in fresh shrimps (*Penaeus vannamei*). *Revista Bio Ciencias* 6, e465. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e465>



ABSTRACT

Ecuador is an important source of food for the crustacean *Penaeus vannamei* worldwide, generating economic resources for the country. The shrimps after their death go through a process of blackening affecting their commercial value, being the cause of greater rejection of the product in the international market the melanosis in the shrimp, which is a change of color of the surface caused by enzymatic formation of compounds precursors which can spontaneously polymerize and/or react with cellular components to form insoluble pigments. A method used to prevent melanosis is the addition of preservatives in the post-harvest management of shrimp. The objective of the present study was to evaluate concentrations of sodium metabisulfite at 4 and 6 % and 4-hexilresorcinol at 2 and 2.5 %, as inhibitors of melanosis. The residual levels obtained from the treatments were determined by means of the

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: January 27th 2018.

Accepted/Aceptado: June 08th 2018.

Available on line/Publicado: March 22nd 2019.

RESUMEN

Ecuador constituye a nivel mundial una fuente importante de alimentación del crustáceo *Penaeus vannamei*, generando recursos económicos para el país. Los camarones tras su muerte a traviesan por un proceso de ennegrecimiento afectando su valor comercial, siendo la causa de mayor rechazo del producto en el mercado internacional la melanosis en el camarón, la cual es un cambio de color de la superficie causado por formación enzimática de compuestos precursores los cuales pueden polimerizarse espontáneamente y/o reaccionar con componentes celulares para formar pigmentos insolubles. Un método utilizado para evitar la melanosis es la adición de preservantes en el manejo post cosecha del camarón. El objetivo del presente estudio fue evaluar concentraciones de metabisulfito de sodio a 4 y 6 % y 4-hexilresorcinol a 2 y 2.5 %, como inhibidores de la melanosis. Se determinó los niveles residuales obtenidos de los tratamientos, por medio del método de Monier Williams modificado para metabisulfito de sodio y la técnica de Nakazato *et al.* (2005) (HPLC-UV) para determinación residual de 4-Hexilresorcinol. Los resultados obtenidos mostraron que los dos preservantes cumplen con los

*Corresponding Author:

Bermúdez-Medranda, A. E., Escuela de Acuicultura y Pesquerías, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Ciudadela Universitaria, Bahía de Caráquez, Manabí, Ecuador. E-mail: abermudez@utm.edu.ec.

modified Monier Williams method for sodium metabisulfite and the technique of Nakazato *et al.* (2005) (HPLC-UV) for residual determination of 4-Hexylresorcinol. The results obtained showed that the two preservatives meet the residual levels allowed in European legislation. Likewise, the organoleptic factors of odor, color and flavor for the sensory analysis and the microbiological characteristics: did not reveal significant differences in any of the treatments tested. The determination of the percentage of shrimp affected with melanosis in the test of resistance of raw shrimp for 6 hours in environmental exposure, indicate significant differences between the control and the preservatives evaluated ($p < 0.0001$). The antimelanosis action was verified in treatments with 4-hexylresorcinol, an additive considered GRAS (Generally Recognized as Safe), which was as effective as sodium metabisulfite.

KEY WORDS

Melanization, shrimp.

Introduction

The great demand in the international market that presents the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) and the growing exports of this product from Ecuador, generate a large inflow of foreign currency to the country and allow an important movement of money worldwide.

Due to the high competitiveness and the demands of the markets, the control of the quality of the product becomes increasingly rigorous, rejecting containers that do not comply with microbiological, chemical or sensory specifications. One of the most important indicators in this control, due to the immediacy of its evidence is the presence of melanosis (Martínez, 2017), which constitutes a serious problem that has resulted in great economic losses for producers and the entire marketing chain, because it generates a depreciation of shrimp quality (Loubes *et al.*, 2009). Hence the great importance of achieving a rapid and efficient process before freezing, since melanosis, being a phenomenon of enzymatic origin, usually begins immediately after the death of the animal, although in some cases it has taken place in live specimens (Ogawa *et al.*, 1984). For these reasons enzymatic darkening is one of the

niveles residuales permitidos en la legislación europea. Asimismo, los factores organolépticos de olor, color y sabor para el análisis sensorial y las características microbiológicas: no revelaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos probados. La determinación del porcentaje de camarones afectados con melanosis en la prueba de resistencia de los camarones crudos por 6 horas en exposición ambiental, indican diferencias significativas entre el control y los preservantes evaluados ($p < 0.0001$). La acción antimelanósica se verificó en los tratamientos con 4-hexilresorcinol, aditivo considerado GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro), el cual resultó tan eficaz como el metabisulfito de sodio.

PALABRAS CLAVE

Melanización, camarón.

Introducción

La gran demanda en el mercado internacional que presenta el camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) y las crecientes exportaciones de este producto desde el Ecuador, generan una gran entrada de divisas al país y permiten un importante movimiento de dinero a nivel mundial.

Debido a la alta competitividad y las exigencias de los mercados, cada vez se vuelve más riguroso el control de la calidad del producto, rechazando contenedores que no cumplen con especificaciones microbiológicas, químicas o sensoriales. Uno de los indicadores más importantes en este control, por la inmediatez de su evidencia es la presencia de melanosis (Martínez, 2017), la cual constituye un serio problema que ha traído como resultado grandes pérdidas económicas para los productores y a toda la cadena de comercialización, pues genera una depreciación de la calidad del camarón (Loubes *et al.*, 2009). De ahí la gran importancia de lograr un proceso rápido y eficiente antes de la congelación, ya que la melanosis al ser un fenómeno de origen enzimático comienza, generalmente, inmediatamente después de la muerte del animal, aunque en algunos casos ha tenido lugar en especímenes vivos (Ogawa *et al.*, 1984). Por tales razones el oscurecimiento enzimático es una de las reacciones más importantes que afectan a los crustáceos, por lo que su prevención es muy imprescindible (Marshall *et al.*, 2000).

most important reactions that affect crustaceans, so its prevention is very essential (Marshall *et al.*, 2000).

In order to avoid the melanismic phenomenon suffered by most crustaceans of commercial interest, sulphites began to be used in the 50s and from then on, they spread widely due to their effectiveness and low cost. But in recent years, numerous research studies about their possible adverse effects and cases of allergies in asthmatic or sensitive people have aroused the concern of consumers and the search for alternative treatments in the prevention of melanosis. Due to the danger of sulfites to public health, different countries have adopted regulatory measures regarding the use and residual concentration of sulfites in crustaceans (Loubes *et al.*, 2009), considering a potential danger to human health because it can cause nausea, gastric irritation and vomiting in humans due to the destruction of thiamine and in susceptible individuals causes allergic reactions in small quantities (Hidalgo, 2011; Díaz, 2011).

Currently the shrimp *P. vannamei* cultivated in Ecuador is marketed treated with sodium metabisulfite, an antioxidant of proven efficacy, but over time the residual rate of metabisulfite in tissues decreases and when it becomes insufficient, melanosis mechanisms start again (Llerena, 2011), for which the export sector shows its concern to comply with product quality requirements and the maximum residual concentration of sulphites in the edible part. Another disadvantage is the harmful impact of sodium metabisulfite on the environment, analyzing the quality of water in the shrimp supply channels, shows the harmful effect in the shrimp environment, appreciated by the deterioration of water in the growth of phytoplankton, concentration of dissolved oxygen, transparency, among others (Ibarra-Menéndez & Ibarra-Menéndez, 2012).

For all the above, in the last two decades studies have focused on the search for other alternatives for the replacement of sodium metabisulfite, being the 4-hexylresorcinol the possible substitute, since its use is allowed by the health authorities of EE.UU, Canada, Australia and some Latin American countries, since it has been used in the cosmetologically and pharmaceutical industry (Martínez-Álvarez *et al.*, 2007).

The objective of this work was to compare in the shrimp muscle the residual concentrations of the preservatives metabisulfites of sodium and 4-hexylresorcinol in shrimp *P. vannamei*, in turn know if they allow to maintain the quality

A fin de evitar el fenómeno melanósico que sufren la mayor parte de los crustáceos de interés comercial, los sulfitos comenzaron a ser utilizados en los años 50 y a partir de ese momento se difundieron ampliamente debido a su efectividad y a su bajo costo. Pero en los últimos años, numerosos trabajos de investigación acerca de sus posibles efectos adversos y casos de alergias en personas asmáticas o sensibles han despertado la preocupación de los consumidores, y a la búsqueda de tratamientos alternativos en la prevención de la melanosis. Debido a la peligrosidad de los sulfitos para la salud pública, diferentes países han adoptado medidas regulatorias en cuanto al uso y concentración residual de sulfitos en crustáceos (Loubes *et al.*, 2009), considerándose un peligro potencial a la salud humana pues puede provocar náusea, irritación gástrica y vómito en el ser humano debido a la destrucción de la tiamina y en individuos susceptibles provoca reacciones alérgicas en cantidades pequeñas (Hidalgo, 2011; Díaz, 2011).

Actualmente el camarón *P. vannamei* cultivado en Ecuador se comercializa tratado con metabisulfito de sodio, antioxidante de probada eficacia, pero con el tiempo la tasa residual de metabisulfito en los tejidos disminuye y cuando se vuelve insuficiente, los mecanismos de melanosis inician nuevamente (Llerena, 2011), por lo cual el sector exportador muestra su preocupación de cumplir con requisitos de calidad del producto y de la concentración residual máxima de sulfitos en la parte comestible. Otra desventaja es el impacto perjudicial del metabisulfito de sodio sobre el ambiente, analizando la calidad del agua en los canales de abasto de camarónicas, manifiesta el efecto nocivo en el ambiente camarónero, apreciado por el deterioro del agua en el crecimiento de fitoplancton, concentración de oxígeno disuelto, transparencia, entre otras (Ibarra-Menéndez & Ibarra-Menéndez, 2012).

Por todo lo expuesto, en las dos últimas décadas los estudios se han enfocado en la búsqueda de otras alternativas para la sustitución del metabisulfito de sodio, siendo el 4-hexilresorcinol el posible sustituto, ya que su uso está permitido por las autoridades sanitarias de EE.UU, Canadá, Australia y algunos países de Latinoamérica, ya que ha sido usado en la industria cosmetológica y farmacéutica (Martínez-Álvarez *et al.*, 2007).

El objetivo de este trabajo fue comparar en el músculo del camarón las concentraciones residuales de los preservantes metabisulfitos de sodio y 4-hexilresorcinol en camarones de *P. vannamei*, a su vez conocer si permiten mantener la calidad del producto durante su comercialización, inhibiendo la melanosis y que no presenten riesgos para la salud del consumidor.

of the product during marketing, inhibiting melanosis and that they do not present risks for the health of the consumer.

Material and Methods

Study area

P. vannamei shrimp were treated with sodium metabisulfite (MBS) in a shrimp farm located in Cojimíes, Pedernales, Manabí, Ecuador. The residual analyzes of MBS were carried out in the laboratory of a shrimp exporting company located in Coaque, Pedernales, Manabí, Ecuador, between October 2013 and January 2014.

In the experiment, a randomization design with four treatments and six repetitions was used. The treatments determined were: control (T1); immersion of the fresh shrimp in a 2 % solution of 4-hexylresorcinol (T2); immersion of fresh shrimp in a 2.5 % solution of 4-hexylresorcinol (T3); immersion of fresh shrimp in 4 % sodium metabisulfite solution (T4) and immersion of fresh shrimp in 6 % sodium metabisulfite solution (T5).

All treatments lasted 15 minutes.

Sampling was done with shrimp of a commercial size of 12 g in each of the replicates. The amount in kilograms of animals used in the different dives was 4.5 kg, corresponding to the harvesting protocol of the exporting company, in the case of sodium metabisulfite. For 4-Hexylresorcinol the dosage of the chemical was carried out according to the recommendation of the manufacturer of the input.

The measurement of residual sodium metabisulfite was calculated using the modified Monier Williams method AOAC 18Th 990.28 (Horwitz, 2000) and for 4-Hexylresorcinol the technique of Nakazato *et al.* (2005) (HPLC-UV).

Shrimp harvest method.

In the northern area of Manabí, the shrimp is harvested with a bag that is collected while the pond is drained. This process is done with great care to prevent animal damage or excessive accumulation of mud and dirt mixed with the shrimp. The bag is emptied in clean baskets, tubs or bins approximately every 15 or 20 minutes. Depending on the amount to be harvested, temporary storage units (drawers' plastic) must weigh no more than 35 to 45 pounds to allow reasonable handling. The shrimp

Material y Métodos

Área de estudio

Los camarones *P. vannamei* enteros fueron tratados con metabisulfito de sodio (MBS) en una camaronera ubicada en Cojimíes, Pedernales, Manabí, Ecuador. Los análisis residuales de MBS se efectuaron en el laboratorio de una empresa exportadora de camarón localizada en Coaque, Pedernales, Manabí, Ecuador, entre octubre del 2013 y enero del 2014.

En el experimento se utilizó un diseño aleatorio con cuatro tratamientos y seis repeticiones. Los tratamientos determinados fueron: testigo (T1); inmersión del camarón fresco en solución de 4-hexilresorcinol al 2 % (T2); inmersión del camarón fresco en solución de 4-hexilresorcinol al 2.5 % (T3); inmersión del camarón fresco en solución de metabisulfito de sodio al 4 % (T4) e inmersión del camarón fresco en solución de metabisulfito de sodio al 6 % (T5). Todos los tratamientos tuvieron una duración de 15 minutos. El muestreo se efectuó con camarones de un tamaño comercial de 12 g en cada una de las repeticiones. La cantidad en kilogramos de animales utilizados en las diferentes inmersiones fue de 4.5 kg correspondiente con el protocolo de cosecha de la empresa exportadora, en el caso del metabisulfito de sodio. Para 4-Hexilresorcinol la dosificación del químico se realizó acorde a la recomendación del fabricante del insumo.

La medición del residual de metabisulfito de sodio se calculó utilizando el método Monier Williams modificado AOAC 18Th 990.28 (Horwitz, 2000) y para el 4-Hexilresorcinol la técnica de Nakazato *et al.* (2005) (HPLC-UV).

Método de cosecha de camarón

En la zona Norte de Manabí, el camarón es cosechado con una bolsa que se recoge mientras se drena el estanque. Este proceso se realiza con mucho cuidado para prevenir daños en el animal o acumulación excesiva de fango y suciedad mezclados con el camarón. La bolsa se vacía en cestas, tinas o bins limpios aproximadamente cada 15 o 20 minutos. Dependiendo de la cantidad a cosechar, las unidades del almacenamiento temporal (gavetas), deben pesar no más de 35 a 45 libras para permitir una manipulación razonable. El camarón debe ser tratado desde la camaronera para prevenir el desarrollo de la melanosis para lo cual se debe aplicar metabisulfito de sodio.

Método de aplicación de 4-Hexilresorcinol al 2 % en camaronera.

4.5 litros de agua fueron colocados en una tina de 50 L de capacidad, agregándose posteriormente 4.5 kg de

should be treated from the shrimp farm to prevent the development of melanosis for which sodium metabisulfite should be applied.

Method of application of 4-hexylresorcinol at 2 % in shrimp farms.

4.5 L. of water were placed in a tub of 50 L. capacity, adding 4.5 kg of ice and 180 mL of 4-hexylresorcinol, where the live shrimp was submerged for the respective absorption of the preservative.

Method of application of 4-hexylresorcinol at 2.5 % in shrimp.

In a 50 L. capacity tank, 4.5 L. of water, 4.5 kg of ice and 225 mL of 4-hexylresorcinol were placed, then the live crustacean was submerged.

Method of application of sodium metabisulfite (4 % solution) in shrimp farming.

For the application of sodium metabisulfite (4 % solution), 15.36 liters of water were placed in a 50 L. tub. Subsequently, 3.84 kg of ice was added, and the solution was stirred well, always maintaining the temperature of the water in the tub between 5-12 °C.

Approximately 1 L. of water was placed at room temperature in a container and 800 grams of sodium metabisulfite was dissolved therein. Once the Metabisulfite is well dissolved, the solution obtained should have a pH between 4.1-4.2. This solution was added to the previously prepared tub, where a temperature of 5 °C is maintained.

The harvested shrimp was submerged in the previously prepared tub, for 15 minutes, considering that this controlled immersion was one minute for each gram of the average weight of the harvested shrimp (SLA, 2011), once the stipulated time had elapsed, the operator proceeded to remove the shrimp with a drawer (with holes) and then placed in conical (closed) drawers adding ice at the bottom and top to keep the shrimp at a temperature of 6 ± 2 °C, for transport and arrival to the processing plant.

Method of application of sodium metabisulfite (6 % solution) in shrimp farming.

In a 50 L. capacity tub, 15.04 liters of water, 3.76 kg of ice and 1,200 grams of sodium metabisulfite (6 % solution) were placed, where the shrimps were submerged to absorb the preservative.

hielo y 180 mL de 4-hexilresorcinol, donde se sumergió el camarón vivo para la respectiva absorción del preservante.

Método de aplicación de 4-Hexilresorcinol al 2.5 % en camaronera.

En una tina de 50 L., se colocó 4.5 L de agua, 4.5 kg de hielo y 225 mL de 4-hexilresorcinol, seguidamente se sumergió el crustáceo vivo.

Método de aplicación de metabisulfito de sodio (solución al 4 %) en camaronera.

Para la aplicación del metabisulfito de sodio (solución al 4 %), 15.36 L. de agua fueron colocados en una tina de 50 L. Posteriormente se agregó 3.84 kg de hielo, la solución se agitó manteniendo siempre la temperatura del agua de la tina entre 5 - 12 °C.

Se colocó aproximadamente 1 L de agua a temperatura ambiente en un recipiente y se disolvió 800 g de metabisulfito de sodio. Una vez que está bien disuelto el metabisulfito, la solución obtenida debe tener un pH entre 4.1-4.2. Esta disolución se añadió a la tina anteriormente preparada, donde se mantiene una temperatura de 5 °C.

El camarón cosechado fue sumergido por 15 minutos en la tina preparada anteriormente, considerando que esta inmersión controlada sea de un minuto por cada gramo del peso promedio de los camarones cosechados (SLA, 2011), una vez culminado el tiempo estipulado, el operador procedió a sacar el camarón con una gaveta calada (con agujeros) y luego fueron colocados en gavetas cónicas (cerradas) adicionándole hielo en el fondo y en la parte superior para mantener el camarón a una temperatura de 6 ± 2 °C, para su transporte y arribo a la planta procesadora.

Método de aplicación de metabisulfito de sodio (solución al 6 %) en camaronera.

En una tina de 50 L se colocó 15.04 L de agua, 3.76 kg de hielo y 1,200 g de metabisulfito de sodio (solución 6 %), donde posteriormente se sumergieron los camarones a fin de que absorban el preservante.

Determinación de sulfito residual en producto fresco usando la técnica de Monier Williams modificada.

Fundamento

Se basa en la digestión de la muestra por acción

Determination of Residual Sulphite in Fresh Product using the modified Monier Williams technique.

Basis

It is based on the digestion of the sample by the action of concentrated hydrochloric acid and heat, obtaining by distillation the sulfites that are collected in 3 % neutral peroxide. The titration was carried out with a solution of sodium hydroxide containing a quantity of substance 0.01 mol/L.

Sample Preparation for Analysis in Processing Plant

The crustacean sample was taken at the time it arrived at the plant and the shrimp was prepared, the head or cephalothorax and the shell removed, taking care to leave the hepatopancreas, homogenized and weighed 30 grams in a watch glass.

Digestion of the Sample

The already weighed sample was placed in a 500 mL Kjeldahl balloon, 150 mL of distilled water and 10 ml of concentrated hydrochloric acid Q.P. were added at 37 % and it was brought to a moderate boil for a period of 20 minutes.

Preparation of the Collector Dissolution in the recovery fiolas.

In a 250 mL vial, 10 mL of 30 % hydrogen peroxide in 90 mL of distilled water was diluted to obtain a fresh solution of 3 % peroxide. To this solution was added 3 drops of methyl red and neutralized with a solution of sodium hydroxide containing an amount of 0.01 mol/L substance, the solution gave pinkish color change to straw yellow color. The fiola with the already neutralized solution was placed in the final part of the distillation equipment to collect the vapor condensate from the sample.

The presence of sulphites in the sample was differentiated by the color change back to pink, after 20 minutes of boiling, the fiola was removed and proceeded to the titration with the 0.01 N sodium hydroxide solution, applying the formula to obtain the results.

Calculation of results

$$ppm SO_2 = \frac{32.03 \times 0.01 \times 1000 \times (Consumption - White)}{Sample Weight (g)}$$

del ácido clorhídrico concentrado y calor, obteniéndose por destilación los sulfitos que se recogen en peróxido al 3 % neutro. La valoración se realizó con una disolución de Hidróxido de sodio conteniendo una cantidad de sustancia 0.01 mol/L.

Preparación de Muestra para Análisis en Planta Procesadora

Se tomó la muestra de crustáceo al momento que llegó a la planta y se preparó el camarón, eliminado la cabeza o cefalotórax y la cáscara, teniendo cuidado de dejar el hepatopáncreas, se homogenizó y se pesó 30 g en un vidrio de reloj.

Digestión de la Muestra

La muestra ya pesada se colocó en un balón Kjeldahl de 500 mL, se adicionó 150 mL de agua destilada y 10 mL de ácido clorhídrico concentrado Q.P., al 37 %, y se llevó a ebullición moderada por un lapso de 20 minutos.

Preparación de la Disolución Colectora en las fiolas de Recuperación.

En una fiola de 250 mL se diluyó 10 mL de peróxido de hidrógeno al 30 % en 90 mL de agua destilada para obtener una solución fresca de peróxido al 3 %. A esta solución se le agregó 3 gotas de rojo de metilo y se neutralizó con una disolución de hidróxido de sodio conteniendo una cantidad de sustancia 0.01 mol/L, la disolución dio cambio de color rosado a color amarillo pajizo. La fiola con la disolución ya neutralizada se colocó en la parte final del equipo de destilación para recoger el condensado de vapor de la muestra.

La presencia de sulfitos en la muestra se diferenció por el viraje de color nuevamente a rosado, posterior a los 20 minutos de ebullición, se retira la fiola y proceder a la titulación con la solución de hidróxido de sodio 0.01 N, aplicar la fórmula para obtener los resultados.

Método de Cálculo de los Resultados

$$ppm SO_2 = \frac{32.03 \times 0.01 \times 1000 \times (Consumption - White)}{Sample Weight (g)}$$

Dónde:

Constante de Sodio: 32.03 miliequivalentes de la masa mol SC.

0.01: Normalidad del NaOH.

1000: Factor de conversión de miliequivalentes a micro equivalentes.

Where:

Sodium constant: 32.03 milliequivalents of the mass mol SC.

0.01: Normality of NaOH.

1000: Conversion factor from milliequivalents to micro equivalents.

Consumption: Amount of NaOH substance 0.01 mg/L titrant.

White constant: 0.01 N NaOH consumption per reagent blank.

Weight: In grams of the shrimp sample that was introduced into the Ball.

ppm SO₂: Expression of the results in mg/L.

Evaluation of Melanosis.

The quality of the pigments (melanins), the decrease in their attractiveness and the commercial value (Luzuriaga *et al.*, 1997). To evaluate melanosis, 30 units of product were left at room temperature for 6 hours, assessing hour by hour, each of the treatments with the two preservatives. The determination was made in percentages of units of related samples. The amount of shrimp in the estimated time is based on the experiences of other packers and customers in the French market.

Evaluation of the organoleptic characteristics.

The organoleptic analysis was carried out in fresh product immediately upon the arrival of the product to the plant. The evaluation form was presented randomly coded with a three-digit number.

For this analysis the shrimp were cooked in water at boiling temperature for 3 to 4 minutes, in individual pots, renewing the water enters each sample. After cooking, the samples underwent rapid cooling by immersion in drinking water. The beheading and peeling was done manually. The 5 treatments were evaluated by a panel of ten judges in each of the repetitions, using in the evaluation form a hedonic scale with 9 parameters to be chosen by the judges.

The four treatments in odor characteristics, color and taste against white (product without treatment) were compared in order to evaluate if changes occur in the product, due to the application of preservatives.

Microbiological Characteristics of the Product.

Samples of shrimp treated with the two preservatives were analyzed according to the methodology by Maturin & Peeler (2001) for total aerobes and Feng *et al.* (2002) for fecal coliforms, respectively in an external laboratory.

Consumo: De cantidad de sustancia de NaOH 0.01 mg/L titulante.

Constante de Blanco: Consumo de NaOH 0.01 N por blanco de reactivos.

Peso: En gramos de la muestra de camarón que fue introducida dentro del Balón.

ppm SO₂: Expresión de los resultados en mg/L.

Evaluación de la Melanosis

Un aspecto importante de calidad a ser evaluado en los camarones es el grado de melanosis, el cual resulta en el oscurecimiento del exoesqueleto debido a la formación de pigmentos (melaninas), disminuyendo su atractivo y por ende su valor comercial (Luzuriaga *et al.*, 1997). Para evaluar la melanosis se dejó en reposo 30 unidades de producto crudo a temperatura ambiente durante 6 horas, valorándose hora a hora, cada uno de los tratamientos con los dos preservantes. La determinación se realizó en porcentajes de unidades de muestras afectadas. La cantidad de camarones en reposo y el tiempo estimado, se basa en experiencias obtenidas de otras empacadoras y de clientes del mercado francés.

Evaluación de las características organolépticas.

El análisis organoléptico fue realizado en producto fresco de manera inmediata a la llegada del producto a la planta. La ficha de evaluación se presentó codificada de manera aleatoria con un número de tres dígitos.

Para este análisis los camarones fueron cocidos en agua a temperatura de ebullición de 3 a 4 minutos, en ollas individuales, renovando el agua entra cada muestra. Finalizada la cocción, las muestras se sometieron a un rápido enfriamiento por inmersión en agua potable. El descabezado y pelado fue realizado de forma manual. Los 5 tratamientos fueron evaluados por un panel de diez jueces en cada una de las repeticiones, utilizándose en la ficha de evaluación una escala hedónica con 9 parámetros a escoger por parte de los jueces.

Se comparó los cuatros tratamientos en características de olor, color y sabor contra el blanco (producto sin tratamiento), a fin de evaluar si ocurren cambios en el producto, debido a la aplicación de los preservantes.

Características Microbiológicas del Producto.

Las muestras de camarón tratado con los dos preservantes fueron analizadas de acuerdo con la metodología de Maturin & Peeler (2001) para aerobios totales y Feng *et al.* (2002) para coliformes fecales en un laboratorio externo.

Statistical analysis.

The data obtained from the analysis were stored and processed in Excel and Infostat spreadsheets as a tool for analysis. The results were presented as the mean \pm standard deviation. In all cases a Kolmogorov-Smirnov test was performed to verify normality and the Levene test for homogeneity of variance prior to the one-way ANOVA and Tukey test and for the nonparametric Kruskal-Wallis test. The significant differences were calculated in $p < 0.05$.

Results

Evaluation of the residuals of preservatives metabisulfite of sodium and 4 hexilresorcinol.

The results obtained in the samples of residual concentration in the shrimp muscle, comparing sodium metabisulfite and 4-hexylresorcinol, showed significant differences between treatments ($p = 0.0001$). Table 1 shows the average residual concentrations of both preservatives, obtaining the lowest concentration in the 4-hexylresorcinol at 2.5 % (T3) with 1.04 ± 1.25 mg/kg and the highest concentration in the metabisulfite of sodium at 4 % (T4) with 75.44 ± 17.39 mg/kg.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los análisis fueron almacenados y procesados en hojas de cálculo Excel e Infostat como herramienta para el análisis. Los resultados fueron presentados como el promedio \pm desviación estándar. En todos los casos se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad y la prueba Levene para la homogeneidad de varianza previo al ANOVA de una vía y prueba Tukey. Para los datos no paramétricos el test de Kruskal-Wallis fue utilizado. Las diferencias significativas se calcularon en $p < 0.05$.

Resultados

Evaluación de los residuales de los preservatives metabisulfite de sodio y 4 hexilresorcinol.

Los resultados obtenidos en las muestras de concentración residual en el musculo del camarón, comparando el metabisulfite de sodio y el 4-hexilresorcinol reflejaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0.0001$). En la Tabla 1, se aprecian las concentraciones residuales promedios de ambos preservatives, obteniendo la menor concentración en el 4-Hexilresorcinol al 2.5 % (T3) con 1.04 ± 1.25 mg/kg y la mayor concentración en el metabisulfite de sodio al 4 % (T4) con 75.44 ± 17.39 mg/kg.

Table 1.
Residual concentration of sodium metabisulfite and 4-hexilresorcinol in the shrimp muscle in the different treatments evaluated.

Tabla 1.
Concentración residual de metabisulfite de sodio y 4-hexilresorcinol en el musculo del camarón en los diferentes.

Treatments	Concentración Residual (mg/kg) ($\bar{x} \pm DS$)
Control (T1)	0.00 \pm 0.00 a
4-Hexilresorcinol al 2 % (T2)	1.36 \pm 2.69 a
4-Hexilresorcinol al 2.5 % (T3)	1.04 \pm 1.25 a
Sodium Metabisulfite al 4 % (T4)	75.44 \pm 17.39 b
Sodium Metabisulfite al 6 % (T5)	74.50 \pm 18.17 b

*Stockings with different letters significantly for $p < 0.05$.

*Stockings with different letters significantly for $p < 0.05$.

Evaluation of the organoleptic and microbiological characteristics.

The organoleptic variables were estimated in order to establish if the antimelanoses modify the sensory characteristics of the cooked samples of the crustacean. After the evaluation of the non-parametric Kruskal-Wallis test, it was determined that there were no significant differences in the treatments in the different parameters evaluated ($p>0.05$) (Table 2), observing in the taste, a total average of 5.95 ± 2.00 (I like it little). In the odor I present a general average of 6.42 ± 2.03 and in the color. I present a total average of 5.46 ± 2.03 (I do not like or dislike).

There was no significant difference in any of the treatments ($p=0.3673$) in the microbiological analysis for total mesophilic aerobes, indicating that in the types of preservatives and their concentration, they are effective in reducing the bacterial load. Despite this, a lower initial population was observed in T4 and T3. On the other hand, shrimp treated with 6 % sodium metabisulfite (T5) showed slightly higher CFU values of aerobic mesophilic bacteria (Table 2). Likewise there was an absence of bacteria in the analysis of fecal coliforms at 45 °C in the different treatments evaluated, including the control demonstrating a good quality of raw material and management of the executed process.

Evaluación de las características organolépticas y microbiológicas

La estimación de las variables organolépticas se efectuó con el fin de establecer si los antimelanósicos modifican las características sensoriales de las muestras cocidas del crustáceo. Tras la evaluación de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, se determina que no existe diferencias significativas en los tratamientos en los diferentes parámetros evaluados ($p>0.05$) (Tabla 2), observándose en el sabor, una media total de 5.95 ± 2.00 (me gusta poco). En el olor presento un promedio general de 6.42 ± 2.03 y en el color presento una media total de 5.46 ± 2.03 (no me gusta ni me disgusta).

No existió diferencia significativa en ninguno de los tratamientos ($p=0.3673$) en el análisis microbiológico para aerobios mesófilos totales, indicando que en los tipos de preservantes y concentración de estos, son efectivos para disminuir la carga bacteriana. A pesar de ello, se observó una menor población inicial en el T4 y T3. Por otra parte, los camarones tratados con metabisulfito de sodio al 6 % (T5), presentaron valores ligeramente mayores de CFU de bacterias aerobias mesófilas (Tabla 2). Así mismo hubo ausencia de bacterias en el análisis de coliformes fecales a 45 °C en los diferentes tratamientos evaluados incluyendo el control demostrando una buena calidad de materia prima y manejo del proceso ejecutado.

Table 2.
Analysis of the organoleptic and microbiological characteristics of the shrimp in the different treatments evaluated.

Tabla 2.
Análisis de las características organolépticas y microbiológicas del camarón en los diferentes tratamientos evaluados.

Quality parameters	Treatments					P value
	Control (T1)	4-Hexilresorcinol al 2 % (T2)	4-Hexilresorcinol al 2.5 % (T3)	Sodium metabisulfite al 4 % (T4)	Sodium metabisulfite al 6 % (T5)	
Flavor	6.05±2.09 a	5.62±2.11 a	6.00±1.92 a	6.39±1.80 a	5.69±2.11 a	0.2653
Odor	6.49±2.05 a	6.11±2.17 a	6.49±1.98 a	6.87±1.85 a	6.15±2.11 a	0.2613
Color	5.57±2.15 a	5.15±2.10 a	5.52±1.89 a	5.89±1.87 a	5.18±2.16 a	0.2560
Aerobic mesophilic (CFU/g)	616.67±466.55 a	1,160.00±1,570.89 a	291.67±358.13 a	248.33±372.58 a	41,428.33±79,203.91 a	0.3673

*Equal letters do not show significant differences between treatments ($p>0.05$).

*Las letras iguales no muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$).

Evaluation of melanosis

There were significant differences between the control and the evaluated preservatives ($p < 0.05$) (Figure 1) on the presence of melanosis in shrimp. The results obtained in the concentrations studied show similar results of absence, indicating that the two preservatives are effective for the control of melanosis in shrimp. The control or control sample (T1) showed an average of 7.27 ± 4.64 % melanization in the shrimp from the fifth hour of exposure in the resistance test.

Discussion

In the research carried out with the two treatments, both in concentration and type of preservative showed to be effective to avoid enzymatic darkening or melanosis in shrimp of the species *Penaeus vannamei*, which is related to that found by McEvily *et al.* (1991), Guandalini *et al.* (1998) and Loubes *et al.* (2009), who tested concentrations of sodium metabisulfite and 4-hexylresorcinol in *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum*, *Parapenaeus longirostris* and *Pleoticus muelleri*, determining that they are suitable agents to avoid melanization.

Evaluación de la melanosis

Existió diferencias significativas entre el control y los preservantes evaluados ($p < 0.05$) (Figura 1) sobre la presencia de melanosis en camarones. Los resultados obtenidos en las concentraciones estudiadas muestran resultados similares de ausencia, indicando que los dos preservantes son efectivos para el control de la melanosis en camarones. La muestra testigo o control (T1), presentó un promedio del 7.27 ± 4.64 % de melanización en los camarones a partir de la quinta hora de exposición en el test de resistencia.

Discusión

En la investigación realizada con los dos tratamientos, tanto en concentración como en tipo de preservante mostraron ser efectivos para evitar el oscurecimiento enzimático o melanosis en camarones de la especie *Penaeus vannamei*, lo cual guarda relación con lo hallado por McEvily *et al.* (1991), Guandalini *et al.* (1998) y Loubes *et al.* (2009), quienes probaron concentraciones de metabisulfito de sodio y de 4-hexilresorcinol en *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum*, *Parapenaeus longirostris* y *Pleoticus muelleri*, determinando que son agentes adecuados para evitar la melanización.

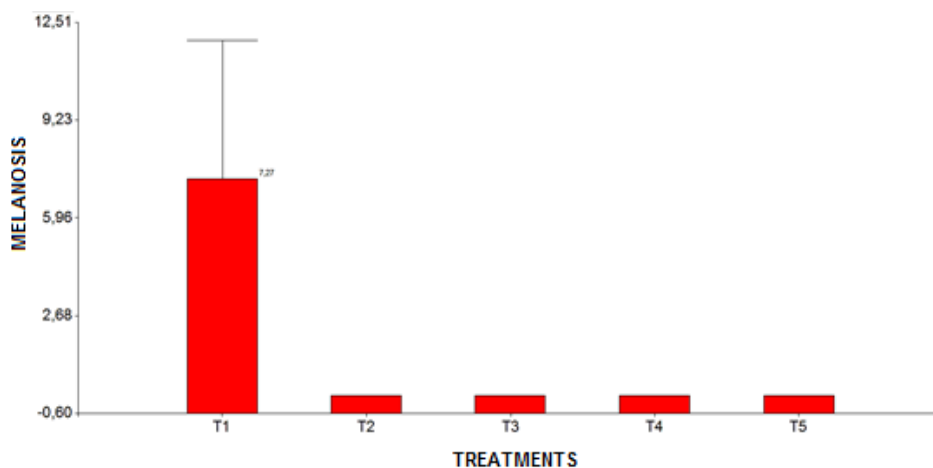


Figure 1. Mean values of melanosis results.

Figura 1. Valores medios de resultados de melanosis.

The results obtained for the residual values of the preservatives indicate that the sodium metabisulfite treatment at 4 % reached adequate values and according to European regulations of maximum allowed (Directive 95/2/EC). (Table 3), so it is the alternative that provides greater economic advantage, taking into account the lower consumption of sodium metabisulfite compared to treatment 5 of 6 % sodium metabisulfite.

The use of 4-hexylresorcinol is allowed in the United States, Canada, Australia and some Latin American countries (Martínez-Álvarez *et al.*, 2007). In the present investigation the residual level of the preservatives complied with the legal standard of residuality in the shrimp muscle, established by Directive 2006/52/EC of the European Parliament of July 5, 2006, where it establishes that the residual level of 4-hexylresorcinol should not exceed 2 mg/kg (European Union 2006), and is considered a generally safe additive (GRAS) because it does not leave side effects caused by sulfites, which indicates a highly viable and very convenient alternative to metabisulfite of sodium to inhibit melanosis.

In the present investigation in the analyzed shrimps there were no significant differences when applying the preservatives to different concentrations, in the organoleptic aspect of color, odor and flavor. Similar situation registered Loubes *et al.* (2009), where samples of prawns treated with 4-hexylresorcinol did not reveal changes in taste, tenderness and fibrosity in comparison to sodium metabisulfite and if a juicier mass when the applied treatment was 4-HR at 0.01 %. When no significant differences were observed in this study, both preservatives are the alternative to use in the prevention of melanosis in shrimp, without causing organoleptic changes in shellfish.

Los resultados obtenidos para los valores de residuales de los preservantes orientan que el tratamiento de metabisulfito de sodio al 4 % alcanzó valores adecuados y acorde a las regulaciones europeas de máximos permitidos (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 1995). (Tabla 3), por lo que es la alternativa que brinda mayor ventaja económica, tomando en consideración los menores consumos de metabisulfito de sodio en comparación con el tratamiento 5 de metabisulfito de sodio al 6 %.

El uso de 4-hexilresorcinol está permitido en los Estados Unidos, Canadá, Australia y algunos países latinoamericanos (Martínez-Álvarez *et al.*, 2007). En la presente investigación el nivel residual de los preservantes cumplió con el estándar legal de residualidad en el músculo del camarón, establecido por el Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea (1995), donde establece que el nivel residual de 4-hexilresorcinol no debe sobrepasar los 2 mg/kg y es considerado un aditivo generalmente seguro (GRAS) porque no deja efectos secundarios provocados por los sulfitos, lo que indica como una alternativa altamente viable y muy conveniente frente al metabisulfito de sodio para inhibir melanosis.

En la presente investigación en los camarones analizados no hubo diferencias significativas al aplicar los preservantes a diferentes concentraciones, en el aspecto organoléptico de color, olor y sabor. Similar situación registró Loubes *et al.* (2009), donde las muestras de langostinos tratadas con 4-hexilresorcinol no revelaron cambios en el sabor, terna y fibrosidad en comparación al metabisulfito de sodio y si una masa más jugosa cuando el tratamiento aplicado fue de 4-HR al 0.01 %. Al no observarse diferencias significativas en este estudio ambos preservantes son la alternativa de uso en prevención de la melanosis en camarones, sin ocasionar cambios organolépticos en el marisco.

Table 3.
Directive 95/2/EC of the European Parliament and the council. Maximum residual dose of sodium metabisulfite in the edible parts of fresh shrimp.

Tabla 3.
Directiva 95/2/EC del parlamento europeo y del consejo. Dosis máxima de residual de metabisulfito de sodio en las partes comestibles de camarones frescos.

Up to 80 units	150 mg/kg
Between 80 and 120 units	200 mg/kg
More than 120 units	300 mg/kg

In the analysis of mesophilic aerobes presented lower values in the treatment with 4 % sodium metabisulfite. Fecal coliform bacteria indicated absence in all treatments. These results were similar to Yokoyama (2007), who found that between the treatment with sodium metabisulfite and 4-hexylresorcinol there were no significant differences in the counting of mesophilic aerobic bacteria, while a smaller initial population was observed in the treatments with the antimelanosics, in comparison with the control, equal situation mentions it Montero, López-Caballero & Perez-Mateos (2001), where it indicates that the preservatives used in this essay have certain antimicrobial effect. In turn Yokoyama (2007) did not observe variation in the recovery of faecal coliforms throughout the development of his research, which cannot be compared with the present study due to the fact that no presence of this bacterium was registered.

Conclusions

The use of 4-hexylresorcinol, an additive considered GRAS, was as effective as sodium metabisulfite in preserving shrimp from melanosis during this study. The treatments carried out with 4-hexylresorcinol showed average values of residuals according to European regulations, with the advantage that there are no side effects caused by sulfites, indicating as a highly viable and convenient alternative, considering at the same time that consumers would appreciate a product free of allergenic additives.

It is recommended that the export sector of the shrimp processing industry look for the alternative of use for 4-hexylresorcinol, with a comfortable price that can be accessible to exporters since they are expensive and limit their use in these companies.

Referencias

- Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A. & Burkhardt, W. (2002). Enumeración de *Escherichia coli* y las bacterias coliformes. En: Manual analítico bacteriológico en línea, 8ª ed. Centro de Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada, Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>
- Díaz Rengifo, P. M (2011). Utilización de metabisulfito de sodio como preservante en las camaroneras. Tesis de grado. Guayaquil, Ecuador: Universidad Agraria del Ecuador. <https://es.scribd.com/document/239821252/Utilizacion-del-Metabisulfito-de-Sodio-como-preservante-en-las-camaroneras-docx>
- Guandalini, E., Draisci, R. and Macri, A. (1998). Efficacy of 4-hexylresorcinol on oxidative processes of Mediterranean sea

En el análisis de aerobios mesófilos presentaron valores más bajos en el tratamiento con metabisulfito de sodio al 4 %. Las bacterias coliformes fecales indicaron ausencia en todos los tratamientos. Estos resultados fueron similares a Yokoyama (2007), quien encontró que entre el tratamiento con metabisulfito de sodio y 4-hexilresorcinol no hubo diferencias significativas en el conteo de bacterias aerobias mesófilas, mientras que sí se notó una población inicial más pequeña en los tratamientos con los antimelanosicos, en comparación con el control, igual situación lo mencionan Montero, López-Caballero & Perez-Mateos (2001), donde indican que los conservantes utilizados en este ensayo tienen cierto efecto antimicrobiano. A su vez Yokoyama (2007) no observó variación en la recuperación de coliformes fecales en todo el desarrollo de su investigación, lo cual no puede ser comparado con el presente estudio debido a que no registro presencia de esta bacteria.

Conclusiones

El uso de 4-hexilresorcinol, aditivo considerado GRAS, resultó tan eficaz como el metabisulfito de sodio para preservar a los camarones de la melanosis durante este estudio. Los tratamientos realizados con 4-hexilresorcinol arrojaron valores promedios de residuales conforme a la reglamentación europea, teniendo la ventaja de que no existen los efectos secundarios provocados por los sulfitos, indicándose como una alternativa altamente viable y conveniente, considerando a la vez que los consumidores apreciarían un producto libre de aditivos alergénicos.

Se recomienda que el sector exportador de la industria procesadora de camarón busque como alternativa el uso del 4-hexilresorcinol, con un cómodo precio que pueda ser accesible a los exportadores, ya que al ser caros limitan su uso en las empresas.

- shrimp (*Parapaeneus longirostris*). An alternative to sulphites?. *Industrie Alimentari*, 37, 1158-1161. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT2000060586>
- Hidalgo, J. (2011). Tratado de Enología. Tomo 1. 2ª edición. Editorial Mundi-prensa.
- Horwitz, William ed (2000). Official methods of analysis of AOAC International. 17th ed. Gaithersburgh: AOAC, 2000. 2 v. ISBN 9780935584677.
- Ibarra-Menéndez, A. R. & Ibarra-Menéndez, A. R. (2012). Recuperación del metabisulfito sódico en las cosechas del camarón y su efecto nocivo al agua en el medio ambiente costero. *Desarrollo Local Sostenible*, 5(14). <http://www.eumed.net/rev/delos/14/imim.pdf>
- Loubes, M., Vidales, S. and Almada, C. (2009). Evaluación sensorial de crustáceos tratados con inhibidores de la melanosis. *La Industria Cárnica Latinoamericana*, 162, 38-43. https://www.researchgate.net/publication/318430074_Evaluacion_sensorial_de_crustaceos_tratados_con_inhibidores_de_la_melanosis
- Luzuriaga, D. A., Balaban, M. O. and Yeralan, S. (1997). Analysis of visual quality attributes of white shrimp by machine vision. *Journal of Food Science*, 62(1), 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04379.x>
- Llerena, C. (2011). Evaluación del proceso de Absorción del sulfito de sodio en el músculo del camarón (*L. vannamei*) para el control de la melanosis. Tesis de maestría. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil, Ecuador. 91 p. <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/30220>
- Marshall, M. R., Kim, J. and Wei, C. (2000). Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. *Food And Agricultural Organization*, 41, 259-312.
- Martínez-Álvarez, O., López-Caballero, M. E., Montero, P. and Gómez-Guillen, M. C. (2007). Spraying of 4-hexylresorcinol based formulations to prevent enzymatic browning in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*) during chilled storage. *Food Chemistry*, 100(1), 147-155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.031>
- Martínez, G. (2017). Evaluación de la inhibición de la melanosis en camarón de cultivo (*Litopenaeus vannamei*) mediante el uso de mezclas antioxidantes de cebolla (*Allium cepa*), piña (*Ananas comosus*) y ácido ascórbico. Tesis Doctoral. Universidad de la Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos, Departamento Alimentos. La Habana, Cuba. 128 p. <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/5112>
- Maturin, L. J. & Peeler, J. T. (2001) Recuento de placas aeróbicas. En: Manual analítico bacteriológico en línea, 8ª ed. Centro de Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada, Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-aerobic-plate-count>
- McEvily, A.J., Iyengar, R. and Otwell, S. (1991). Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. *Food Technology*, 9: 80 - 86. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19920008209>
- Montero, P., López-Caballero, M. E. y Perez-Mateos, M. (2001). The Effect of Inhibitors and High Pressure Treatment to Prevent Melanosis and Microbial Growth on Chilled Prawns (*Penaeus japonicus*). *Journal of Food Science*, 66(8), 1201 – 1206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb16105.x>
- Nakazato, M., Matsumoto, H., Kasuya, Y. and Yasuda, K. (2005). Determination of 4-hexylresorcinol residues in prawns and crabs. *Food Hygiene and Safety Science*, 46(6), 282-285. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.46.282>
- Ogawa, M., Perdigao, N. B., Santiago, M. E. and Kozima, T. T. (1984). On physiological aspects of black spot appearance in shrimp. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fisheries* 50, 1763-1769. https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan1932/50/10/50_10_1763/_article
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (1995). Aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. <https://publications.europa.eu/es/publication-detail/-/publication/c7960148-b1b0-406a-b502-5d0f8e1dc4e8/language-es>
- SLA. (Acuerdo de Nivel de Servicio) (2011). El uso del metabisulfito de sodio. *Revista Tilapias y Camarones.*, 13: 41.
- Yokoyama, V. A. (2007). Qualidade do camarão da espécie *Xyphopenaeus Kroyeri* mediante a acao dos agentes antimelanoticos. Tesis de Maestria. Universidad de São Paulo, Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, Sao Paulo. 124 p. <https://doi.org/10.11606/D.11.2008.tde-28022008-154048>