



Programa de Estudios de Posgrado

**Cambios post-mortem en el músculo de camarón
patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) y el efecto de procesos
post-cosecha en su textura**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Lourdes Mariana Díaz Tenorio

La Paz, B.C.S. Diciembre del 2006

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Fernando Luis García Carreño	Director de Tesis
Dr. Julio Humberto Córdova Murueta	Co-tutor
Dr. Manuel Díaz López	Co-tutor
Dra. Josafat Marina Ezquerria Brauer	Co-tutora
Dr. Ramón Pacheco Aguilar	Co-tutor

COMITÉ DE REVISIÓN

Dr. Fernando Luis García Carreño	CIBNOR, S.C.
Dr. Julio Humberto Córdova Murueta	CIBNOR, S.C.
Dr. Manuel Díaz López	Universidad de Almería
Dra. Josafat Marina Ezquerria Brauer	Universidad de Sonora
Dr. Ramón Pacheco Aguilar	CIAD, A.C.

JURADO EN EXAMEN DE GRADO

Dr. Fernando Luis García Carreño
Dr. Julio Humberto Córdova Murueta
Dr. Manuel Díaz López
Dra. Josafat Marina Ezquerria Brauer
Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Dr. Alfonso N. Maeda Martínez (Suplente)

RESUMEN

Las tendencias en el mercado de los alimentos exponen que el humano ya no sólo consume alimentos por la necesidad de nutrirse, ahora el componente hedónico juega un rol muy importante. El consumidor hoy en día se preocupa (y paga) por obtener un producto con características sensoriales deseables, que sea sano, inocuo y auténtico. Las reacciones post mortem de un organismo dependen en gran medida de su biología, por esta razón cada especie de interés comercial debe ser estudiada individualmente. Lo anterior con el fin de establecer cuales son las condiciones óptimas de mantenimiento, de cosecha (o captura) y de conservación post cosecha, que permiten alcanzar todas y cada una de las características deseadas por el consumidor. Más importante aún, el conocimiento completo de la especie permite establecer cuales son los parámetros adecuados a medir, y los límites máximos de aceptación, que permitan el aseguramiento del concepto de calidad total. El presente trabajo tiene por objetivos: describir y evaluar los cambios post mortem y el cambio de textura en el músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) bajo condiciones óptimas de refrigeración (0°C); así como evaluar los cambios textura en músculo de camarón patiblanco tratado con distintos métodos de congelación y descongelación. El camarón estudiado presenta el fenómeno de rigor mortis, el cual inicia y termina 5 y 30 h post mortem, no se evidenció una resolución del rigor por lo que se confirma que la actividad proteolítica muscular es despreciable. Se estableció que el almacenamiento en hielo, promueve la lixiviación de moléculas de bajo peso

molecular, esto sugiere una pérdida en el sabor característico del producto. Se determinó que el valor de K_i es el adecuado para cuantificar la frescura del producto, como índices de deterioro se proponen el uso de la concentración de TMA-N o la proporción de hipoxantina. La carne del camarón cultivado y cosechado comercialmente es comestible hasta los 18.5 días si es almacenado en hielo. De acuerdo con las características visuales, de olor y textura, la mejor calidad de la carne se mantiene hasta los 2.5 días, después de este tiempo se desarrollan notables cambios, principalmente en la apariencia y la textura. Los análisis de textura o microscópicos podrían ser usados para evaluar firmeza tanto en carne cruda como en cocida. Con estos resultados los productores y distribuidores podrán estar en un balance económico para definir sus tiempos “óptimos” de almacenaje. La mayoría de las variables evaluadas en camarones congelados y descongelados no mostraron diferencias significativas. Con base a los resultados se aconseja para propósitos comerciales la congelación por convección y no la criogénica. Para propósitos de investigación en estructura celular y tejidos se recomienda la congelación criogénica. Se recomienda la descongelación lenta para propósitos al menudeo.

Palabras Clave: *Litopenaeus vannamei*, post mortem, textura

ABSTRACT

Trends in food marketing indicate that the finer points of eating, display, status, exotic products, and even higher costs now play an important role in the processing and marketing of food. Today, consumers demand and pay for healthy, safe, and authentic food. Post-mortem chemical reactions of seafood strongly depend on the biology of the organism, and for this reason, each commercial species must be studied individually. Knowledge about seafood post mortem biochemistry is useful for establishing the best parameters for measuring freshness and spoilage in seafood and defining the best conditions of management to meet consumer satisfaction and safety policies. This study describes and evaluates post-mortem changes in muscle characteristics of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during storage at 0°C and evaluates changes in muscle texture after different freeze-thaw treatments. Whiteleg shrimp present rigor mortis phenomenon that begin at 5 hours after death and is completed at 30 hours after death. The resolution of rigor mortis was not observed, confirming low proteolytic activity in shrimp muscle. Lixiviation of low-molecular compounds was observed, suggesting a lost in sensorial quality. To farmed whiteleg shrimp, *Ki* is recommended for measuring freshness. The concentration of trimethylamine and the proportion of hypoxanthine could be useful as indices of spoilage. Shelf life of commercial farmed shrimp meat at 0°C was 18.5 days. Based on criteria of appearance, odor, and texture, the best quality of shrimp meat remained for 2.5 days of storage at 0°C. After this time, significant changes in appearance and

texture were observed. Texture and microscopic analyses could be used to evaluate firmness of raw and boiled shrimp meat. No significant changes were observed in thawed shrimp muscle. Results suggest that cryogenic freezing is suitable for research purposes and forced convection freezing for commercial uses. In both cases, the research suggests that shrimp muscle should be thawed at 0°C.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, post mortem, texture

DEDICATORIA

A mi cómplice: Luis

A mi conciencia: Ana Laura

A mi vacío: Cruz

A mi verdadero padre: Isaías


A mi hermanita: Ana Celia






AGRADECIMIENTOS






Un@ Doctor@ en Ciencias, no nace, se hace. Para “hacer” un@ se necesitan muchas mentes preparadas, manos hábiles, mucha paciencia, gran disponibilidad, pero sobretodo una gran dosis de **perseverancia**.


El presente documento es el epílogo de una aventura llamada Doctorado. Es curioso ver que al final de este periodo, mi memoria de estos cuatro años es como una canasta llena de diferentes sabores. Encuentro dulces, amargos, salados y ácidos; cada uno con diferente duración e impacto en mi vida. Pero lo mejor es que no los probé sola, pues SIEMPRE había alguien a mi lado para compartirlo, ya sea para disfrutarlo o para ayudarme a sobrellevarlo. Todos ellos permanecerán en mi memoria y por siempre les estaré agradecida, sólo por “estar ahí” ayudándome.


La lista es larga, así que tengan paciencia, los invito a leer estos agradecimientos.


 Al **pueblo de México**, porque a través del CONACyT (beca no. 158425 y proyecto SEP-2004-C01-46000) financió la presente investigación. Sin la ayuda económica, difícilmente habría logrado mi objetivo. El dinero no lo es todo, pero... ¡cómo ayuda!


-  **A Mollete** (Luis Leyva), gracias por apoyarme en TODO, sé que soy afortunada por tenerte a mi lado. Me has acompañado y apoyado en todas mis aventuras, ésta en especial hubiese sido muy pesada sin tu amor, comprensión, PACIENCIA y sobretodo apoyo. Hoy puedo decir: ¡¡¡lo logramos!!! ¿Listo para la siguiente aventura?
-  A mi **mamá** (Ana Laura), te agradezco tu comprensión, ayuda y confianza, pero sobretodo, gracias por darme bases firmes para ser una mujer fuerte y no rendirme ante los problemas.
-  A mi **papá** (Isaías), ¿qué decirte? Gracias por escogerme, por elegir ser mi padre y mi guía.
-  A **P-Chan** (Ana Celia), gracias por enseñarme a compartir el amor de mis padres y por tus muestras de admiración.
-  A **Fer** (*my father-in-science*), ¿cómo no agradecerte por estos casi 7 años de enseñanza? Estarás de acuerdo que no fue fácil, pero al final creo que supimos entendernos y trabajar en conjunto, espero hayas quedado satisfecho con mi trabajo. Algún día me dijiste que tenía potencial para ser una buena investigadora, espero no fallarte.


-  A **Ann** (*my mother-in-science*), tú me recibiste cuando era una mocosita de licenciatura, la cuál con amor y mucha paciencia aprendió a crecer en este sinuoso camino de la ciencia. Hoy a punto de recibir el grado de Doctor, espero te sientas orgullosa de mí.
-  A **Pato**, mi hermana mayor. A pesar de no tener varita mágica, fuiste como el hada madrina de la historia. He contado con tu apoyo incondicional, hiciste esta carrera menos pesada. ¡Ah! Y también gracias por enseñarme a preocuparme por lo que pase en nuestro país.
-  A **Julio**, por tu amistad incondicional, compañerismo y disponibilidad. Mil gracias por auxiliarme en mi preparación profesional, sé que a veces no fue fácil enseñarme, pero aprendí mucho.
-  A **Crisalejandra, Cristy, Hugo, Keni y MG**. Fueron como mis hermanitos pequeños. Gracias por permitir que me entrometiera en su vida personal y formación profesional. Espero haber sido útil.
-  A mis amigas de CIAD: **Ma. Elena, Guille, Gisa, Liber, Becky, Kari**. Cada una a su manera, en algún momento, me facilitaron la estancia en el CIAD. Pero sobretodo gracias porque me hicieron parte de su vida y algunas de su familia.


-  A la **familia Contreras Ramírez**. Pepe, Ely, David y Niña: mil gracias por darme techo, alimento, cariño, comprensión y palabras de aliento a lo largo de mis estancias en Hermosillo.


-  A la familia **Sánchez Muhlia**: Adrianis, Pepo, Pinky y Coty. Gracias por ser mi ejemplo de familia moderna y mostrarme que en ésta profesión se puede ser padre e investigador, sin morir en el intento.


-  A mis amigas de Hermosillo: **Aralé, Anatún, y Alocarmen**. Esas largas charlas en el café me ayudaron a recordar que no todo en la vida es ciencia.


-  A **Manolo, Concha, Celia y Marina**. Por ayudarme a que la transición de estudiante a Doctora no me caiga de golpe.


-  Al comité de tesis (**Dres. Fernando García, Manuel Díaz, Marina Ezquerra, Ramón Pacheco y Julio Córdova**) por la gran disponibilidad, pero sobretodo por las facilidades, recomendaciones y asesorías brindadas.


-  To **Ira Fogel (Paco)**, because you always corrected the manuscripts accurately in record time. Thank you!


-  A **Liliana Rojo** e **Irma Castañón** por la ayuda prestada en el procesamiento de muestras.


-  A **Carmen y Lilia**, por que mágicamente con su apoyo me resolvían toda y cada una de mis crisis técnicas.

-  Agradezco los servicios y asesoría brindados por los siguientes técnicos del CIBNOR: **Ma. de los Ángeles Navarrete del Toro, Ma. del Carmen Rodríguez Jaramillo, Luz Estela González González, Ma. Eulalia Meza Chávez, Roberto Hernández Herrera, Lilia Isabel Ibarra Martínez, Jorge Angulo Calvillo, Mayra Vargas Mendieta, Jesús Antonio Aguilar Villavicencio y José Elmo Pérez.**

-  El trabajo del siguiente personal contribuyó a que mi estancia en el CIBNOR (más de 7 años) fuera agradable, además que también pusieron su granito de arena para que el presente trabajo llegara a feliz término. Biblioteca (**Ana Ma., Tony, Meche, Susy, Esther, Chabelita, Edgar**), caseta de vigilancia, compras, soporte técnico, redes, taller, mantenimiento y limpieza.

-  Mención especial al personal de la Dirección de Postgrado: **Dra. Thelma Castellanos, Osvelia, Lety, Lupita, Claudia, Betty, Horacio y Manuel.**
¡¡¡Gracias por la eficiencia, disponibilidad y sobretodo por la comprensión!!!

 Gracias a la Dirección de Tecnología en Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, especialmente a **Ramón Pacheco, Ma. Elena Lugo, Gisela Carvallo, Guillermina García, Libertad Zamorano, Rebeca Ezquerro Brauer**, por auxiliarme en el manejo de muestras, capacitarme en algunas de las técnicas empleadas en esta tesis, y sobretodo por la interpretación de los resultados.

 A las empresas “**Acuícola del Desierto, S.A. de C.V.**” y “**Acualarvas, S.A. de C.V.**” por facilitarnos el acceso a las granjas camaronícolas, sobretodo por donar desinteresadamente parte de las muestras empleadas en esta tesis.

Gracias a todos los que de alguna u otra manera, en menor o mayor medida me ayudaron obtener lo que a continuación se presenta. **Si omití a alguna institución, laboratorio, empresa o persona, de antemano pido disculpas.**

Lourdes Mariana Díaz Tenorio

☺ **Marianiux** ☺

CONTENIDO

COMITÉ TUTORIAL	I
RESUMEN	III
ABSTRACT	V
DEDICATORIA	VII
AGRADECIMIENTOS.....	VIII
CONTENIDO	XIV
LISTA DE FIGURAS.....	XXI
LISTA DE TABLAS	XXVI
LISTA DE ECUACIONES.....	XXVII
PREFACIO	XXX
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 PRODUCCIÓN, COMERCIALIZACIÓN Y CONSUMO DE PRODUCTOS	
PESQUEROS.....	1
1.2 ALGUNOS ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL CAMARÓN	4
1.3 PRODUCCIÓN, COMERCIALIZACIÓN DEL CAMARÓN.....	4
1.4 PLANTEAMIENTO DE LA TESIS	6
II. OBJETIVOS GENERALES	7
III. CAPÍTULO 1.....	8

3.1 INTRODUCCIÓN	9
3.1.1 CALIDAD EN PRODUCTOS MARINOS	9
3.1.1.1 Conceptos	9
3.1.1.2 Calidad de un alimento	10
3.1.2 DETERIORO POR ENZIMAS HIDROLÍTICAS	11
3.1.2.1 Enzimas lipolíticas	12
3.1.2.2 Enzimas proteolíticas.....	13
3.1.3 ESTUDIO DE LA BIOQUÍMICA POST MORTEM EN ORGANISMOS MARINOS.	14
3.1.3.1. Frescura y deterioro	16
3.1.3.2 Índices químicos para evaluar frescura	18
3.1.3.3 Índices químicos para evaluar frescura y deterioro	21
3.2 HIPÓTESIS	23
3.3 OBJETIVOS	24
3.3.1 OBJETIVO GENERAL	24
3.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	24
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS ORGANISMOS	25
3.4.2 EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS POST MORTEM TEMPRANOS ...	25
3.4.2.1 Evaluación macroscópica del rigor mortis	25
3.4.2.2 Evaluación microscópica del rigor mortis	26
3.4.2.3 Evaluación química y bioquímica del rigor mortis	27
3.4.2.3.1 Cuantificación de glucógeno, glucosa y ácido láctico	27

3.4.2.3.2 Cuantificación de la concentración de ATP y los productos de su degradación enzimática	29
3.4.2.3.3 Determinación de pH muscular	31
3.4.2.3.4 Cuantificación de la concentración de aminoácidos libres en músculo	31
3.4.3 EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS POST MORTEM TARDÍOS	32
3.4.3.1 Evaluación de índices de frescura y deterioro	32
3.4.3.1.1 Estimación de los índices de frescura	32
3.4.3.1.2 Estimación de los índices de deterioro.....	32
3.4.3.1.3 Cuantificación de Bases Volátiles Totales (BVT-N)	33
3.4.3.1.4 Cuantificación de Trimetilamina (TMA-N)	33
3.4.3.2 Evaluación microscópica de los cambios estructurales en el músculo de camarón.....	34
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIONES	35
3.5.1 CAMBIOS POSTMORTEM TEMPRANOS.....	35
3.5.1.1 Cambios postmortem tempranos en carbohidratos	35
3.5.1.2 Cambios postmortem tempranos en ATP y derivados	36
3.5.1.3 Cambios postmortem tempranos en la estructura del camarón patiblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	39
3.5.2 CAMBIOS POST MORTEM TARDÍOS EN EL MÚSCULO DE CAMARÓN PATIBLANCO (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	42
3.5.2.1 Pérdida de aminoácidos, nucleótidos, nucleósidos y bases nitrogenadas	42

3.5.2.2 Variación del ATP y los derivados de su degradación enzimática	44
3.5.2.3 Índices de frescura	44
3.5.2.4 Índices de deterioro	47
3.6 CONCLUSIONES	51
IV. CAPÍTULO 2	53
4.1 INTRODUCCIÓN	54
4.1.1 MÚSCULO DE ORGANISMOS MARINOS	54
4.1.2 CAMBIOS POST MORTEM QUE AFECTAN A LA ESTRUCTURA MUSCULAR	55
4.1.3 CONCEPTOS DE TEXTURA	57
4.1.4 PROCESOS TÉRMICOS	59
4.2 HIPÓTESIS	61
4.3 OBJETIVOS	62
4.3.1 OBJETIVO GENERAL	62
4.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	62
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS	63
4.4.1 CARACTERÍSTICAS Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	63
4.4.2 ANÁLISIS DE TEXTURA	64
4.4.3 HISTOLOGÍA Y ANÁLISIS DE IMÁGENES	65
4.4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	66
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67

4.5 1 PESO Y RENDIMIENTO DE LA COCCIÓN	67
4.5.2 ANÁLISIS DE TEXTURA EN LA CARNE DE LOS CAMARONES CRUDOS	67
4.5.3 ANÁLISIS DE LA TEXTURA EN LA CARNE DE LOS CAMARONES COCIDOS	71
4.5.4 ANÁLISIS MICROSCÓPICOS	72
4.5.5 MELANOSIS.....	76
4.6 CONCLUSIONES	77
V. CAPÍTULO 3	78
5.1 INTRODUCCIÓN	79
5.1.1 CONGELACIÓN	79
5.1.2 ETAPAS DE LA CONGELACIÓN	80
5.1.2.1 Desplazamiento de calor	80
5.1.2.2 Cambios de fase	81
5.1.2.3 Nucleación	81
5.1.2.4 Propagación.....	82
5.1.2.5 Velocidad de congelación	82
5.1.2.6 Migración de la humedad y recristalización.....	83
5.1.3 DESCONGELADO	84
5.2 HIPÓTESIS.....	86
5.3 OBJETIVOS	87
5.3.1 OBJETIVO GENERAL	87

5.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	87
5.4 MATERIALES Y MÉTODOS	88
5.4.1 CARACTERÍSTICAS Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	88
5.4.2 ANÁLISIS DE TEXTURA Y CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA	89
5.4.3 FRACCIONAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS DEL MÚSCULO	89
5.4.4 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL MÚSCULO DE CAMARÓN	90
5.4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	91
5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
5.5.1 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS EN LA TEXTURA Y CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA	92
5.5.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO	94
5.5.3 ANÁLISIS DE PROTEÍNA.....	95
5.5.4 MELANOSIS.....	99
5.6 CONCLUSIONES.....	101
6. LITERATURA CITADA.....	102
7. ANEXOS	120
ANEXO I.....	121
ANEXO II.....	122
ANEXO III.....	123

ANEXO IV.....	124
ANEXO V.....	125
ANEXO VI.....	126

LISTA DE FIGURAS

1	Camarón patiblanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	3
2	Organización jerárquica del concepto de calidad. (Adaptado de Bremner, 2002)	10
3	Productos de la degradación enzimática del ATP	19
4	Ángulo imaginario medido para evaluar el grado de encorvamiento en el abdomen del camarón patiblanco durante el fenómeno de rigor mortis a 0°C	26
5	Aparato de destilación empleado para cuantificar BVT-N.....	34
6	Efecto del almacenamiento a 0°C en el pH, concentración de glucógeno, glucosa y lactato en el músculo de camarón patiblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	37
7	Cambios post mortem tempranos en la concentración del ATP y los derivados de su degradación enzimática en el músculo de camarón patiblanco almacenado a 0°C	38
8	Cambio en la concentración de moléculas responsables de la variación de pH en el músculo del camarón patiblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) almacenado a 0°C	39
9	Desarrollo del encorvamiento post mortem en el abdomen del camarón patiblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) almacenado a 0°C	40
10	Cambios post mortem tempranos en la estructura macro y microscópicas del músculo del camarón patiblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	

almacenado en hielo (0°C)	41
11 Cromatograma resultante del agua de deshielo después de almacenar camarón a 0°C durante 5 d. La línea sólida corresponde a la muestra. La línea punteada representa la inyección de estándares	42
12 Cambios post mortem tardíos en la concentración del ATP y los derivados de su degradación enzimática en el músculo de camarón patiblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) almacenado a 0°C	45
13 Variaciones presentadas en los índices de frescura durante el almacenamiento a 0°C del camarón pariblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) .	48
14 Variaciones presentadas en los índices de deterioro durante el almacenamiento a 0°C del camarón pariblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>) .	50
15 Estructura jerárquica de un haz muscular	55
16 Estado muscular relajado (inmediatamente después de la muerte) y estado muscular contraído (<i>rigor mortis</i>)	56
17 Texturómetro universal (Instron, Inc.)	64
18 Efecto del tiempo de almacenamiento a 0°C en el rendimiento del camarón crudo y cocido	68

- 19** Efecto del tiempo de almacenamiento a 0°C en la textura cruda de camarón patiblanco almacenado a 0°C. Esfuerzo al corte (▼), Fracturabilidad (●), Dureza (◆), %CRA (○). Las barras representan error estándar, las letras representan diferencias significativas entre muestreos **69**
- 20** Efecto del tiempo de almacenamiento a 0°C en la textura cocida de camarón patiblanco almacenado a 0°C. Esfuerzo al corte (▼), Fracturabilidad (●), Dureza (◆), %CRA (○). Las barras representan error estándar, las letras representan diferencias significativas entre muestreos **72**
- 21** Vista transversal (A, C) y longitudinal (B, D) del músculo crudo (A, B) y cocido (C, D) de camarón patiblanco. **73**
- 22** Corte transversal del abdomen del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*). Los números muestran las cuatro secciones observadas. La escala representa 1 mm **74**
- 23** Fotografías representativas del análisis de imágenes del músculo cocido y crudo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) durante el almacenamiento a 0°C. a, c y e muestran al músculo crudo a los días 0.5, 7.5 y 18.5 respectivamente. b, d y f muestran al músculo cocido a los días 0.5, 7.5 y 18.5 respectivamente. La escala representa 200 µm **75**

- 24** Vistas transversales del músculo de camarón tratado bajo condiciones de congelado y descongelado antes mencionadas. Tratamientos: (a) Criogénico-Adecuado, (b) criogénico-inadecuado, (c) convección-adeuada, (d) f convección-inadecuada y (e) controles. BA = areas blancas, CTA = area de tejido conjuntivo, MTA = area de tejido muscular. La escala representa 50 μm **96**
- 25** Efecto de la congelación y descongelación en la fracción de proteínas sarcoplásmicas en músculo de camarón patiblanco. *a, b, c, d, y e* son las regiones para analizar las bandas de proteína. LM = marcador de peso molecular bajo, HM = marcador de peso molecular alto, NT = control, F = congelado por convección, C = congelado criogénico, A = descongelado adecuado, I = descongelado inadecuado **97**
- 26** Efecto de la congelación y descongelación en la fracción de proteínas miofibrilares en músculo de camarón patiblanco. LM = marcador de peso molecular bajo, HM = marcador de peso molecular alto, NT = control, F = congelado por convección, C = congelado criogénico, A = descongelado adecuado, I = descongelado inadecuado **97**
- 27** Efecto de la congelación y descongelación en la fracción de proteínas soluble en álcali en músculo de camarón patiblanco. HC = cadena pesada de miosina, Pm = paramiosina, Ac = actina, Ty =

	tropomiosina,y LC =cadena ligera de miosina. LM = marcador de peso molecular bajo, HM = marcador de peso molecular alto, NT = control, F = congelado por convección, C = congelado criogénico, A = descongelado adecuado, I = descongelado inadecuado	99
28	Melanosis en camarón despues de un tratamiento de congelación.descongelación	100

LISTA DE TABLAS

I Factores que afectan las propiedades finales de los productos marinos.....	15
II Coeficiente de correlación (r) entre las variables de textura y microscópicas entre las variables medidas en el músculo de camarón crudo y cocido.....	70
III Efecto de las combinaciones de congelación y descongelación en el esfuerzo al corte, dureza, fracturabilidad y CRA en el músculo de camarón patiblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	93
IV Efecto de las combinaciones de tratamientos (congelación y descongelación) en la estructura microscópica del músculo de camarón patiblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	95

LISTA DE ECUACIONES

1	Índice K (%K)	19
2	Valor K_i (K_i)	20
3	Carga energética adenilada (CEA)	20
4	Cálculo de bases volátiles totales (BVT-N)	33
5	Ecuación que describe la relación del tiempo de almacenamiento a 0°C y el % K_i , del músculo de camarón patiblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	47
6	Ecuación que describe la relación del tiempo de almacenamiento a 0°C y la proporción de hipoxantina en el músculo de camarón patiblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	49
7	Porcentaje de la Capacidad de Retención de Agua (%CRA)	65

ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
AOCS	American Oil Chemists' Society
ATP	Adenosina trifosfato
BVT	Bases Volátiles Totales
CEA	Carga Energética Adenilada
CODEX	CODEX Alimentarius
c/u	Cada uno
d	Día(s)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	Gramo(s)
g	Gravedad(es)
h	Hora(s)
Hx	Hipoxantina
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
IMP	Inosina monofosfato
Ino	Inosina
ISO	Internacional Organization for Standardization
kDa	Kilodaltones

kg	Kilogramo(s)
L	Litro(s)
µg	Microgramo
µmol	Micromol(es)
µL	Microlitro(s)
mg	miligramo(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
nm	Nanometro(s)
nmol	Nanomol(es)
ppm	mg/L
s	Segundo(s)
TMA	Trimetilamina
TCA	Ácido tricloroacético
WHO	World Health Organization

PREFACIO

La presente tesis integra los siguientes artículos:

Díaz-Tenorio, L.M., García-Carreño, F.L. and Pacheco-Aguilar, R. 2006. Comparison of freezing and thawing treatments on muscle properties of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Biochemistry*. En prensa.

Díaz-Tenorio, L.M., García-Carreño, F.L. and Pacheco-Aguilar, R. 2006. Changes in texture quality of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during storage in ice. *Food Science and Technology International*. Sometido.

Díaz-Tenorio, L.M., García-Carreño, F.L., and Pacheco-Aguilar, R. Post-mortem changes on ice-stored whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Biochemical, physical, and histological changes on abdomen. En preparación para someter a *Journal of Agriculture and Food Chemistry*.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 PRODUCCIÓN, COMERCIALIZACIÓN Y CONSUMO DE PRODUCTOS PESQUEROS

La superficie del planeta está cubierta por agua (aproximadamente 80%), la mayor parte de este recurso se encuentra confinado en mares y océanos. Dentro de ellos se encuentran un sinnúmero de nichos ecológicos, donde numerosas especies son albergadas. El hombre en la interminable búsqueda por satisfacer sus necesidades, ha seleccionado una parte de ellas para alimentarse.

Los recursos pesqueros son un importante componente en la alimentación del humano, por ello se han desarrollado a su alrededor una gran cantidad de industrias. La lista es enorme, ya que a partir de una especie pueden prepararse varios productos, generando así, un gran campo de posibilidades y oportunidades, sobretodo en materia de calidad e inocuidad alimentaria (Bremner, 2000).

El consumo de productos marinos a nivel mundial se ha incrementado considerablemente (Huss, 1995), aproximadamente 3.6% anual, el doble del crecimiento poblacional (WHO, 2006). En el 2001, el consumo mundial per capita promedio de pescados, crustáceos y moluscos fue de 16.1 kg/año, esto representa del 13.8 al 16.5% de la proteína total de origen animal consumida. Analizando por países, el consumo varía considerablemente; mientras que en Islandia, Japón, China y Corea del Sur el consumo es de 91.5, 66.1, 58.0 y 52.4 kg/año respectivamente, existen países de bajo consumo como lo son India, Haití

y Puerto Rico, los cuales consumen 4.8, 2.6 y 1.0 kg/año respectivamente. México por su parte, presenta un consumo per capita por debajo de la media mundial: 10.4 kg/año (NFMS, 2006; WHO, 2006).

Dos terceras partes de la producción mundial de productos pesqueros se capturan en el mar, lagos y lagunas naturales; el resto se produce por acuicultura. El incremento en el consumo de productos pesqueros se satisface principalmente por la acuicultura, ya sea de manera rural o comercial. Cabe mencionar que el 10% de lo producido se pierde debido al manejo deficiente (WHO, 2006).

La comercialización de un producto pesquero se hace a través de cadenas productivas; cada una involucra varias etapas, las cuales se inician con la captura o cosecha y finalizan cuando el producto llega a la mesa del consumidor (Frederiksen, 2002). Durante la cadena productiva el producto puede someterse a varias operaciones: lavado, eviscerado, descabezado, descamado, desconchado, fileteado, cocción, congelación, etc. Sin importar si estas operaciones son manuales o mecánicas, todas deben realizarse cuidando que el producto se mantenga a bajas temperaturas (0°C o cercanas) y en condiciones salubres, de tal manera que el consumidor reciba un producto inocuo, nutritivo y con las características hedónicas deseadas.

La longitud de la cadena dependerá del producto a comercializar y de la presentación final al consumidor (Bykowski, 1990; Ganowiak, 1990). Un manejo inadecuado, puede generar un producto no apto para el consumo, ya que se han formado compuestos químicos en el producto (organismo), capaces de causar problemas de salud. Aunado a esto, el producto puede ser rechazado o

depreciado sino cumple con las características esperadas por el consumidor (Taylor y Sumner, 1986).

La mayoría de los estudios de calidad, deterioro y efectos de procesos post cosecha se han realizado en peces de interés comercial. Los resultados han ayudado a conocer los fenómenos post mortem y/o post cosecha, generando así normas, leyes o procedimientos (nacionales e internacionales) específicos para el manejo de cada especie. Debido a la gran diferencia en la composición bioquímica de los productos pesqueros, no pueden extrapolarse los resultados de estudios de un organismo a otro, ni siquiera entre organismos del mismo género.

Por las propiedades sensoriales (olor, sabor, textura) la carne de camarones, langostas y cangrejos es muy apreciada por cierto sector de la población. Generalmente, su precio en el mercado es superior al resto de los alimentos de origen animal (mamíferos, aves y peces) (PROFECO, 2006).



Figura 1. Camarón patiblanco *Litopenaeus vannamei*

1.2 ALGUNOS ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL CAMARÓN

Los camarones peneidos (Figura 1) se aparean en mar abierto, generalmente en profundidades de 10 a 35 brazas. Posterior al desove, los huevos eclosionan en nauplios y entre el estadio de misis y postlarva ingresan con las mareas a los estuarios y a las áreas costeras de menor salinidad. Una vez dentro de los estuarios, estas postlarvas se desarrollan corporalmente tanto en longitud como en peso y cuando alcanzan las tallas de 10 a 12 cm, ya transformados en camarones juveniles, migran en forma inversa desplazándose hacia las bocanas y áreas costeras de mar abierto, para continuar con su desarrollo corporal y reproductivo ya en su fase adulta, para luego aparearse nuevamente y cerrar el ciclo biológico. La duración aproximada del ciclo es de un año. Los camarones habitan medios con diferentes características ambientales, a lo largo de su desarrollo ontogénico las condiciones de salinidad y temperatura varían considerablemente. Por ejemplo, los especímenes adultos en altamar se encuentran en una salinidad de 15 a 25 ppm, en las fases larvarias y juveniles están dentro de los estuarios (25 a 34 ppm). El rango de temperaturas de crecimiento es de 28 a 34°C y concentraciones de oxígeno de 5 a 7 mg/L y pH de 7.5 a 8.5 (Briggs, 2004).

1.3 PRODUCCIÓN, COMERCIALIZACIÓN DEL CAMARÓN

La producción mundial de camarón está dominada principalmente por Asia y América Latina (Tailandia, Indonesia, Filipinas, Malasia, China, India, Taiwán,

Ecuador y México). El camarón tigre gigante (*Penaeus monodon*), el camarón carnoso (*Fenneropenaeus chinensis*) y el camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) son las tres especies más cultivadas en el mundo (Ling, *et al.*, 1996). Ésta última ha incrementado su producción, ya que presenta una buena tasa de crecimiento bajo diferentes condiciones de cultivo (Briggs *et al.*, 2004).

En México, la captura de estos decápodos representó durante el 2003 el 9.46% del volumen total capturado y el 41.63% del total obtenido por ventas de primera mano (aproximadamente 5,802 millones de pesos). Hablando sólo de camarón, se capturó el 7.92% de la producción pesquera nacional, generando así el 37.89% del total en ventas nacionales. Cabe mencionar que el 50.33% del volumen reportado proviene de la acuicultura, desarrollada principalmente en el Pacífico del país (SAGARPA, 2005).

En el Pacífico mexicano la captura de camarón silvestre se compone principalmente de 5 especies: camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*), camarón patiblanco (*L. vannamei*), camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*), camarón rojo o cristal (*F. brevirostris*), y el camarón blanco del Pacífico (*L. occidentalis*). Adicional a éstas, tenemos la presencia de la captura comercial de otras especies como: camarón de roca (*Sicyonia penicillata*, *S. ingentis* y *S. disdorsalis*); y otros de talla pequeña pero muy abundantes: camarón cebra (*Rimapenaeus pacificus*), rosadito (*Solenocera mutator*) y camarón siete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) (CONAPESCA, 2001). Respecto al cultivo de camarones, tenemos que la especie que predomina es *Litopenaeus vannamei* (SAGARPA, 2006).

1.4 PLANTEAMIENTO DE LA TESIS

De acuerdo con la información anterior, concluimos que la captura o cosecha del camarón patiblanco (*L. vannamei*) es una actividad de gran valor económico. Por ello es primordial contar con información confiable acerca del desarrollo de las modificaciones post mortem, así como del impacto en una de las propiedades sensoriales más importantes de la carne de camarón: la textura.

Tomando en cuenta que la biología de cada especie es distinta, y que lo poco reportado en decápodos es de organismos silvestres, este trabajo contribuirá significativamente al conocimiento de los fenómenos post mortem en invertebrados cultivados, específicamente en decápodos.

La tesis doctoral aquí presentada se divide en tres partes principales: en la primera, por medio de evaluaciones físicas, químicas e histológicas, se describen los **cambios post mortem** que ocurren en el músculo de camarón patiblanco (*L. vannamei*) durante su almacenamiento a 0°C. En la segunda parte se presentan los resultados de la evaluación del efecto de almacenamiento en hielo sobre la textura de la carne de camarón cruda y cocida. En este apartado se utilizaron evaluaciones instrumentales de textura y análisis histológicos. Finalmente, en el capítulo 3 se presenta el efecto de los diferentes tipos de congelado y descongelado en el músculo de camarón.

II. OBJETIVOS GENERALES

- ✿ Describir los cambios post mortem en el músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) bajo condiciones óptimas de refrigeración (0°C).

- ✿ Evaluar por medio de herramientas físicas y microscópicas el cambio en la textura de la carne cruda y cocida del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) cuando el camarón es almacenado bajo condiciones óptimas de refrigeración (0°C).

- ✿ Evaluar los cambios microscópicos y de textura en músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) tratado con diferentes métodos de congelación y descongelación.

III. CAPÍTULO 1

**“Bioquímica postmortem del músculo de camarón patiblanco
(*Litopenaeus vannamei*)”**

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 CALIDAD EN PRODUCTOS MARINOS

3.1.1.1 Conceptos

El término *calidad* es frecuentemente usado para hacer referencia de los buenos atributos del producto. Esta palabra es empleada tanto en la vida diaria como en la literatura científica, y no siempre es de la manera adecuada. Para algunas personas involucradas en las cadenas productivas pesqueras, la “calidad” es parte de la imagen de su producto y para ellos, la imagen lo es todo.

En el ámbito científico, es vital tener claros los conceptos de los fenómenos que se estudian. Una idea incorrecta o vagamente expresada, puede generar interpretaciones, inferencias y conclusiones mal fundamentadas, ocasionando que los reportes sean poco confiables. Por lo anterior, es muy recomendable entender que *calidad* es un concepto y no una entidad que puede ser medida como una fuerza, un peso, una distancia.

Tampoco es razonable el proponer que la calidad de un producto o servicio sea medido o expresado, sin antes delimitar que la calidad se define en términos de medidas o estimaciones (Bremner, 2002). Según ISO una *calidad* es una característica que un producto o servicio debe tener para satisfacer al cliente (Praxiom, 2004). Esta definición no se puede tomar y aplicar inmediatamente al producto o servicio de interés, ya que la calidad de un producto puede definirse en varias calidades, acompañadas de sus medidas, así como de los procesos o

procedimientos para lograrla. Un ejemplo de ello se observa en la Figura 2 (Bremner, 2002).

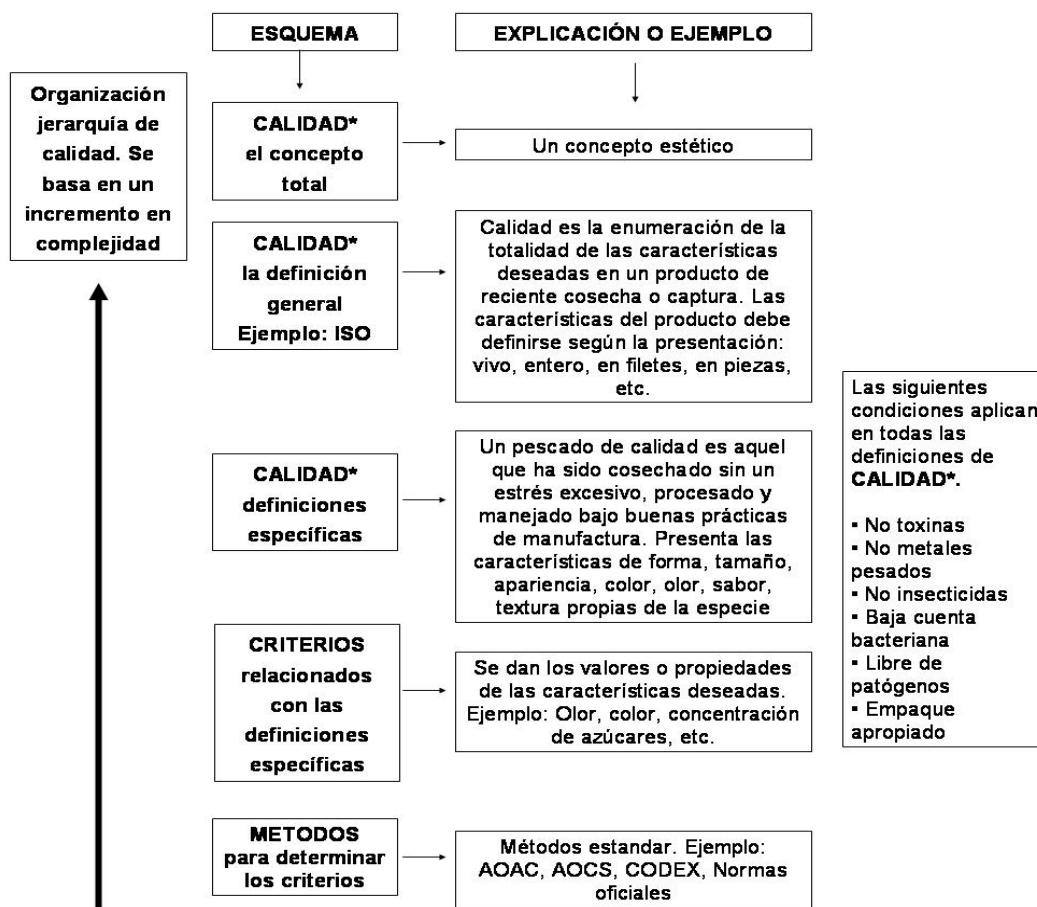


Figura 2. Organización jerárquica del concepto de calidad
(Adaptado de Bremner, 2002)

3.1.1.2 Calidad de un alimento

En la preferencia de los consumidores por un alimento están consideradas principalmente: la región geográfica, las ideas religiosas, la pertenencia a un grupo étnico, las características sensoriales y el costo. Sin embargo en años recientes,

los consumidores han incluido en sus preferencias que el alimento sea sano, inocuo y auténtico. Los atributos son específicos para cada alimento, sólo la generación o preservación de los mismos, dictarán el éxito comercial del producto.

Los atributos más comunes que definen la calidad de un alimento son principalmente cuatro:

a) **apariencia**: Está relacionada con la percepción visual del producto (color, tamaño, forma, brillo, etc.),

b) **aroma**: Se espera ausencia o presencia de olores y sabores característicos;

c) **textura**: Donde se incluyen las sensaciones al tacto (boca y mano). Suavidad, rigidez, masticabilidad, jugosidad son ejemplos de este atributo, y

d) **nutricional**: Se mide con base en los requerimientos del consumidor. Se mide la concentración y tipo de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales (Singhal *et al.*, 1997a; Bourne, 2002).

3.1.2 DETERIORO POR ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Las hidrolasas son enzimas catabólicas que catalizan el rompimiento de enlaces mediante la adición de una molécula de agua. En materiales crudos estas enzimas permanecen activas durante el almacenamiento en congelación (Sista *et al.*, 1997).

3.1.2.1 Enzimas lipolíticas

Las dos principales categorías de enzimas lipolíticas son las lipasas y las fosfolipasas que hidrolizan los enlaces éster de los triacilgliceroles y fosfolípidos, respectivamente. Si estas reacciones no son controladas durante el almacenaje la hidrólisis de los lípidos puede generar cambios de textura, sabor indeseables y compuestos dañinos para la salud (Hedges *et al.*, 2002).

A pesar de la reducción que ocurre en respuesta a la disminución de la temperatura, el congelado puede acentuar la lipólisis por disrupción de la membrana liposomal que libera las enzimas hidrolíticas. La liberación de cantidades suficientes de ácidos grasos de cadena corta puede causar rancidez hidrolítica; además éstos pueden interactuar con proteínas para formar un complejo lípido-proteína insoluble que modifica la textura. Finalmente, la liberación de ácidos grasos libres a partir de la matriz de triacilgliceroles puede acelerar su interacción con catalizadores oxidativos y por lo tanto acelerar la oxidación de los lípidos que causan malos sabores. Contrario a lo que sucede con la liberación de ácidos grasos a partir de triacilgliceroles, la liberación a partir de fosfolípidos inhibe la oxidación lipídica. Lo anterior se debe a que los ácidos grasos disminuyen la interacción entre la parte oxidada y la parte oxidable de la matriz membranal y por lo tanto inhibe la propagación de las reacciones de los radicales libres (Sista *et al.*, 1997).

3.1.2.2 Enzimas proteolíticas

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de las proteínas a péptidos de cadena corta. El músculo de los productos marinos, como el pescado, presenta una mayor susceptibilidad al deterioro que el músculo de bovinos (Matsumoto 1979). Las proteínas musculares son altamente susceptibles a desnaturalizarse, las alteraciones pueden ser monitoreadas midiendo la hidrofobicidad de las proteínas de superficie, composición de aminoácidos, estabilidad de la estructura proteica, agregación, actividad enzimática. La pérdida de la funcionalidad puede medirse comparando la viscosidad, la capacidad de retención de agua (CRA), gelificación, emulsificación y espumado (Xiong, 1997). En la carne, las proteinasas endógenas (catepsinas, calpaínas Ca^{2+} -dependientes y colagenasas) son consideradas benéficas produciendo el ablandamiento del músculo en rigor mortis. Se han observado ruptura de las líneas Z y de los sarcómeros durante el almacenamiento en congelación de pechugas de pollo, aunque en general la acción de estas enzimas no se considera un detrimento de la calidad (Sista *et al.*, 1997).

Otras enzimas que pueden ser responsables de cambios no deseados, por ejemplo, la trimetilamina demetilasa, en animales, que produce formaldehído el cual interactúa con las proteínas del músculo haciéndolas insolubles y generando una textura esponjosa o algodonosa (Sikorski *et al.*, 1990b).

3.1.3 ESTUDIO DE LA BIOQUÍMICA POST MORTEM EN ORGANISMOS MARINOS.

Las características finales de la parte comestible de un producto, dependen en gran medida de las características propias de la especie (factores endógenos), de las características del medio donde se capturó o se cosechó (factores ante mortem), de las condiciones de cosecha y post cosecha (Gorga y Ronsivall, 1988a; Haard, 2002; Sikorski *et al.*, 1990b). En la Tabla 1 se muestran algunas características.

Cuando un organismo muere, el sistema circulatorio deja de funcionar, ello ocasiona que el suministro de oxígeno se detenga. Cuando el músculo se encuentra en anaerobiosis, se da inicio a reacciones que cambiarán su apariencia, textura, sabor y propiedades funcionales (Haard, 2002), para dar origen a lo que se conoce como carne.

La principal porción comestible de los animales marinos está compuesta por una serie de músculos; el mayor componente del músculo en animales marinos es el agua (50-85%), el resto consta principalmente de proteínas y lípidos (Sikorski *et al.*, 1990a). Cada organismo posee una composición proximal diferente, las reacciones químicas post mortem según el tipo de molécula son:

- a) **Carbohidratos:** Los primeros cambios son la hidrólisis del glucógeno, donde se generan moléculas de glucosa. Esta molécula en ausencia de oxígeno, puede transformarse en ácido láctico, contribuyendo al descenso del pH del medio.

Tabla I. Factores que afectan las propiedades finales de los productos marinos

Endógenos	Ante-mortem	Cosecha y Postcosecha
<ul style="list-style-type: none"> • Especie • Edad del organismo • Concentración y actividad de enzimas responsables de la pérdida de frescura en la parte comestible • Concentración y disponibilidad de sustratos para las anteriores enzimas 	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura del hábitat • Método de captura • Carga microbiana inicial 	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura y tiempo de almacenamiento¹ • Presencia/ausencia de vísceras • Procesos físicos y químicos para detener las reacciones post mortem • Disponibilidad del O₂ en el empaque • Presentación del producto: entero, filete, trozo, desconchado, descabazado. • Condiciones sanitarias

- b) **Proteínas:** Estas moléculas principalmente son hidrolizadas por proteasas endógenas, los aminoácidos resultantes contribuyen al desarrollo de sabores agradables. Sin embargo la hidrólisis

implica una pérdida en la integridad del músculo, cambiando la textura del mismo.

- c) **Aminoácidos:** Pueden ser degradados por microorganismos, generando así aminas biogénicas, las cuales son compuestos indeseables e incluso tóxicas que merman la calidad sensorial y sanitaria del alimento.
- d) **Lípidos:** Son moléculas que le imparten sabor, olor, y textura característicos a cada alimento. Son susceptibles a la hidrólisis y a la oxidación, los productos de estas reacciones imparten olores y sabores desagradables.
- e) **Compuestos nitrogenados no proteicos:** La molécula más importante de este tipo es el ATP, debido a que su degradación enzimática genera compuestos que imparten sabores tanto deseables (IMP) como indeseable (hipoxantina) (Haard, 1992, 2002).

3.1.3.1. Frescura y deterioro

Vida de anaquel es un término que indica el periodo durante el cual un alimento es apto para consumirse. Su extensión depende íntimamente de la temperatura a la cual se almacena. Durante este tiempo se llevan a cabo dos fenómenos: La **pérdida de frescura** y el **incremento del deterioro**. Una vez que el organismo muere, las enzimas endógenas se encargan del primer fenómeno y

las enzimas microbianas (exógenas) se encargan del deterioro del producto (Sikorski *et al.*, 1990b).

Dos conceptos importantes usados al medir las características de un producto pesquero son la edad cronológica y la edad bioquímica. La cronológica se refiere al tiempo que ha pasado desde que murió el organismo, mientras que la bioquímica hace referencia al mismo tiempo, si el producto se manejó en condiciones óptimas, por ejemplo, fue almacenado en refrigeración a 0°C (Ocaño-Higuera *et al.*, 2001). La edad bioquímica se verá afectada por los factores que se indican en la tabla 1.

Para evaluar la frescura y el deterioro, es frecuente que se usen criterios no definidos, por ejemplo, un alimento puede ser catalogado como: fresco, comerciable o no apto. Esta manera de catalogar no tiene que ver con la frescura directamente; el primer grado abarca desde que el alimento es recién capturado hasta que muestra los primeros signos de deterioro; un alimento de grado comerciable presenta desde los primeros signos de daño hasta los límites para el rechazo. Los criterios no están bien establecidos, por lo que se genera confusión, además estos dependen tanto del destino final del producto, como de la especie.

Algunas personas utilizan la evaluación sensorial, para determinar si el producto es o no aceptable o apto para consumirse. Las evaluaciones de este tipo se realizan por un grupo de personas entrenadas (panel de prueba), las cuales pueden evaluar desde sólo una característica o al alimento en general. El entrenamiento es complicado, costoso y tardado. Adicional a esto, por el fenómeno de fatiga, el panelista tiene un número limitado de análisis. Por lo

anterior, se recomienda el uso de mediciones instrumentales, ya que son más exactas, repetibles y rápidas (Abbot, 1972; Gorga and Ronsivall, 1988b; Kress-Rogers, 2001).

Las mediciones instrumentales pueden usarse para evaluar la frescura y deterioro mediante:

- a) la cuantificación de la concentración de sustratos o productos del metabolismo del propio organismo o microbiano (Ryder, 1985; Woyewoda *et al.*, 1986),
- b) la actividad de enzimas relacionadas con las rutas bioquímicas de la pérdida de frescura o incremento de deterioro (Haard, 2002; Okuma y Watanabe, 2002),
- c) la evaluación de perfiles de compuestos volátiles que imparten los olores y sabores característicos (Kress-Rogers, 2001; Spurvey *et al.*, 1997),
- d) las evaluaciones de la estructura micro y macroscópica que definen la textura (Szczesniak, 1972; Prusa *et al.*, 1982).

3.1.3.2 Índices químicos para evaluar frescura

La frescura es un atributo que se emplea para determinar la calidad de un alimento, los índices para medirla deben basarse en fenómenos post mortem endógenos.

El **índice K** o valor K es uno de los índices químicos más empleados para medir frescura en productos pesqueros, éste valor fue propuesto por Saito *et al.* (1959). El índice relaciona la concentración de ATP y la de los productos de su degradación enzimática (Figura 3). Las concentraciones de estas biomoléculas puede evaluarse por métodos instrumentales, y la cuantificación se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\%K = \frac{[INOSINA] + [HIPOXANTINA]}{[ATP] + [ADP] + [AMP] + [IMP] + [INOSINA] + [HIPOXANTINA]} \times 100 \text{ (Ec. 1)}$$

La degradación enzimática del ATP presenta dividirse dos etapas, en la primera se produce una acumulación de IMP, posteriormente en una segunda etapa el IMP es degradado hasta hipoxantina. A 0°C, la primera etapa culmina dentro de las primeras 24 h y la segunda en los siguientes días.

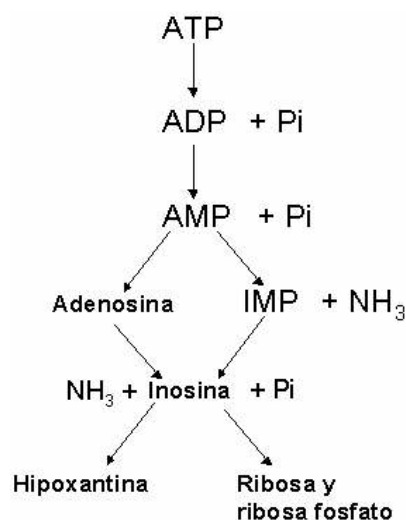


Figura 3. Productos de la degradación enzimática del ATP

Regularmente, después de la captura el valor del índice K no es mayor al 10%, al principio se incrementa gradualmente por la acción enzimática, posteriormente se presenta un punto de inflexión. (Sikorski *et al.*, 1990b). Si se desea observar la pérdida de frescura es necesario elaborar una curva del tiempo y el índice K, con ello se puede conocer el valor mínimo de frescura; para saber el valor máximo, será necesario relacionarlo con índices de deterioro.

Debido a que la acumulación de IMP se lleva en menos de 24 h, se ha propuesto el uso del **valor K_i** para evaluar frescura (Karube *et al.*, 1984; Singhal *et al.*, 1997b), la ecuación que lo define es:

$$\%K_i = \frac{[INOSINA] + [HIPOXANTINA]}{[IMP] + [INOSINA] + [HIPOXANTINA]} \times 100 \text{ (Ec. 2)}$$

La **carga energética adenilada** (CEA) es un índice nos permite conocer cuantitativamente la respuesta del organismo a los estresantes previo y durante el sacrificio (Atkinson y Walton, 1967). Se calcula a partir de las concentraciones de compuestos adenilados (ATP, ADP y AMP) usando la siguiente fórmula:

$$CEA = \frac{\frac{[ADP]}{2} + [ATP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]} \text{ (Ec. 3)}$$

3.1.3.3 Índices químicos para evaluar frescura y deterioro

Como índices de deterioro, se eligen compuestos químicos que se generan o se degradan durante la post captura o post cosecha del organismo. Generalmente son compuestos que se producen a partir de la degradación microbiana de aminoácidos o bases nitrogenadas, ejemplo de éstos tenemos al amonio, trimetilamina, aminas biogénicas, sulfuros, ácidos y bases volátiles. Estos índices varían según la especie, por lo que no basta medir un sólo compuesto, es necesario usar al menos dos índices para tener resultados confiables. A continuación se presentan algunos compuestos cuyos índices son empleados para evaluar el deterioro:

- 1) Trimetilamina (TMA): Se ha propuesto que para camarón el máximo permisible es de 10-15 mg/100 g. Antes de elegirlo es necesario cerciorarse que es el índice adecuado, ya que algunos decápodos nunca alcanzan los 5 mg/100 g antes de llegar a deteriorarse.
- 2) Bases volátiles totales (BVT): Dentro de ellas se encuentran el amonio, la TMA, la dimetilamina y la monometilamina. Un incremento considerable de este índice es signo de una contaminación bacteriana. La Norma Oficial Mexicana para productos pesqueros, nos indica que la concentración de BVT-N no debe pasar de 30 mg de N/100g de muestra.

- 3) Aminas biogénicas: Son productos de la actividad microbiana sobre los aminoácidos libres. Su presencia es señal de un gran daño, posiblemente causado por una refrigeración deficiente. Generalmente se miden histamina, cadaverina, putrecina, tiramina, serotonina, espermidina, triptamina y feniletilamina.
- 4) Hipoxantina (Hx): Es un índice que inicialmente se usó para medir deterioro, su contenido incrementa linealmente con el tiempo de almacenamiento, posteriormente el valor decae hasta permanecer constante. (Halásk *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2004, NOM-029-SSA1-1993; Sikorski *et al.*, 1990b; Singhal, *et al.*, 1997b; Woyewoda *et al.*, 1986).

3.2 HIPÓTESIS

Los factores endógenos y ante-mortem de los camarones silvestres y cultivados no son iguales, esto ocasiona que los fenómenos post-mortem se desarrollen de diferente manera, por esto los índices y/o límites que rigen la pérdida de frescura y aumento del deterioro no serán los mismos

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 OBJETIVO GENERAL

Describir los procesos bioquímicos post-mortem (tempranos y tardíos) que ocurren a 0°C en el músculo de camarón patiblanco *Litopenaeus vannamei* y que definen sus atributos como alimento.

3.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ☉ Evaluación del cambio anatómico y en la concentración moléculas relacionadas con el rigor mortis en el camarón patiblanco almacenado a 0°C.
- ☉ Evaluación de los cambios microscópicos (a 0°C) en la estructura muscular del camarón por efecto del rigor mortis.
- ☉ Evaluar la pérdida de frescura en el músculo del camarón patiblanco almacenado bajo óptimas condiciones de refrigeración (0°C).
- ☉ Evaluar índices que indiquen el comportamiento del deterioro del camarón blanco *L. vannamei* almacenado en óptimas condiciones de refrigeración (0°C).

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS ORGANISMOS

Los camarones [*Litopenaeus vannamei* (sinónimo: *Penaeus vannamei*, Boone, 1931)] fueron cosechados de estanques artificiales ubicados en el CIBNOR, S.C. Con fines de acondicionamiento, los camarones se mantuvieron a 27-28°C durante tres semanas. Diariamente heces y resto de alimento fueron removidos, posteriormente se alimentaron *ad libitum* con pienso comercial. Cada tercer día se realizó un recambio del 30% (volumen total) de agua marina (37-38 ppm).

Los camarones presentan un comportamiento evasivo; cuando se sienten amenazados contraen el abdomen longitudinalmente y se impulsan hacia atrás; este movimiento implica gran un gasto de energía. A fin de evitar al máximo dicho comportamiento, los camarones fueron sacrificados por hipotermia. Posteriormente se almacenaron en hielo molido, la temperatura final de almacenamiento durante todo el experimento fue de $0.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. El peso promedio de los camarones fue 21.2 ± 3.7 g.

3.4.2 EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS POST MORTEM TEMPRANOS

3.4.2.1 Evaluación macroscópica del rigor mortis

En estudios preliminares se observó un enconrvamiento en el cuerpo del camarón, esto es un signo de rigor mortis. A fin de evaluar dicho fenómeno se

tomaron al azar 20 organismos, los cuales se mantuvieron en hielo (0°C). Cada 2 ó 3 h se fotografió digitalmente el perfil de los camarones. En cada imagen se calculó un ángulo imaginario (ver Figura 4), el cuál tuvo como vértices: el inicio del primer somite, el final del tercer somite y el final del sexto somite. Dicho cálculo se realizó con el programa computacional SigmaScan Pro 5 (SYSTAT Software Inc.).

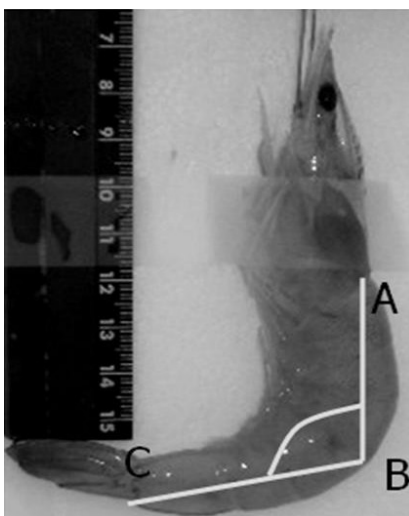


Figura 4. Ángulo imaginario medido para evaluar el grado de encorvamiento en el abdomen del camarón patiblanco durante el fenómeno de rigor mortis a 0°C

3.4.2.2 Evaluación microscópica del rigor mortis

Los análisis químicos, bioquímicos y microscópicos se realizaron en los mismos camarones. En cada muestreo se tomaron 6 individuos, se registró el peso completo y abdominal. El segundo somite de cada camarón se cortó para analizarlo microscópicamente. El resto se almacenó a -80°C.

La porción seleccionada para análisis microscópico se fijó por 24 a 36 h con solución de Davidson (ver Anexo I) (Shaw and Battle, 1957) posteriormente el

tejido se deshidrató, aclaró e incluyó en parafina (ver Anexo II). Los cortes transversales de 3 μm de espesor se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina (ver Anexo III) (Humason, 1979; Sheehan y Hrapchak, 1973).

Las laminillas se analizaron con un microscopio óptico (BX50, Olympus, Co.), los campos de interés se fotografiaron con una cámara digital (CoolSNAP-Pro, Media Cybernetics, Inc) acoplada al microscopio. El análisis de las imágenes se realizó con el programa computacional Image Pro Plus 4.6 (Media Cybernetics, Inc). Para medir el cambio post mortem temprano se cuantificó el porcentaje total de las áreas oscuras y claras. El decremento de la porción oscura se interpreta como una contracción del músculo.

3.4.2.3 Evaluación química y bioquímica del rigor mortis

Después del almacenamiento a -80°C , la porción destinada para los análisis químicos y bioquímicos se liofilizó. Una vez deshidratado el tejido se molió, empacó (bolsas de celofán) y almacenó a -20°C individualmente.

Ya que los cambios post mortem tempranos están relacionados con la degradación de carbohidratos (glucógeno y glucosa) y ATP, se cuantificaron las concentraciones de las siguientes moléculas: glucógeno, glucosa, ácido láctico, ATP, ADP, AMP, IMP, Ino e Hx.

3.4.2.3.1 Cuantificación de glucógeno, glucosa y ácido láctico

Los extractos para estos análisis se prepararon de la siguiente manera: 200 mg de músculo liofilizado fueron rehidratados con 1.5 mL de solución isotónica fría (450 mM NaCl, 10 mM KCl). La suspensión se homogeneizó a 4°C durante 90 s, para ello se empleó un homogeneizador de tejidos (IKA, Ultra-Turrax T8.01).

El glucógeno se cuantificó por el método de antrona, establecido por van Handel (1965), adaptado para muestras pequeñas (Roe *et al.*, 1957). Con la finalidad de precipitar el material proteico, se tomaron 250 μ L de homogeneizado de cada muestra y se mezcló 1:1 (v/v) con TCA al 20%. Las muestras se centrifugaron en un equipo refrigerado (Eppendorf 5810 R) a 4°C por 10 min a 1376 *g*. El **glucógeno** se precipitó con etanol al 96% (1 mL de etanol por cada 50 μ L de sobrenadante). Las muestras se centrifugaron bajo las condiciones descritas anteriormente, el etanol se decantó y el exceso fue evaporando en un horno-estufa (VWR-Sheldon Manufacturing 1350FM) a 70°C. El precipitado se resuspendió en 100 μ L de agua destilada. Posteriormente, a cada tubo de muestra se le agregó 1 mL de solución de antrona al 0.1% diluida en H₂SO₄ al 72%. La mezcla anterior se calentó en un baño de agua a 90°C durante 5 min, seguido de un enfriamiento en baño de hielo. La absorbancia de la mezcla anterior fue registrada a 620 nm. La cantidad de glucógeno se calcula al sustituir los valores de absorbancia en la ecuación de la recta que describe la curva patrón. La concentración de glucógeno se expresó en μ mol de glucosa por g de tejido liofilizado.

La cantidad de **glucosa** se determinó usando un kit comercial de Boehringer Mannheim (1072-706), el método consiste en dos reacciones enzimáticas acopladas, la primera catalizada por la glucosa oxidasa y la segunda por la peroxidasa (Trinder, 1969). El protocolo es el siguiente: en una microplaca se mezcló 20 μL del homogenado (solución isotónica) y 200 μL de solución reactiva y se incubó a temperatura ambiente por 13 min. La absorbancia de la mezcla de reacción se leyó a 490 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad 550). La cantidad se calcula interpolando los datos de absorbancia en la curva patrón. Los resultados se expresaron en μmol de glucosa por gramo de muestra seca.

La concentración de **lactato** se cuantificó con una prueba enzimática colorimétrica [kit de Randox (LC 2389)] (Shimojo *et al.*, 1989). La técnica usa una serie de reacciones acopladas mediadas por lactato oxidasa, peroxidasa y ascorbato oxidasa. El ensayo consistió en mezclar 20 μL del homogenizado isotónico con 200 μL de solución reactiva, después de 10 min de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia de la mezcla se leyó a 540 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad 550). La cantidad de lactato se calcula al sustituir los valores de absorbancia en la ecuación de la recta que describe la curva patrón. La concentración final se expresó en μmol de lactato por g de tejido seco.

3.4.2.3.2 Cuantificación de la concentración de ATP y los productos de su degradación enzimática

Para evaluar el desarrollo de la degradación del ATP y la carga energética adenilada es necesario contar con las concentraciones de ATP y los productos de su degradación enzimática (ADP, AMP, IMP, Ino e Hx). La identificación y cuantificación de estos compuestos se realizó según Ryder (1985). Los extractos a analizar se prepararon homogeneizando 300 mg de músculo con 5 mL de HClO₄ 0.6 M durante 1 min a 0°C. La fase líquida contiene los compuestos de interés, por ello la muestra se centrifugó a 3000 g a 0°C por 10 min en una centrífuga refrigerada (Beckman J2-21). Dos mL del sobrenadante se ajustaron a pH 6.5-6.8 con KOH 1M. Después de una incubación (0°C por 30 min), la solución se filtró con papel filtro (Ahlstrom, grade 642. Retention:2 µm). El filtrado se aforó a 10 mL con agua MilliQ, los extractos se almacenaron a -80°C. Antes de analizar por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) las muestras filtraron con una membrana con un poro de 0.22 µm (Millipore GSWP01300).

El cromatógrafo utilizado (Agilent Technologies) constaba de 5 módulos: bomba cuaternaria (G1311A), degasificador (G1379A), automuestreador (G1313A), compartimiento de columna (G1316A) y detector de arreglo de diodos UV-Vis (G1315B). La columna requerida era de fase reversa C18 Ultrasphere ODS (Beckman #235329), el tamaño de la partícula fue de 5 µm, 4.6 mm de diámetro interno y 250 mm de longitud. Las moléculas en 15 µL de extracto se separaron con un flujo 1.7 mL/min de fase móvil (buffer de fosfatos: KH₂PO₄ 40 mM; K₂HPO₄ 60 mM). Durante 28 min se registró la absorbancia a 254 nm. La identificación de los compuestos de interés se realizó comparando los tiempos de retención de los estándares inyectados. Previamente se realizaron corridas con

diferentes concentraciones de estándares, se obtuvieron las ecuaciones que describen las curvas de calibración de cada compuesto (concentración vs. área). La cuantificación se realizó sustituyendo el área de cada pico en su respectiva curva de calibración.

3.4.2.3.3 Determinación de pH muscular

Este parámetro es muy importante ya que durante las primeras horas su valor cambia considerablemente. El extracto se realizó con músculo liofilizado y agua milli Q (3% w/v), la mezcla se homogeneizó durante 1 min a 0°C. (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2000). El pH se midió con un potenciómetro digital (Hanna Instruments, HI 98230), calibrado a 0°C.

3.4.2.3.4 Cuantificación de la concentración de aminoácidos libres en músculo

Para llevar a cabo los análisis de la concentración de aminoácidos se usó la técnica de Church *et al.*, (1982). Se basa en la reacción del *o*-ftaldialdehído (OPA) y el β -mercaptoetanol con las aminas primarias. Brevemente se describe la metodología: en una microplaca se mezclaron 50 μ L (dilución 1:50) del extracto de TCA (preparado para cuantificar glucógeno), con 250 μ L del reactivo de OPA (ver anexo IV), se incubó la reacción por 2 min a temperatura ambiente. La absorbancia se mide a 340 nm. La cantidad de aminoácidos libres se calculó sustituyendo el valor de la absorbancia en la recta patrón de L-Leucina.

3.4.3 EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS POST MORTEM TARDÍOS

Los análisis microscópicos y la estimación de los índices de calidad y deterioro se realizaron en los mismos camarones. En cada muestreo se tomaron seis individuos, se registró el peso completo y abdominal. El segundo somite de cada camarón se disectó para analizarlo microscópicamente. El resto se almacenó individualmente a -80°C.

3.4.3.1 Evaluación de índices de frescura y deterioro

3.4.3.1.1 Estimación de los índices de frescura

Se seleccionaron como índices de frescura el índice K (ver Ec. 1), el valor K_i (ver Ec. 2) y la carga adenilada (ver Ec. 3). Estos índices se calcularon con la concentración del ATP y los productos de su degradación enzimática. La metodología para la cuantificación de estos nucleótidos, nucleósidos y bases nitrogenadas, se describió previamente en la introducción del presente capítulo.

3.4.3.1.2 Estimación de los índices de deterioro

Los índices seleccionados como de deterioro para el presente trabajo fueron: pH, concentración de bases volátiles totales (BVT-N), trimetilamina (TMA-N).

3.4.3.1.3 Cuantificación de Bases Volátiles Totales (BVT-N)

La cuantificación de las BVT's se realizó según lo descrito en Woyewoda *et al.* (1986). El músculo de camarón se homogenizó con agua destilada dentro de un matraz bola. Al homogenizado se le adicionan 2 g de MgO, 2 mL de aceite vegetal de maíz (antiespumante) y perlas de vidrio. El matraz se colocó en un aparato de destilación (ver Figura 5), el destilado se recibió (BV's) en una solución de HBO₃ al 2%. La cantidad de BV's se cuantificó titulando (V) con una solución valorada de H₂SO₄ 0.03 N (N). Para calcular la concentración de BVT se usó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg BVT - N}}{100 \text{ g muestra}} = \frac{V \times N \times 100 \times 14}{\text{g muestra}} \quad (\text{Ec. 4})$$

3.4.3.1.4 Cuantificación de Trimetilamina (TMA-N)

La muestra se homogenizó con TCA al 7.5% (1:2 p/v), se centrifugó por 15 min a 5000 g. El sobrenadante se filtró, el se almacenó a 4°C hasta su análisis.

Para la cuantificación se empleó la técnica para cuantificar TMA en productos pesqueros (AOAC, 1990), sólo se adaptó para muestras pequeñas y lectura en microplaca. Se mezclaron 300 µL de extracto con 75 µL de formaldehído al 10%, 750 µL de tolueno seco y 225 µL de KOH. La mezcla se incubó a 30°C durante 15 min agitando vigorosamente. Se toman 500 µL de la fase de tolueno y se mezclan suavemente con 30 mg de Na₂SO₄, posteriormente se incuban 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, 350 µL de la solución incubada se mezclan con 350 µL de ácido pícrico al 2%. La absorbancia de la

muestra se registra a 410 nm. La intensidad de la coloración amarillenta es directamente proporcional a la concentración de TMA en la muestra. El cálculo de la cantidad se realiza interpolando el valor de la absorbancia con la recta obtenida en la curva patrón con TMA.



Figura 5 Aparato de destilación empleado para cuantificar BVT-N

3.4.3.2 Evaluación microscópica de los cambios estructurales en el músculo de camarón

La metodología empleada para procesar y analizar estas muestras se describió en la sección de cambios post mortem tempranos.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.5.1 CAMBIOS POSTMORTEM TEMPRANOS

En 1956 Bailey *et al.* analizaron los trabajos relacionados con la evaluación de la calidad de camarones almacenados en hielo. Clasificaron las pruebas en tres grupos: 1) aquellas que indican cambios definitivos en la calidad *premier*; 2) las que determinan el inicio de del deterioro y 3) las que determinan la calidad relativa.

Los cambios post mortem tempranos son aquellas reacciones químicas o enzimáticas que se desarrollan en la parte comestible de un organismo y que impactan de manera significativa en la calidad final del alimento. El tiempo cero de estas reacciones se considera justo después de la muerte y tienen tres características principales: 1) son reacciones que rigen la fisiología del organismo vivo; 2) los sustratos son transformados a productos dentro de las primeras 48 a 72 h (a 0-5°C), y 3) la transformación subsiguiente de los productos, sirven como índices deterioro.

3.5.1.1 Cambios postmortem tempranos en carbohidratos

El glucógeno es una molécula de reserva, su hidrólisis produce moléculas de maltosa y glucosa, posteriormente con otros mono y disacáridos son transformados a lactato. Una vez que se ioniza el ácido láctico el pH del medio disminuye. La degradación enzimática del ATP a IMP implica la liberación de iones

fosfato, los cuales también contribuyen a la disminución del pH. (Sikorski *et al.*, 1990).

En la Figura 6 se muestra la variación de los azúcares y ácido mencionados. El glucógeno no muestra una disminución en la concentración. La concentración de la glucosa disminuye en las primeras 2 h, posterior a esto se muestra un pico, el cual puede traducirse como una síntesis post mortem de glucosa, finalmente la concentración disminuye hasta permanecer constante. El lactato muestra dos picos significativos a las 3 y 12 h post mortem. Se observó, una correlación con la glucosa hasta la hora 10. El pH se incrementa gradualmente, contrario a lo reportado en vertebrados, donde el pH disminuye durante las primeras horas post mortem, esto por la síntesis de lactato (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2000; Sikorski *et al.*, 1990b).

Los valores iniciales de glucógeno, así como la tendencia al aumento coinciden con lo reportado en Bayle *et al.*, (1956). Posiblemente el aparente aumento en la concentración de glucógeno se debe a un error en la selección de la técnica, ya que en la metodología empleada la antrona reacciona con todos los carbohidratos reductores dando así valores por encima de lo esperado.

3.5.1.2 Cambios postmortem tempranos en ATP y derivados

La concentración de la suma total de ATP derivados fue de $36.4 \pm 1.8 \mu\text{g/g}$ ($8.9 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$ en base húmeda). Esto concuerda con las concentraciones

presentadas en otros invertebrados (Chiou y Huang, 2004; Ocaño-Higuera, *et al.*, 2006; Yokoyama *et al.*, 1994)

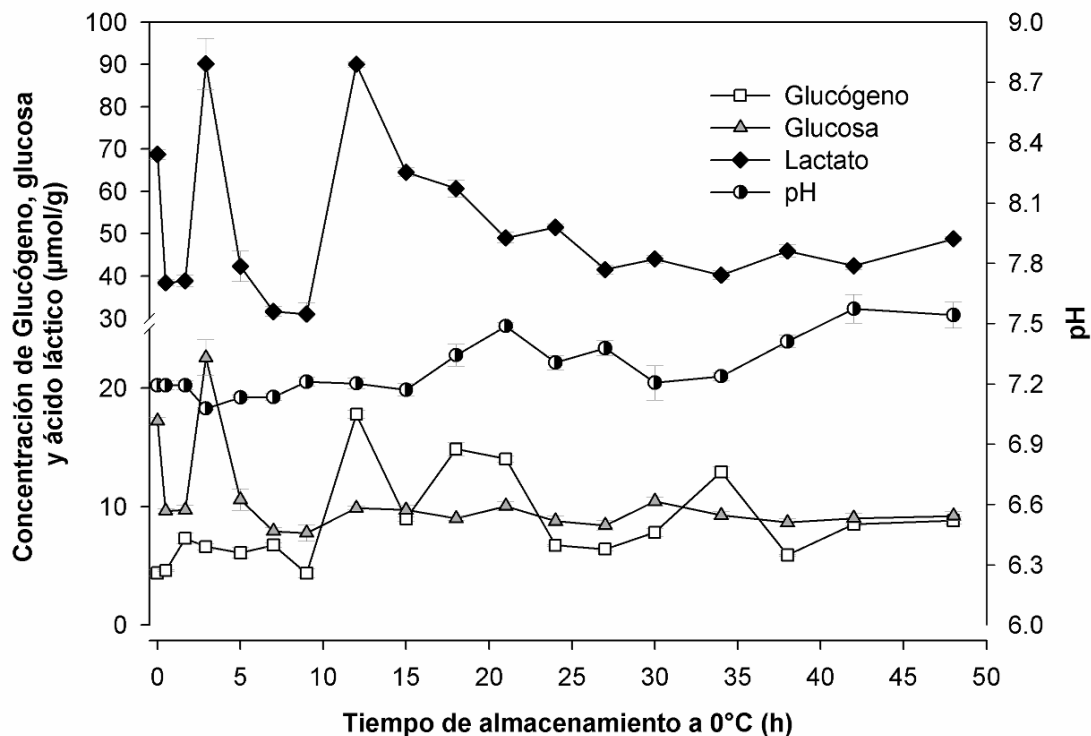


Figura 6. Efecto del almacenamiento a 0°C en el pH, concentración de glucógeno, glucosa y lactato en el músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*)

Los cambios de la concentración de ATP y derivados se muestran en la Figura 7. Las concentraciones iniciales de ATP, ADP y AMP fueron de 30.3 ± 2.7 , 4.7 ± 0.6 , 1.1 ± 0.9 , respectivamente, con estos datos la CEA se calculó. El valor de CEA de 0.90 ± 0.01 confirma que los organismos fueron sacrificados bajo condiciones de estrés reducido.

El comportamiento del ATP muestra un descenso en la concentración hasta la hora 3, posteriormente se presenta una síntesis hasta la hora 5. La correlación con

el AMP muestra la relación estrecha entre estas dos moléculas. La síntesis post mortem de ATP fue posible por la presencia de arginina fosfato (Ocaño-Higuera, *et al* 2001). La acumulación máxima de AMP se alcanza 15 h post mortem, la buena correlación ($r = 0.81$) afirma que dicha molécula se transforma lentamente a IMP durante las siguientes horas.

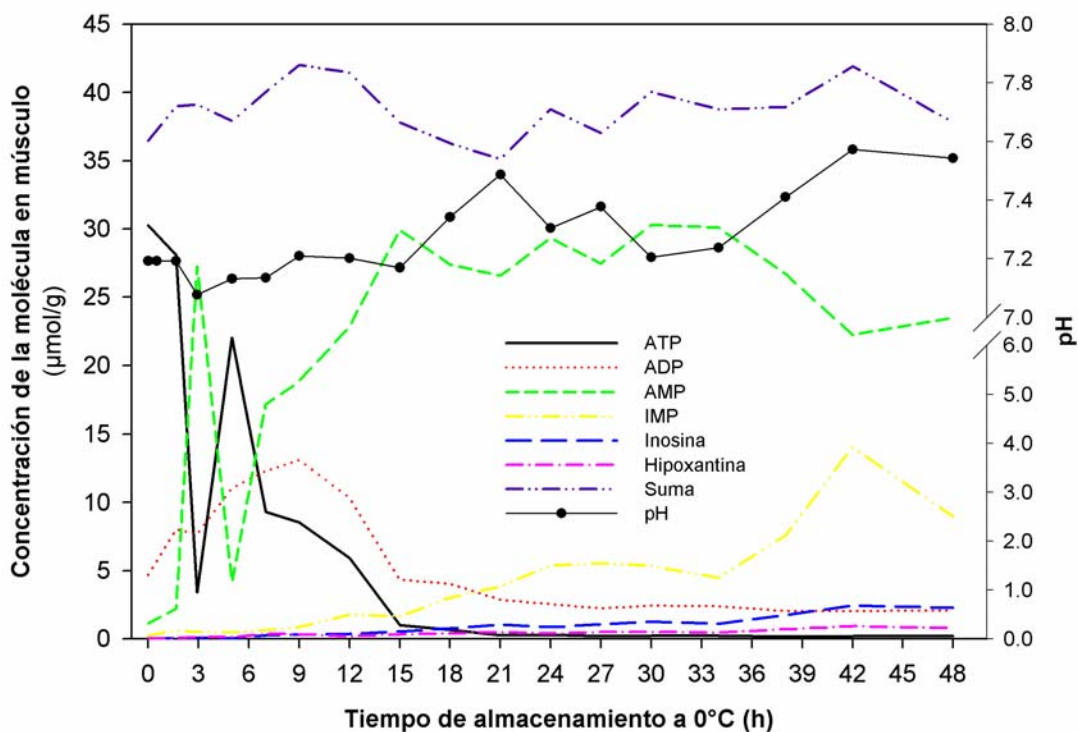


Figura 7. Cambios post mortem tempranos en la concentración del ATP y los derivados de su degradación enzimática en el músculo de camarón patiblanco almacenado a 0°C

En la figura 8 se muestra la relación entre el pH y las posibles moléculas que influyen en su variación. El primer cambio significativo en el pH ocurre a las 3 h, esto coincide con la síntesis de lactato y la degradación de ATP. La siguiente variación del pH (15 h) se ve influenciada por estas dos moléculas. Posterior a

esto, las variaciones se pueden atribuir al AMP e IMP; con la síntesis de IMP a partir de AMP se produce NH_3^+ , debido a lo anterior el pH del medio se incrementa. A las 42 h se observa una pequeña inflexión en la curva de pH, la cual se justifica con una ligera resíntesis de AMP y la síntesis de inosina.

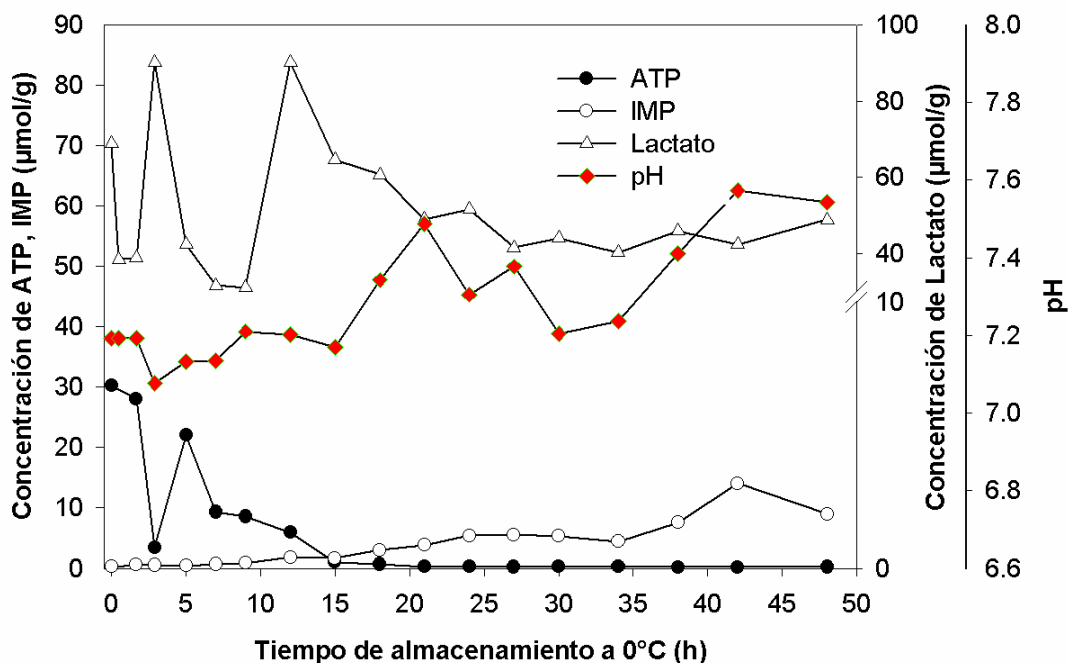


Figura 8. Cambio en la concentración de moléculas responsables de la variación de pH en el músculo del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) almacenado a 0°C

3.5.1.3 Cambios postmortem tempranos en la estructura del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*)

Al igual que en el resto de los animales el fenómeno de rigor mortis se presenta en el camarón. La figura 9 muestra el encorvamiento progresivo a 0°C. La imagen tomada al tiempo 27.5 h corresponde al grado máximo de encorvamiento mostrado en la figura 10.

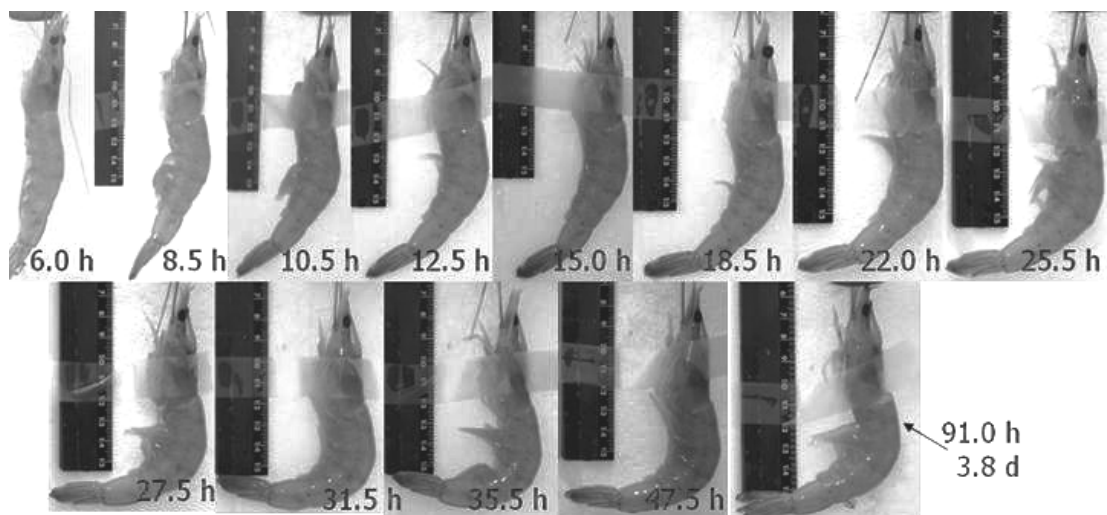


Figura 9. Desarrollo del encorvamiento post mortem en el abdomen del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) almacenado a 0°C

El camarón presenta una compleja estructura muscular, por esta razón se estudió el fenómeno de rigor mortis de manera transversal y longitudinal. En la figura 10 se observa que la contracción muscular transversal (decremento de área obscura), coincide con el inicio del encorvamiento. Con lo anterior puede establecerse que el rigor inicia 5 h después de la muerte, el final de este fenómeno post mortem se observa a las 30 h post mortem. Se observó una resolución aparente en la sección transversal 10 a 15 h después, esto posiblemente por el desarrollo del rigor de las fibras musculares longitudinales. Por el contrario, hasta el día 3.8 (Figura 9) no se observa una resolución del rigor longitudinal.

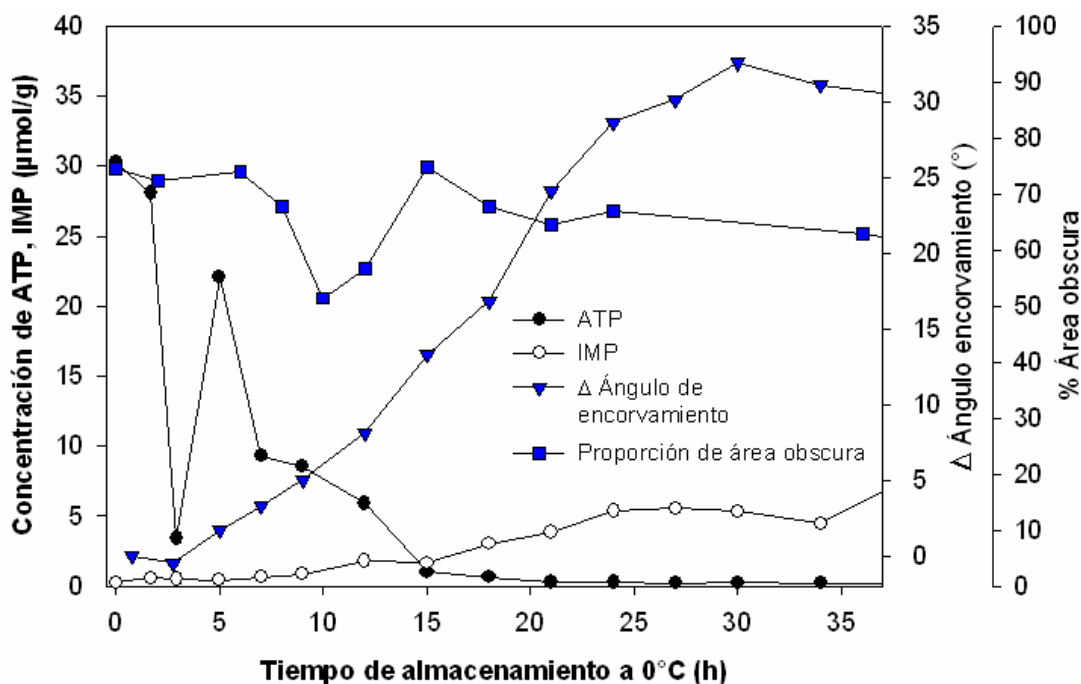


Figura 10. Cambios post mortem tempranos en la estructura macro y microscópicas del músculo del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) almacenado en hielo (0°C)

En vertebrados, la resolución del rigor ocurre por acción de proteasas endógenas (Jiang, 1998, Oliveira *et al.*, 2004). En especie el rigor no se resuelve, lo que indica una baja actividad de proteasas musculares. Yan *et al.* (1994) demostró que en músculo de *Penaeus penicillatus* la actividad de proteasas es baja (20 veces menor a la presente en cefalotórax).

Estudios previos en decápodos revelan que la tasa de rigor mortis se incrementa con la temperatura (Sidhu *et al.*, 1974; Wilaichon *et al.*, 1977). Estudios en camarón *P. setiferus* (descabezado in vivo) indican que a 0°C, el abdomen inicia y se resuelve el rigor mortis, 7 y 11 h post mortem respectivamente (Wilaichon, *et al.*, 1997). Es probable que el ejercicio durante la captura y

descabezado, hayan abatido la concentración de ATP, logrando así un inicio y resolución prematuros.

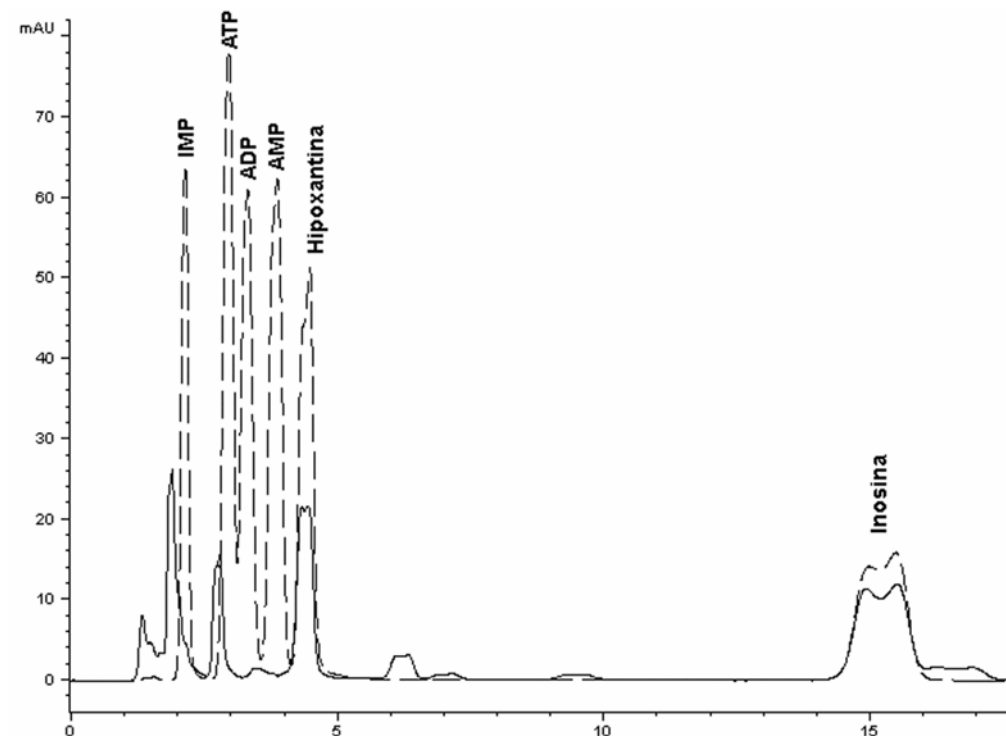


Figura 11. Cromatograma resultante del agua de deshielo después de almacenar camarón a 0°C durante 5 d. La línea sólida corresponde a la muestra. La línea punteada representa la inyección de estándares

3.5.2 CAMBIOS POST MORTEM TARDÍOS EN EL MÚSCULO DE CAMARÓN PATIBLANCO (*Litopenaeus vannamei*)

3.5.2.1 Pérdida de aminoácidos, nucleótidos, nucleósidos y bases nitrogenadas

Analizando la variación de la suma total de ATP y los derivados de su hidrólisis, observamos una clara pérdida de moléculas durante el almacenamiento en hielo (Figura 12). Al día 4 se han perdido cerca del 12% del valor más alto de

concentración, el 50% de pérdida se registra al día 22, finalizando con una pérdida del 74 % después de 1 mes de almacenamiento.

En la figura 11 se muestra un cromatograma donde se evidencia la presencia de nucleótidos en el agua de deshielo al día 5, principalmente se observa la presencia de inosina e hipoxantina. Adicional a esto, se cuantificó la concentración de aminoácidos libres en músculo durante las primeras horas. Los análisis mostraron que al día 2 se perdió cerca del 50% de la concentración inicial [213.3 $\mu\text{mol/g}$ músculo (base húmeda)].

Los camarones son organismos que crecen a diferentes condiciones de salinidad (Briggs, 2004), esa es una señal de la gran capacidad que tiene para osmorregular (Cobb III *et al.*, 1975). Cuando se captura o se cosecha el camarón, el primer método de preservación es el enhielado; generalmente el hielo empleado está hecho de agua dulce (Potter, 1978, Sikorski, 1990). La diferencia de concentraciones de solutos entre el interior y el exterior del camarón ocasiona un desequilibrio al interior del camarón. Una vía para igualar las concentraciones de solutos es la entrada de agua, por ello el producto se hidrata (ver capítulo 2). Durante el proceso de equilibrio también se presenta un fenómeno de lixiviación, donde compuestos de bajo peso molecular se solubilizan en el agua de deshielo. Cobb III *et al.* (1974) observó que en el músculo abdominal de *Penaeus setiferus*, la concentración de aminoácidos libres disminuían durante el almacenamiento. Después de algunos experimentos donde se varió la tasa de deshielo se concluyó que los aminoácidos eran lixiviados por el agua de deshielo. Spurvey *et al.* (1998) menciona que estas moléculas son las responsables del sabor en la carne de los

invertebrados marinos; por lo que durante la lixiviación la calidad sensorial del producto final disminuye.

3.5.2.2 Variación del ATP y los derivados de su degradación enzimática

Debido a lo anterior, el análisis de la degradación post mortem tardía de ATP, deberá realizarse usando las proporciones de cada molécula en la suma total (Figura 12). Al momento de morir los organismos, la proporción de ATP fue del 83%, prácticamente después de 1 d las moléculas habían sido transformadas a AMP. La rápida acumulación de AMP en esta especie, sugiere una gran actividad catalítica de ATPasa y miokinasa, o una actividad limitada de la AMP deaminasa. Estudios previos en invertebrados (artrópodos y moluscos) indican que el agotamiento de ATP agotamiento se realiza dentro de las primeras 48 a 72 h post mortem. Sin embargo al igual que en estos organismos, la degradación de AMP a IMP se desarrolla de manera gradual a lo largo del almacenamiento (Mendes *et al.*, 2001, Ocaño-Higuera *et al.*, 2006; Shimada *et al.*, 1998; Sidhu *et al.*, 1974; Yokohama *et al.*, 1994). A partir del día 9, la síntesis de IMP se origina por la degradación del AMP ($r = 0.83$). Finalmente el IMP es convertido a Ino y este a su vez en Hx. La síntesis de ésta última presenta un aumento lineal.

3.5.2.3 Índices de frescura

Los índices de frescura surgen por dos razones: la necesidad de darle un valor numérico a la característica “frescura” y establecer los límites permisibles. Todo con el objetivo de simplificar la evaluación de ésta característica

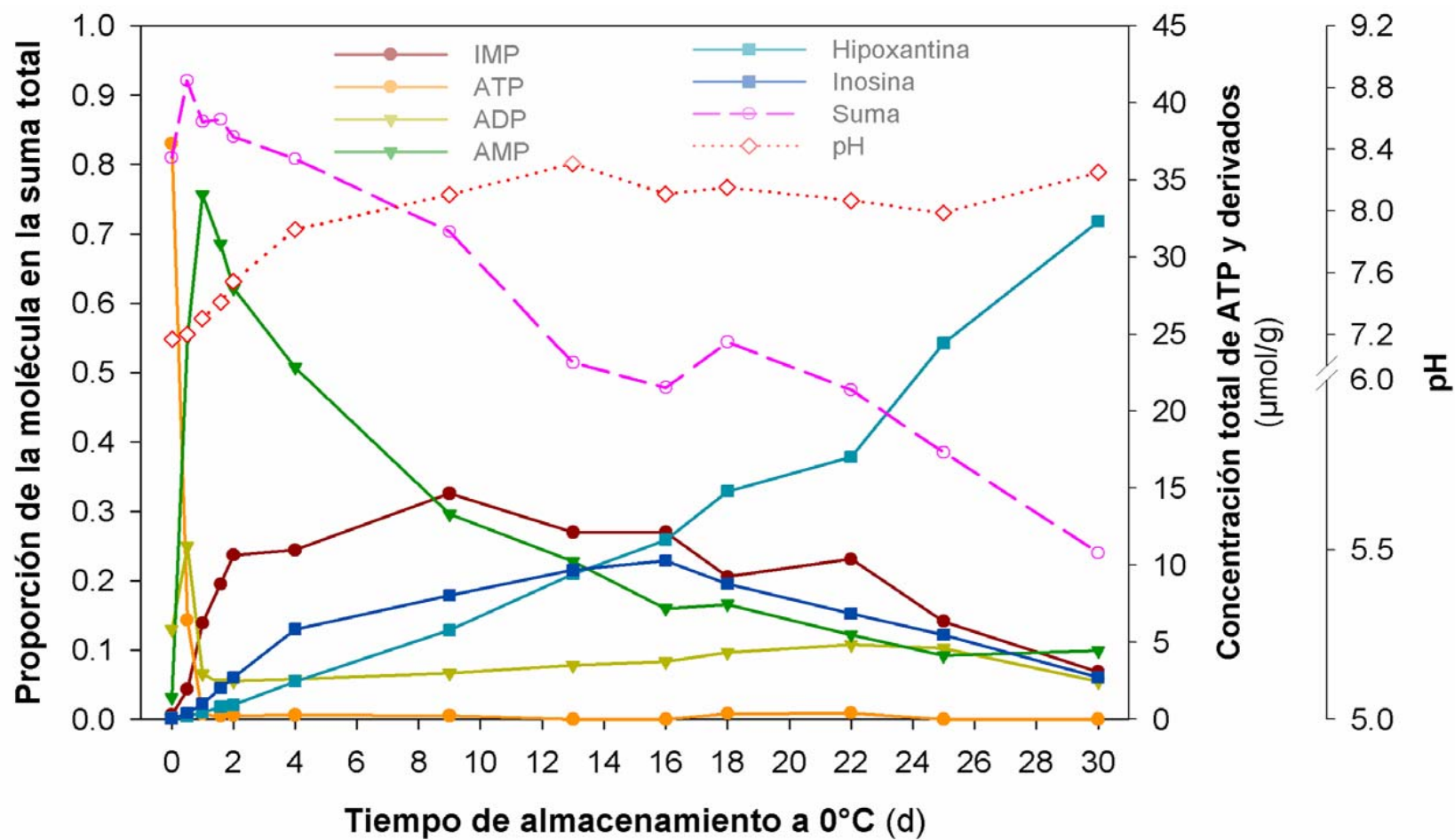


Figura 12 Cambios post mortem tardíos en la concentración del ATP y los derivados de su degradación enzimática en el músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) almacenado a 0°C

durante la comercialización. En la Figura 13 se muestra el comportamiento de tres índices de frescura: %K, %K_i, y CEA. Se ha discutido si el índice K (%K) es el valor más adecuado para medir frescura, si bien el cálculo de este valor se deriva de la actividad endógena, después de un tiempo de almacenamiento, el aumento de esta depende de la actividad microbiana (síntesis de Hx).

El ajuste lineal de %K ($r = 0.91$) y %K_i ($r = 0.98$) se muestran en la Figura 13. Ambos índices podrían considerarse adecuados ($r > 0.75$), sin embargo observando la tendencia de los valores de %K, vemos que el ajuste adecuado para esta variable y el tiempo de almacenamiento es el polinomial ($r = 0.99$).

Para *L. vannamei* el índice K no se considera un parámetro adecuado para describir la pérdida de frescura, ya que su aumento no se explica de una manera lineal. En contraste el índice %K_i puede considerarse adecuado. La ecuación que describe la relación del tiempo de almacenamiento y esta variable se indica en la Ecuación 5, donde x corresponde al tiempo (d) de almacenamiento a 0°C y y al índice de frescura (%K_i). Estudios previos han demostrado que el %K es un índice adecuado para evaluar frescura en peces (Sikorski *et al.*, 1990b, Pacheco-Aguilar *et al.* 2000). Este índice se ha propuesto para evaluar calidad en invertebrados (moluscos y artrópodos), sin embargo dichos estudios están realizados a tiempos cortos de almacenamiento, lo cual impidió observar que para estas especies la relación no presenta un ajuste lineal real (Mendes *et al.*, 2001; Ocaño-Higuera *et al.*, 2006; Sikorski *et al.*, 1990b; Yamagata and Low, 1995).

Para el camarón patiblanco, la CEA podría servir como un probable **índice de cosecha**, ya que puede evidenciar el impacto de condiciones estresantes previas y durante la cosecha. No podría ser empleado a como un índice de frescura ya que después del día 4 (Figura 13), se generan compuestos que coinciden con el tiempo de retención del ATP (análisis por HPLC), dando así falsos valores de CEA.

$$y = 2.3337x + 24.77 \text{ (Ec. 5)}$$

La carga energética adenilada relaciona la concentración de ATP, ADP y AMP, es un indicador que cuantifica la respuesta de un organismo a efectos estresantes previos y durante la captura o cosecha. (Chiou y Huang, 2004). Un valor inicial de CEA ≥ 0.9 , indica que: a) el organismo murió bajo condiciones de estrés reducido, b) durante la captura no hubo lucha o esta fue nula y c) la muerte fue rápida.

Yokoyama *et al.* (1994) demostró que para cuatro especies de moluscos el valor del índice K no se incrementó mas allá del 20%. Llegando a la conclusión que para *Cassostrea gigas*, *Meretrix lusoria*, *Anadara broughtonii* y *Haliotis discus*; los valores tanto el %*Ki* como la CEA servían como índices de frescura.

3.5.2.4 Índices de deterioro

La NOM-029-SSA1-1993, rige en México las especificaciones sanitarias para el manejo los crustáceos frescos-refrigerados y congelados. En ella se indica que el límite máximo de nitrógeno amoniaco es de 30 mg/100 g. En la Figura 14 se muestra que el valor inicial de BVT-N en el músculo de camarón es de 21.5. El

responsable de este valor no es la actividad microbiana, ya que el producto es de reciente cosecha; por ello se sugiere que el amoniaco evaluado proviene de alguna sal de amonio (Spurvey *et al*, 1998). Se ha demostrado que este compuesto participa en el fenómeno fisiológico de osmorregulación.

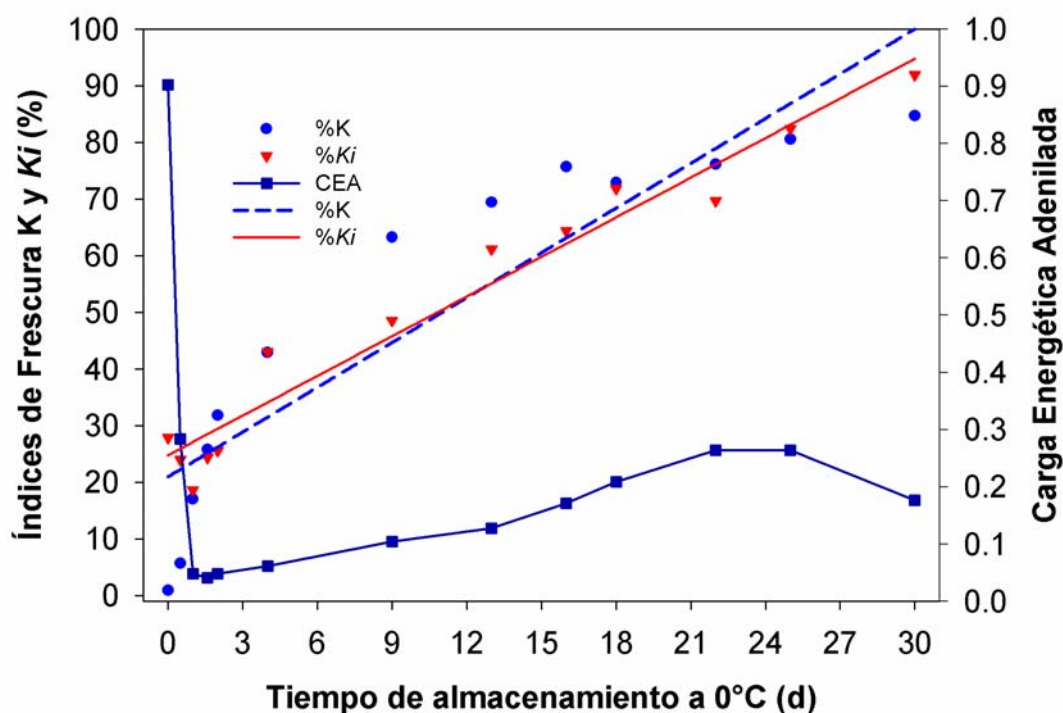


Figura 13. Variaciones presentadas en los índices de frescura durante el almacenamiento a 0°C del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*)

Al día 5 se alcanza un valor cercano al límite de la NOM, lo que indicaría un rechazo del producto por estar deteriorado. Sin embargo el producto se encuentra en óptimas condiciones ya que no presenta olores desagradables (amoniaco), adicional a esto se tiene que la concentración de TMA (Figura 14) es de 0.2 mg TMA-N/100 g, valor muy por debajo del límite permisible (3 mg/100 g).

Leitão y Rios (2000) y Ocaño-Higuera *et al.*, 2006; obtuvieron valores similares de BVT-N en el músculo de *Macrobrachium rosenbergii* y *Argopecten ventricosus*).

En la figura 14 se muestra el incremento en la concentración muscular de TMA, el valor al día 30 es cercano a 9 mg en 100 g de tejido, lo cual indica que la vida de anaquel para este producto es de 30 d. En este día de almacenamiento se comenzó a detectar olores ligeramente desagradables.

Desde el inicio del almacenamiento el incremento de la proporción de hipoxantina con respecto al tiempo es lineal ($r = 0.98$) (Figura 14). Debido a esto podría tomarse como índice de deterioro la proporción de Hx en el músculo, tomando como límite máximo un 70%. La ecuación que describe el comportamiento se indica en la ecuación 6 donde x corresponde al tiempo (días) de almacenamiento a 0°C y y a la proporción de hipoxantina en la suma de la concentración de ATP y sus derivados en el músculo de camarón patiblanco.

$$y = 0.022 x - 0.32 \text{ (Ec. 6)}$$

El cambio del pH muscular respecto al tiempo se muestra en la Figura 12, en ella se observa un incremento lineal desde el día cero hasta el día 13, (7.20 a 8.31) posteriormente el valor permanece sin cambios significativos. Esta variable tampoco podrá ser usada como indicador de deterioro (pH final = 8.25).

Reportes previos en los crustáceos: *Nephorops norvegicus*, *Panulirus polyphagus*, *Parapenaeus longirostris* y *Penaeus monodon* muestran que el valor inicial de pH

y su incremento post mortem es considerablemente mayor (Fatima y Qadri, 1985; Gonçalves *et al.*, 2003; Lou, 1985; Sikorski *et al.*, 1990b).

Fatima y Qadri (1985), evaluaron los cambios en la calidad del músculo de langosta (*Panulirus poliphagus*) almacenada en hielo. Reportaron que incrementos de pH menores o iguales a 0.1, indican que se trata de músculos de primera calidad, mientras que incrementos entre 0.1 a 0.2, son músculos de calidad aceptable. Incrementos de 0.2 unidades o mas, corresponden a productos deteriorados.

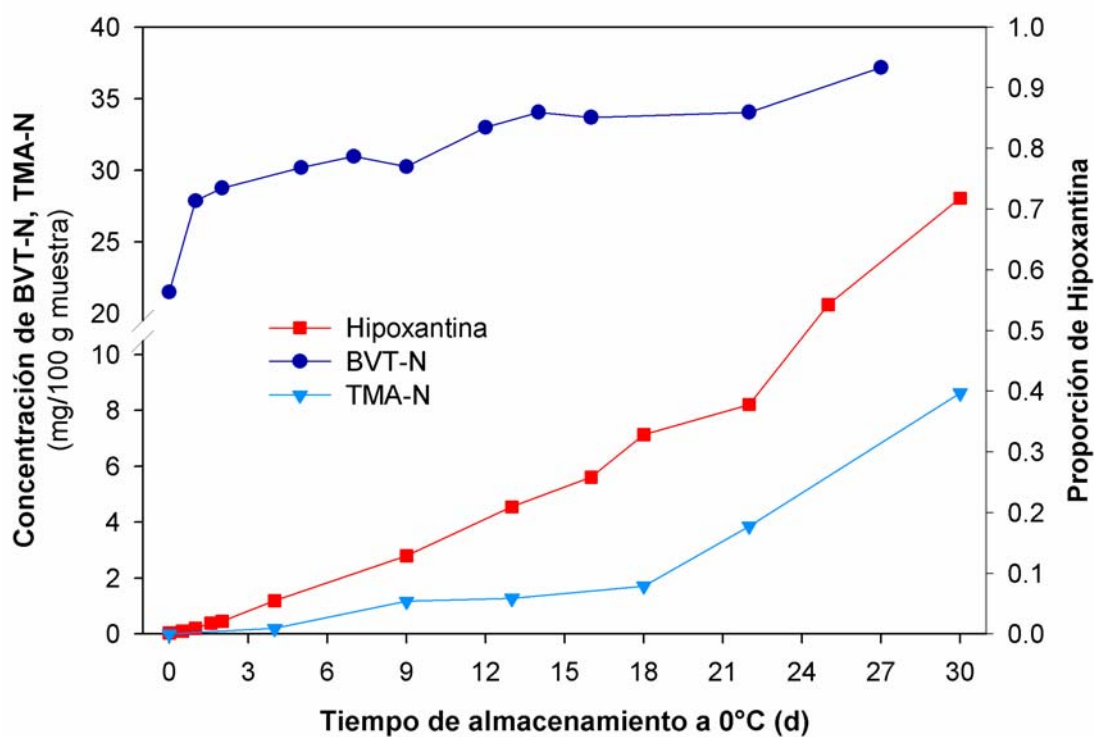


Figura 14. Variaciones presentadas en los índices de deterioro durante el almacenamiento a 0°C del camarón pariblanco (*Litopenaeus vannamei*)

3.6 CONCLUSIONES

El humano ya no sólo consume alimentos por la necesidad de nutrirse, ahora el componente hedónico juega un rol muy importante. El consumidor hoy en día se preocupa (y paga) por obtener un producto con características sensoriales deseables, que sea sano, inocuo y auténtico.

Las reacciones post mortem de un organismo dependen en gran medida de su biología, por esta razón cada especie de interés comercial debe ser estudiada individualmente. Lo anterior con el fin de establecer cuales son las condiciones óptimas de mantenimiento, de cosecha (o captura) y de conservación post cosecha, que permiten alcanzar todas y cada una de las características deseadas por el consumidor. Más importante aún, el conocimiento completo de la especie permite establecer cuales son los parámetros adecuados a medir, y los límites máximos de aceptación, que permitan el aseguramiento del concepto de calidad total.

Durante los primeras horas post mortem *Litopenaeus vannamei* presenta al igual que en el resto de los animales una síntesis de ácido láctico, y degradación de ATP, sin embargo esto no es suficiente para disminuir significativamente el pH muscular. Por lo anterior el pH no puede considerarse como un indicador confiable.

El camarón estudiado presenta el fenómeno de rigor mortis, el cual inicia y termina 5 y 30 h post mortem. Hasta después de 3.8 d no se observó una

resolución del rigor por lo que se confirma que la actividad proteolítica muscular es despreciable.

En el presente estudio se estableció que el almacenamiento en hielo, promueve la lixiviación de moléculas de bajo peso molecular (aminoácidos, nucleótidos, etc.). Esto implica una pérdida en el sabor característico del producto. Posiblemente la ausencia de estos compuestos sea la responsable de que la vida de anaquel se prolongue hasta casi 30 d, debido a que los microorganismos responsables del deterioro usan como sustrato dichos compuestos.

Bajo las condiciones ensayadas se determinó que el valor de K_i es el adecuado para cuantificar la frescura del producto, esto porque presenta una correlación aceptable con el tiempo de almacenamiento.

Como índice de deterioro se sugiere el uso de la concentración de TMA-N o la proporción de hipoxantina. Ya que ambos presentan un incremento gradual durante el almacenamiento a 0°C.

La concentración inicial de BVT-N en músculo de camarón es alta, debido a esto el límite máximo permisible por la NOM se rebasa al día 6, cuando la calidad sanitaria del producto es aceptable. Por lo anterior es necesario que se modifique la dicha norma, ya que se podría rechazar producto de manera equivocada, afectando así los intereses económicos de los integrantes de la cadena productiva del camarón.

IV. CAPÍTULO 2

“Efecto del almacenamiento bajo condiciones óptimas de refrigeración (0°C) en la textura de la carne cruda y cocida del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*)”

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 MÚSCULO DE ORGANISMOS MARINOS

Un gran número de funciones fisiológicas son realizadas por músculo, dichas funciones son muy diversas entre sí. A pesar de ello, es evidente que todos los músculos involucran una interacción entre filamentos que contienen miosina y actina, ello gracias a una hidrólisis del ATP. Los filamentos pueden variar en su arreglo e incluso en el tipo de proteínas del que estén compuestos, en la Figura 15 se muestra la estructura jerárquica de un haz muscular. Los tejidos musculares en vertebrados se dividen en dos grupos: liso y estriado; este último se subdivide en cardiaco y esquelético (Bagshaw, 1982).

Por otro lado, se sabe que los invertebrados además de presentar músculo estriado y liso, presentan un tercer tipo que es el oblicuo. Basándose en observaciones microscópicas en posición transversal del músculo estriado, tenemos que se subdivide en dos tipos: con líneas Z continuas (similar a vertebrados) y con líneas Z discontinuas (éste último en ocasiones se confunde con el estriado oblicuo). Hablando del músculo liso, el de invertebrados difiere considerablemente del presente en vertebrados, además de que algunos tipos de células presentan un patrón ultraestructural intermedio entre el transversal estriado y el estriado oblicuo, o entre el oblicuo estriado y el liso (Royuela y col., 2000).

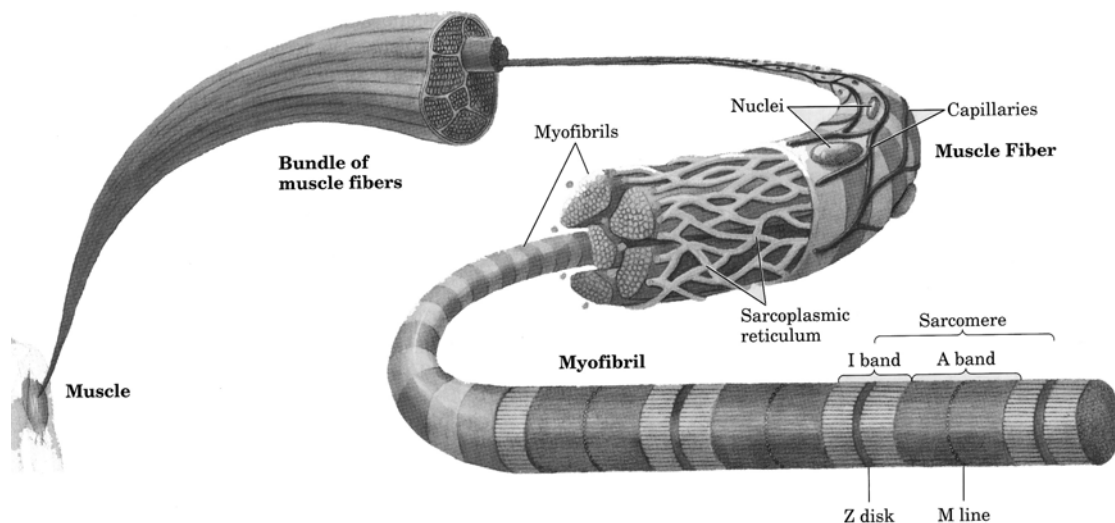


Figura 15. Estructura jerárquica de un haz muscular (Nelson y Cox, 2000)

En general, los músculos están compuestos de varios tipos de proteína: las del sarcoplasma, destinadas para las funciones celulares; las miofibrilares, responsables de la contracción; las conectivas, responsables de la integridad del músculo. Ejemplo de las presentes en el sarcoplasma, tenemos a las enzimas responsables de la oxidación de la glucosa. Miosina, paramiosina, actina, titina y conectina son ejemplo de proteínas miofibrilares. Las proteínas conectivas más comunes son el colágeno y la elastina (Sikorski *et al.*, 1990a).

4.1.2 CAMBIOS POST MORTEM QUE AFECTAN A LA ESTRUCTURA MUSCULAR

Los cambios post mortem, involucran algunos componentes de los tejidos, principalmente las proteínas, con esto no es extraño las modificaciones

estructurales del músculo. El proceso catabólico inicia en un animal recién muerto, el cual tiene la carne flexible, poco firme y elástica. Posteriormente se torna rígida, dura e inextensible, este fenómeno se conoce como rigor mortis, este endurecimiento es un signo seguro de frescura. Tras la resolución de rigor mortis, después de varias horas, la carne gradualmente se vuelve a tornar suave y flexible, pero ya incapaz de responder a estímulos eléctricos.

El rigor mortis se da por el enlace de las cabezas de miosina del filamento grueso con los centros de la actina del filamento delgado. En la figura 16 podemos observar el músculo antes del rigor mortis y durante el mismo. Una vez unidas la miosina y actina, se forma una estructura rígida por los filamentos entrecruzados. La resolución ocurre a causa de la acción de proteinasas, las cuales rompen los enlaces peptídicos de los aminoácidos, ocasionando una desestabilización de las proteínas. La intensidad de estos cambios degradativos incrementa con la edad cronológica del producto (Sikorski *et al.*, 1990b).

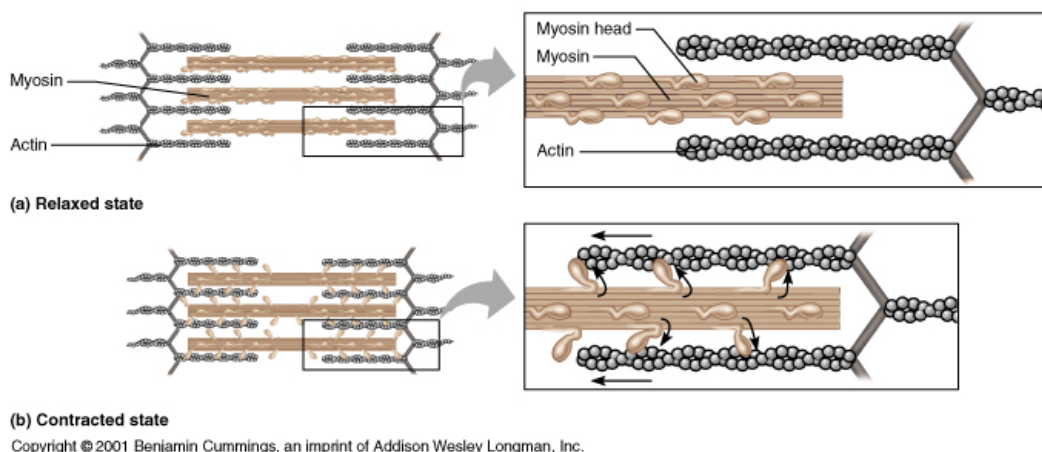


Figura 16. Estado muscular relajado (inmediatamente después de la muerte) y estado muscular contraído (*rigor mortis*) (Marieb, 2003)

4.1.3 CONCEPTOS DE TEXTURA

El sabor, la apariencia y la textura son los tres mayores componentes de la aceptabilidad de un alimento (Bourne, 1978). En estudios más recientes se incluye el valor nutricional como un cuarto componente, debido a la preocupación del consumidor por su salud. Otros factores como el costo, conveniencia y el empackado también son importantes pero no son considerados factores de calidad de un alimento (Bourne, 2002).

Szczesniak (1963) encontró que las características que determinan la textura de un alimento pueden agruparse en tres clases principales: 1) mecánicas 2) geométricas y 3) otras características, donde se incluyen principalmente la humedad y el contenido lipídico.

Bourne (2002), por su parte propone que el término textura no debe ser utilizado, ya que infiere un solo parámetro; en su lugar debería ser utilizado “propiedades texturales”. Estas se definen como: “las propiedades que son detectadas principalmente por el sentido del tacto, están relacionadas con la deformación, desintegración y flujo del alimento bajo una fuerza, y son medidas objetivamente por funciones de masa, tiempo y distancia”.

Los análisis con texturómetros ofrecen la posibilidad de generar curvas donde se evalúan la fuerza y el tiempo. Con estas gráficas es posible obtener siete parámetros de textura:

- ❖ **Fracturabilidad:** Es definido como la fuerza necesaria para obtener un primer rompimiento significativo en la curva.
- ❖ **Dureza:** Es definido como el pico de fuerza durante el primer ciclo de compresión (es el equivalente a la primera mordida).
- ❖ **Cohesividad:** Se define como la relación de la fuerza positiva de la segunda compresión entre la de la primera.
- ❖ **Adhesividad:** Es la fuerza negativa para la primera mordida, representando el trabajo necesario para retirar el émbolo de compresión desde la muestra.
- ❖ **Elasticidad:** Es la altura que recobra el alimento durante el tiempo que transcurre entre el fin de la primera mordida y el inicio de la segunda.
- ❖ **Gomosidad:** Es el producto de la dureza por la cohesividad.
- ❖ **Masticabilidad:** Es el producto de la gomosidad por la elasticidad. (Bourne, 1978)

Existe una larga historia de esfuerzos para medir la textura por métodos instrumentales; siendo los trabajos de Lipowitz en 1861 los primeros reportes acerca del tema (Bourne, 1978). Los equipos utilizados para la medición de los parámetros relacionados con la textura son:

- ❖ **Penetrómetros:** basados en el principio de penetración del material a probar mediante una sonda en forma de cono o tipo vara y midiendo la

fuerza aplicada o la profundidad de la penetración; a mayor fuerza, mayor la resistencia del material. Sirve para medir la firmeza.

- ❖ **Compresímetros:** mide la resistencia de los alimentos a la compresión. Se puede medir tanto la fuerza necesaria para crear una deformación, o medir la deformación causada por una fuerza dada.
- ❖ **Dispositivos de corte:** empleados para alimentos sólidos, pueden ser de hoja simple o de varias hojas. Mide la suavidad de un alimento. Algunas variantes utilizan hojas tipo cuchillo para alimentos fibrosos.
- ❖ **Masticómetros:** diseñados para medir las propiedades de textura bajo condiciones aproximadas a las de la masticación.

4.1.4 PROCESOS TÉRMICOS

Las características sensoriales de los productos marinos les imparten la propiedad de ser muy versátiles de consumir; las principales presentaciones son crudos y cocidos. El procesamiento térmico es una de las técnicas más importantes y comunes, tanto en la industria de los alimentos como en las prácticas culinarias. Los principales objetivos de estos tratamientos son la preservación y generar características aceptables para el consumidor (Singhal, 1997c).

Durante el tratamiento térmico de un alimento se suscitan cambios en las moléculas, estos dependerán de su tipo y concentración. Dichos cambios impactarán en el valor nutricional, la textura, el sabor y el olor del platillo a consumir. La combinación temperatura-tiempo es importante, ya que un exceso

puede promover reacciones químicas que generen compuestos indeseables; tal es el caso de las reacciones de Maillard, las cuales ocurren entre los grupos amino y carbohidratos reductores (Badui, 1995). Las proteínas se coagulan (desnaturalizan), perdiendo así propiedades funcionales como lo son: el ligado de iones (Ca^{+2} , Mg^{+2} , PO_4^{-2}) y la retención de agua. Las enzimas pierden solubilidad y actividad. Los aminoácidos libres se pierden, modificando el sabor del producto (Nack y Artyukhova, 1990).

4.2 HIPÓTESIS

Durante el almacenamiento a 0°C la estructura muscular se modifica, lo cual se refleja en la textura de la carne de camarón. Es posible evaluar estos cambios tanto por medios físicos y microscópicos, ya que ambos poseen una correlación estrecha.

4.3 OBJETIVOS

4.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar por medio de herramientas físicas y microscópicas el cambio en la textura de la carne cruda y cocida del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) cuando el camarón es almacenado bajo condiciones óptimas de refrigeración (0°C).

4.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ➊ Evaluar la capacidad de retención de agua y el rendimiento de la carne cruda y cocida del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) cuando el camarón es almacenado bajo condiciones óptimas de refrigeración (0°C).
- ➋ Evaluar el cambio del esfuerzo al corte, la dureza y fracturabilidad de la carne cruda y cocida del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) cuando el camarón es almacenado bajo condiciones óptimas de refrigeración (0°C).
- ➌ Evaluar el cambio en la estructura microscópica de la carne cruda y cocida del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) cuando el camarón es almacenado bajo condiciones óptimas de refrigeración (0°C).

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 CARACTERÍSTICAS Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para este experimento se utilizaron camarones cultivados comercialmente en granjas camaronícolas ubicadas en Tastiota, Sonora. Los especímenes cosechados tenían un peso promedio de 28.95 ± 3.66 g. Los organismos fueron obtenidos durante las operaciones de cosecha comercial; al salir del estanque se depositaron en un baño de agua y hielo para su sacrificio. Finalmente los camarones se transportaron al laboratorio en hieleras con hielo potable molido ($0.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$). Estas condiciones de almacenamiento se mantuvieron durante todo el experimento. Diariamente se muestrearon al azar algunos camarones para inspeccionar los cambios en la apariencia y el olor.

Para los análisis se tomaron 40 camarones como muestra, se pesaron, y se calculó el rendimiento de la carne cruda utilizando la relación entre el peso final y el inicial. Para evaluar el efecto del almacenamiento sobre la carne cocida se hirvieron veinte camarones en agua (7 mL por gramo) durante dos minutos (Tseng *et al.*, 2003). Posteriormente fueron enfriados con agua fresca. Se removió el exoesqueleto tanto de los camarones crudos como de los cocidos y se tomó el abdomen para los análisis de textura e histología. El rendimiento del cocido se calculó usando la relación entre el peso de la carne cocida y cruda.

4.4.2 ANÁLISIS DE TEXTURA

La textura fue evaluada en un texturómetro universal (modelo 132, serie 125, Instron, Inc., Canton, MA) (ver Figura 17). El **esfuerzo al corte** fue evaluado usando una celda de corte tipo Warner-Bratzer unida a la celda de 50 kg (Prusa, *et al.*, 1982; Zhang y Mittal, 1993). Para imitar la mordida humana el abdomen del camarón se cortó transversalmente entre el tercer y cuarto somite, la velocidad de corte fue de 10 cm/min. El primer pico de fuerza mayor fue tomado como la máxima fuerza de corte requerida para cortar la muestra muscular.



Figura 17. Texturómetro universal

La **dureza** y la **fracturabilidad** fueron medidas usando el análisis de perfil de textura, de acuerdo a Bourne (1978). La muestra usada para esta prueba fue el

segmento con el primer y segundo somite del camarón. La muestra fue comprimida en un 75% de la altura original (aproximadamente 1.45 cm). El protocolo usado fue el de doble mordida. El primer pico de fuerza registrado se tomó como valor de la fracturabilidad y el pico mayor fue registrado como dureza.

La capacidad de retención de agua (CRA) fue medida por centrifugación (Cheng, *et al.*, 1979). El quinto y sexto segmento abdominal fueron cortados longitudinalmente, cada uno se tomó como réplica de la prueba. Cada segmento se secó con toallas de papel y fue pesado (P_i), posteriormente se colocaron en tubos para centrífuga; las muestras fueron centrifugadas a 28000 g, a 4°C durante 30 min. Los segmentos tratados fueron removidos con pinzas, se secaron con toallas de papel y el peso final fue registrado (P_f). La CRA fue calculada como porcentaje usando la Ecuación 7:

$$\%CRA = \left(1 - \frac{P_f - P_i}{P_i}\right) \times 100 \text{ (Ec. 7.)}$$

4.4 3 HISTOLOGÍA Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

El tercer somite (n = 6 por tratamiento) fue cortado y fijado en solución Davidson (ver Anexo I), posteriormente el tejido fue deshidratado. Aclarado e incluido en parafina (ver Anexo II), cada bloque de parafina fue cortado con un microtomo. Los cortes de 3 μ m de espesor se tiñeron con la técnica tricrómica de Masson (ver Anexo V) (Sheehan y Hrapchak, 1973). Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico (modelo BX50, Olympus Co., Tokio, Japón). Las microfotografías fueron tomadas al azar con una cámara digital (CoolSnap-

Pro, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EUA) conectada a una computadora personal. Se hizo un análisis de imagen de cada fotografía con el software Image-Pro Plus versión 4.5.19 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EUA). Se identificaron y calcularon las áreas oscuras y brillantes; los resultados fueron expresados en porcentajes del área total.

4.4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para los análisis estadísticos de las variables medidas se utilizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). Las comparaciones post-hoc se realizaron con la prueba de Diferencia Mínima Significativa (LSD) ($\alpha=0.05$). Los análisis de regresión fueron hechos para determinar la posible relación entre los resultados de textura y los microscópicos. El software estadístico usado para procesar los datos fue el STATGRAPHICS Centurión XV (StatPoint, Inc., 2005).

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1 PESO Y RENDIMIENTO DE LA COCCIÓN

Después de la inspección diaria del olor y la apariencia de cada muestra seleccionada, los olores indeseables fueron detectados a los 19.5 d de almacenamiento a 0°C, por lo tanto, la vida de anaquel del camarón completo en almacenamiento fue de 18.5 días.

Durante el almacenamiento del camarón se observó un incremento en el peso (Figura 18). La absorción de agua por el tejido muscular (ósmosis) fue observada como un resultado de las diferencias de concentración de los solutos entre el hielo y el músculo del camarón. El coeficiente de correlación ($r = -0.891$) entre los rendimientos de los crudos y los cocidos sugiere que el agua ganada durante el almacenamiento se perdió durante la cocción. Este hecho fue observado en otros decápodos tales como: *Macrobrachium rosenbergii* (Srinivivasan *et al.*, 1998) y *Cherax quadricarinatus* (Kong *et al.*, 2006).

4.5.2 ANÁLISIS DE TEXTURA EN LA CARNE DE LOS CAMARONES CRUDOS

Para cualquier alimento, los métodos de preservación y procesado son importantes debido a que tienen un efecto significativo en las características finales del alimento (Santos-Yap, 1995). El esfuerzo al corte en la carne cruda permanece sin cambios por 2.5 d, después de este tiempo, se estableció una rigidez progresiva hasta los 13.5 d, después de esto el músculo se suavizó

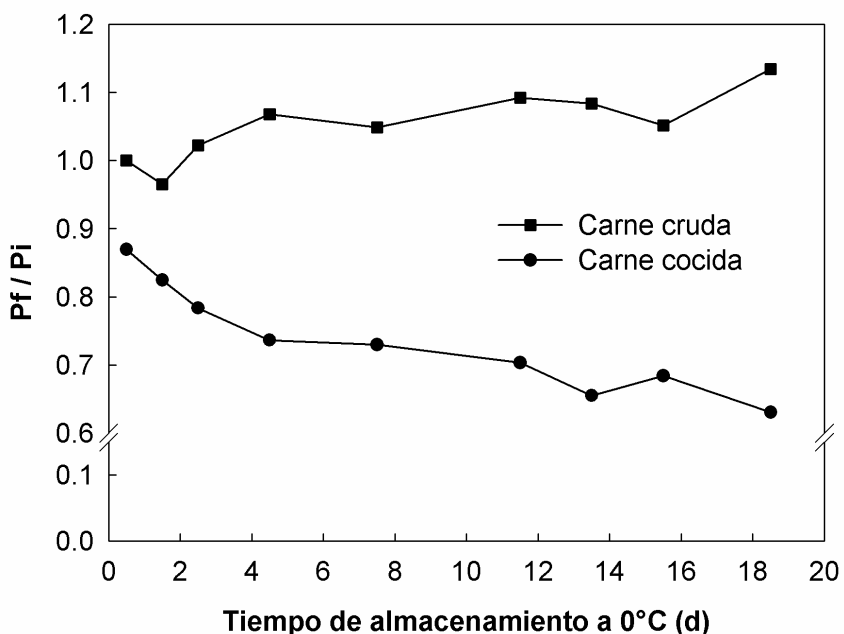


Figura 18. Efecto del tiempo de almacenamiento a 0°C en el rendimiento del camarón crudo y cocido

(Figura 19). El primer cambio puede ser atribuido a la agregación de las proteínas y el segundo a hidrólisis ligera de proteínas. La fracturabilidad demostró que la capa muscular externa no fue modificada. Sin embargo, durante el almacenamiento en hielo se observó un incremento en la dureza, por lo tanto, la carne de camarón cruda tiende a presentar resistencia durante el masticado (Bourne, 2002). La modificación en la capacidad de retención de agua estuvo influenciada por dos factores: a) la absorción de agua durante el tiempo de almacenamiento y b) la pérdida en la funcionalidad de las proteínas por la agregación y desnaturalización (Xiong, 1997). La reducción en la capacidad de retención del agua ayuda a explicar el cambio en la textura. En la Tabla II, se presenta el análisis del coeficiente de correlación de las propiedades de la textura.

Se observó una buena correlación entre la dureza y la fracturabilidad ($r=0.83$), la capacidad de retención de agua ($r=-0.77$) y el rendimiento en la cocción ($r=0.84$). Los datos de las dos últimas propiedades presentaron una alta correlación ($r=-0.92$).

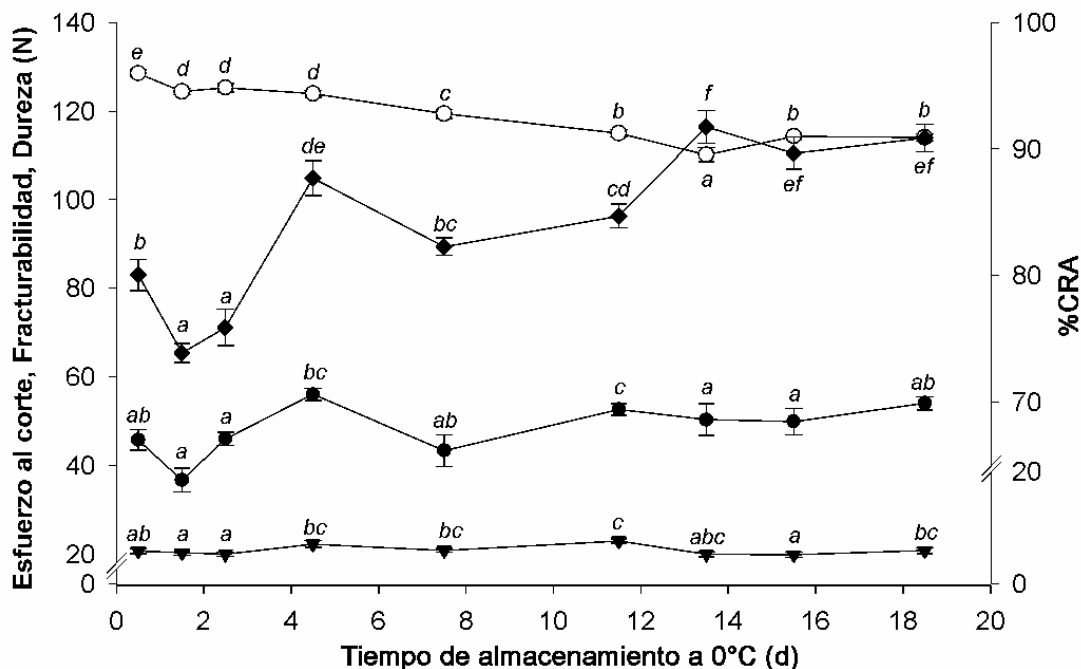


Figura 19. Efecto del tiempo de almacenamiento a 0°C en la textura cruda de camarón patiblanco almacenado a 0°C. Esfuerzo al corte (▼), Fracturabilidad (●), Dureza (◆), %CRA (○). Las barras representan error estándar, las letras diferentes representan diferencias significativas entre muestreos

Tabla II. Coeficiente de correlación (r) entre las variables microscópicas y de textura medidas en el músculo de camarón crudo y cocido

	Factores	% AO	EC	Dureza	Fracturabilidad	% CRA	RC
Crudo	% AO	—	—	—	—	—	—
	EC	0.75	—	—	—	—	—
	Dureza	0.26	0.28	—	—	—	—
	Fracturabilidad	0.43	0.52	0.83	—	—	—
	% CRA	0.08	0.25	-0.77	-0.38	—	—
	RC	0.12	0.03	0.84	0.62	-0.92	—
Cocido	% AO		—	—	—	—	—
	EC	-0.89	—	—	—	—	—
	Dureza	-0.07	-0.16	—	—	—	—
	Fracturabilidad	-0.08	-0.24	0.87	—	—	—
	% CRA	0.90	-0.86	0.02	0.20	—	—
	RC	0.61	-0.87	0.55	0.57	0.58	—

Los números en negritas indican un coeficiente de correlación significativo entre los factores

AO = Área Oscura

EC = Esfuerzo al Corte

CRA = Capacidad de Retención de Agua

RC = Rendimiento de la cocción

4.5.3 ANÁLISIS DE LA TEXTURA EN LA CARNE DE LOS CAMARONES

COCIDOS

La textura de la carne de los camarones cocidos presentó valores más altos que los observados en la carne cruda (Figura 20). La rigidez de esta carne es consecuencia de la coagulación, desnaturalización y compactación de la proteína muscular por el calentamiento (Milewzski, 2001). A los 18.5 días el esfuerzo al corte se redujo en 60%. Esto sugiere una pérdida de la firmeza, dando como resultado una textura arenosa, lo que concuerda con resultados observados en *Macrobrachium rosenbergii* (Nip y Moy, 1988). Los valores de dureza y fracturabilidad sugieren que el almacenamiento en hielo produce una carne más dura. Durante la cocción las proteínas se desnaturalizaron, perdiendo la capacidad de unir agua, debido a esto la CRA no es una buena propiedad para describir la textura en la carne cocida.

Se observó una correlación significativa en el esfuerzo al corte con la CRA y el rendimiento de la cocción, así como entre la dureza y la fracturabilidad (Tabla II). Resultados similares fueron observados en *Cherax quadricarinatus* (Kong *et al.*, 2006), *Panulirus polyphagus* (Fatima y Qadri, 1985), y *Macrobrachium rosenbergii* (Nip y Moy, 1988; Xiong, *et al.*, 2002).

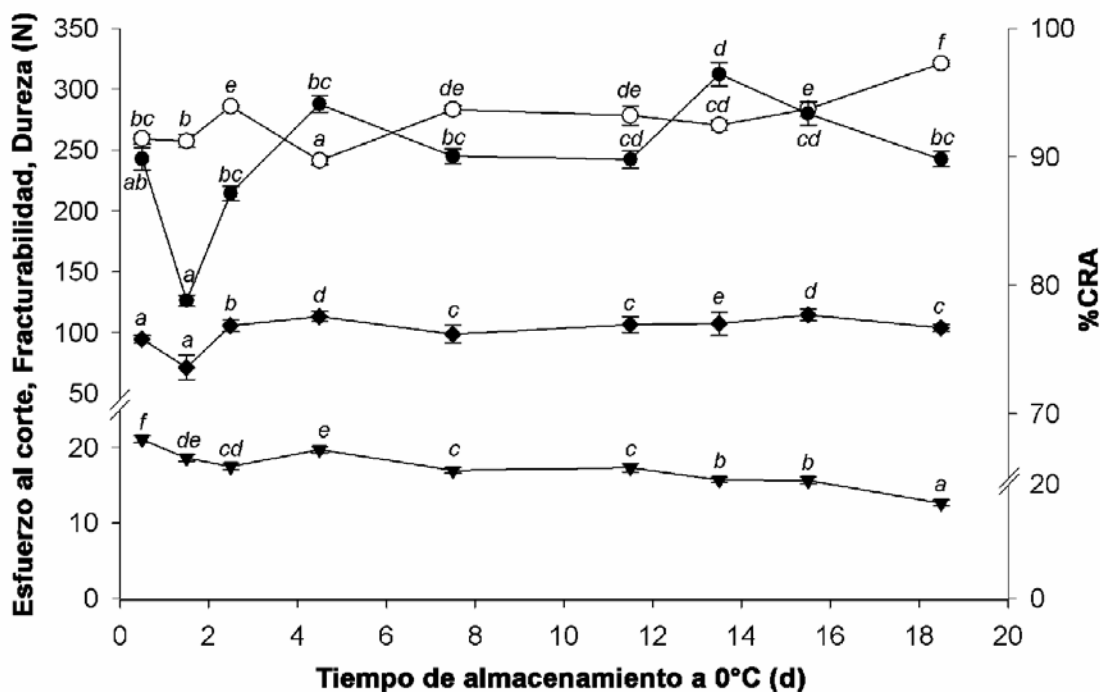


Figura 20. Efecto del tiempo de almacenamiento a 0°C en la textura cocida de camarón patiblanco almacenado a 0°C. Esfuerzo al corte (▼), Fracturabilidad (●), Dureza (◆), %CRA (○). Las barras representan error estándar, las letras representan diferencias significativas entre muestreos

4.5.4 ANÁLISIS MICROSCÓPICOS

Con el análisis de imágenes de los cortes histológicos, se observaron dos tipos de vistas de los sarcómeros: transversal (Figuras 21A y 21C), y longitudinal (Figuras 21B y 21D). Cada disposición de los sarcómeros ofrece diferente resistencia al corte o compresión. Para observar y calcular las proporciones de cada uno, se construyó una imagen de la vista transversal del abdomen del camarón (Figura 22), se analizó la imagen y se observaron 4 secciones. En las secciones 1, 3 y 4 se observó la vista transversal, las cuales al ser sumadas representaron el 64.15% del área total.

La sección 2 mostró vistas longitudinales, que representaban en 35.85% del área total. Debido a lo anterior, se escogieron las vistas transversales para cuantificar la proporción del área oscura como un indicador de la firmeza.

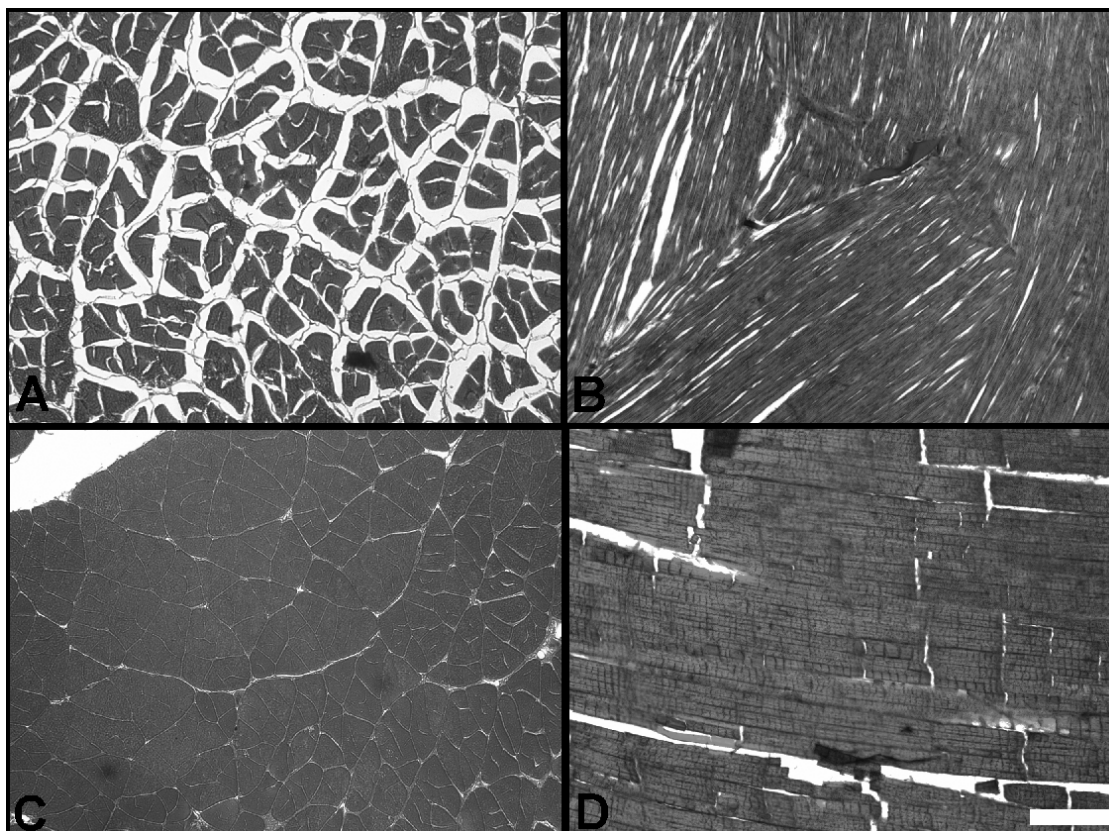


Figura 21. Vista transversal (A, C) y longitudinal (B, D) del músculo crudo (A, B) y cocido (C, D) de camarón patiblanco. La barra blanca representa 200 μ m

La Figura 23 muestra algunas fotos representativas usadas en el análisis de imágenes. Fue observado un incremento en el área blanca entre las fibras musculares; probablemente esta es una señal visual de la desnaturalización de las proteínas. Por otro lado, el músculo de camarón cocido presentó compactación de las fibras musculares; probablemente este fue el resultado de los cambios conformacionales de las proteínas con el calentamiento. Reportes previos en

Macrobrachium rosenbergii mostraron que durante el enfriamiento en hielo, las fibras musculares fueron degradadas gradualmente y finalmente fueron separadas por una desintegración paulatina del perimysium y el endomysium (Nip y Moy, 1988).

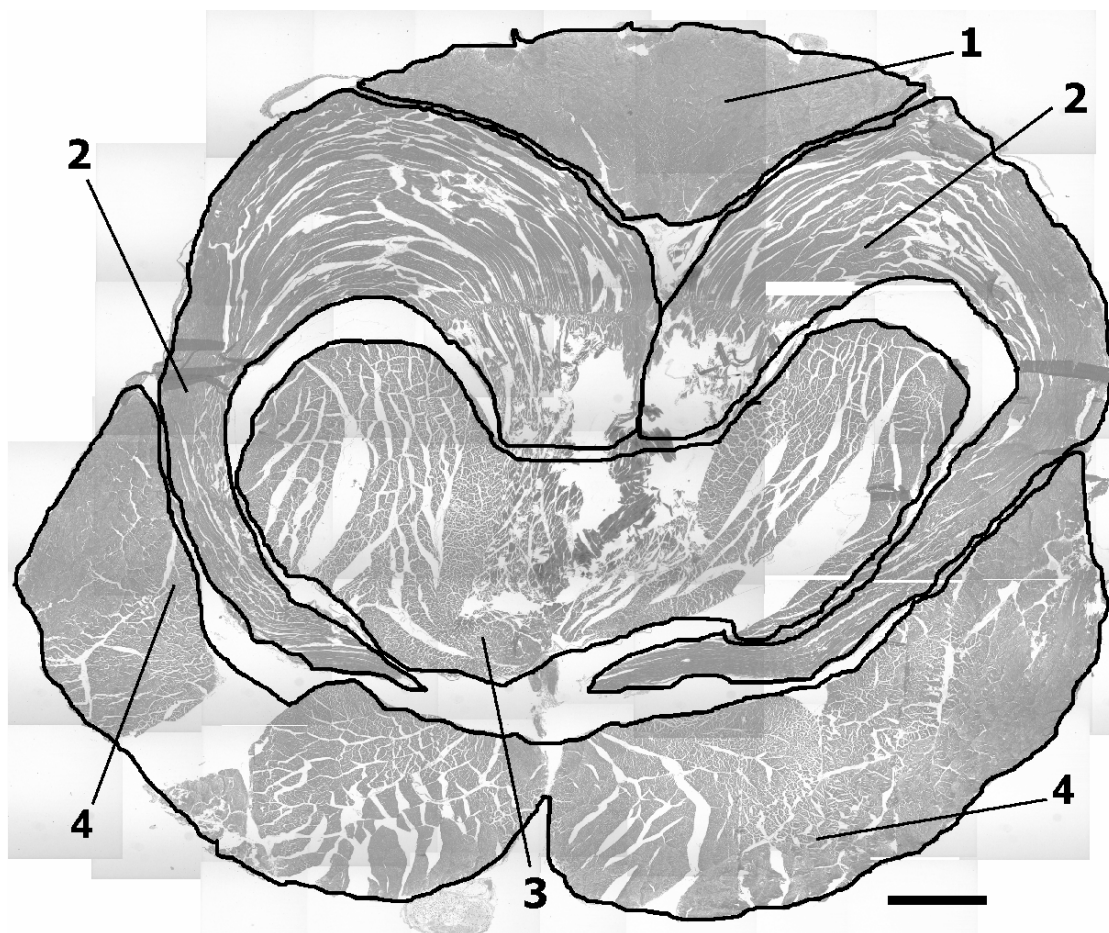


Figura 22. Corte transversal del abdomen del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*). Los números muestran las cuatro secciones observadas. La escala representa 1 mm

Se encontró un coeficiente de correlación significativo entre el esfuerzo al corte de las carnes cruda y cocida (Tabla II). Por lo tanto, el análisis microscópico

solo podrá empelarse para predecir la firmeza en ambas presentaciones.

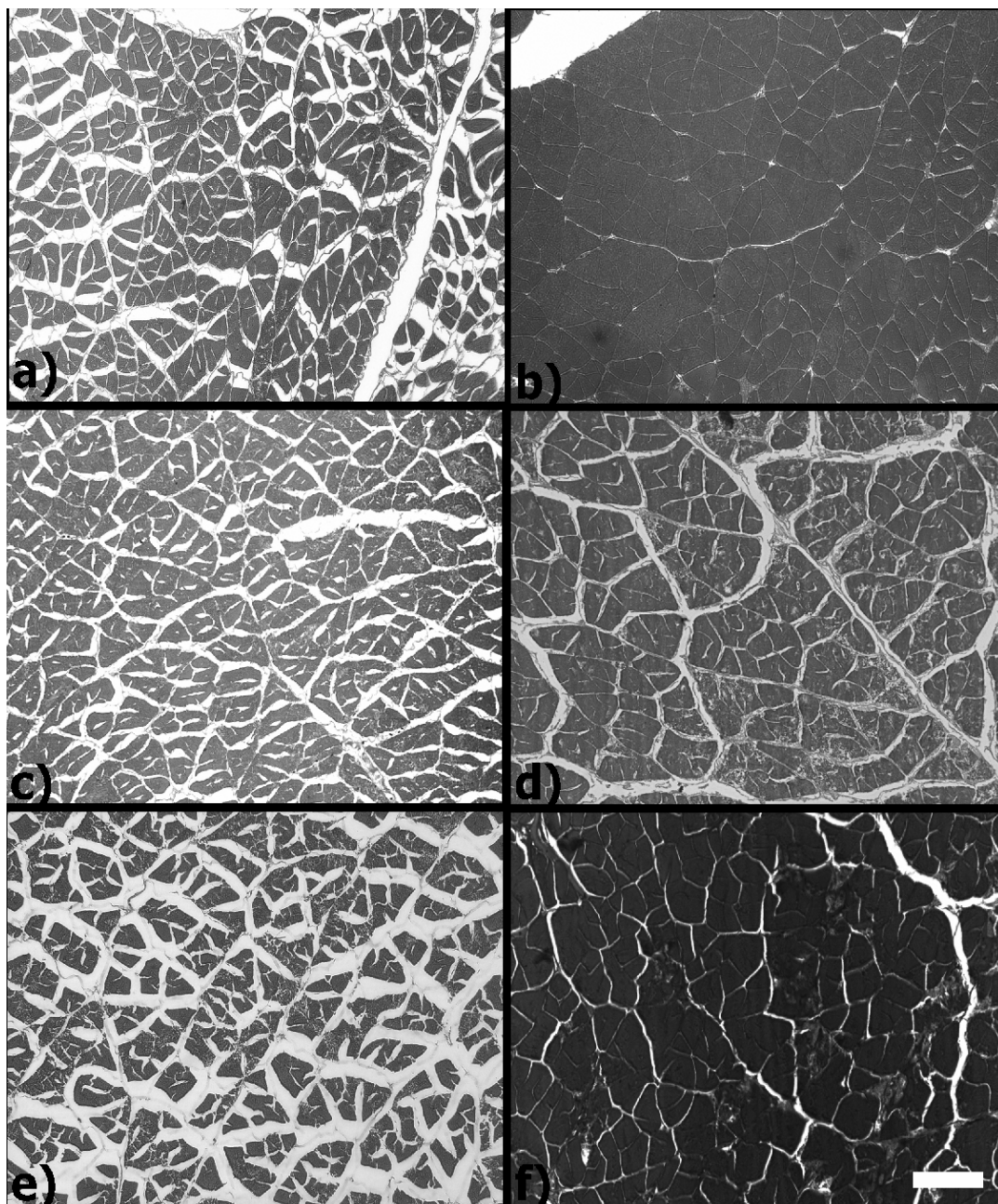


Figura 23. Fotografías representativas del análisis de imágenes del músculo cocido y crudo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) durante el almacenamiento a 0°C. a, c y e muestran al músculo crudo a los días 0.5, 7.5 y 18.5 respectivamente. b, d y f muestran al músculo cocido a los días 0.5, 7.5 y 18.5 respectivamente. La escala representa 200 μm .

4.5.5 MELANOSIS

A las 36 horas se presentaron puntos amarillos en las branquias de algunos especímenes. Este es el inicio de un fenómeno post mortem llamado melanosis. Después de 4 días todos los camarones presentaban puntos negros en el cefalotórax. La melanosis es un oscurecimiento enzimático causado por la catálisis de enzimas endógenas: polifenoloxidasas (PPO) ó 1, 2 benzenediol-oxígeno oxidoreductasa (EC 1.10.3.1). Dado que el sabor, olor, calidad nutricional y las características de sanidad son insignificativamente cambiadas, solo la apariencia puede afectar la aceptación. Este inconveniente podría ser evitado usando algún tratamiento químico o enzimático (Kim *et al.*, 2000).

4.6 CONCLUSIONES

La carne del camarón patiblanco es comestible hasta los 18.5 días si es almacenado en hielo. De acuerdo con las características visuales, de olor y textura, la mejor calidad de la carne se mantiene hasta los 2.5 días, después de este tiempo se desarrollan notables cambios, principalmente en la apariencia y la textura. Los análisis de textura o microscópicos podrían ser usados para evaluar firmeza tanto en carne cruda como en cocida. Con estos resultados los productores y distribuidores podrán estar en un balance económico para definir sus tiempos “óptimos” de almacenaje.

V. CAPÍTULO 3

“Efecto de la congelación y descongelación en la textura de la carne cruda y cocida del camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*).”

5.1 INTRODUCCIÓN

5.1.1 CONGELACIÓN

El hombre a través del tiempo se ha preocupado por producir alimentos para cubrir sus necesidades, sin embargo en ocasiones la producción se realiza en exceso por lo que se ve en la necesidad de almacenarlo. La mayoría de los alimentos tienen una actividad de agua alta, ésta característica los hace susceptibles al deterioro por actividad microbiana o por actividad de enzimas endógenas (Badui, 1995).

Una de las estrategias más usadas en la tecnología de alimentos es la disminución de la temperatura. El rol de la temperatura en la estabilidad de los sistemas biológicos es un factor clave, ya que en general la velocidad de reacción incrementa conforme lo hace la temperatura. El descenso de la temperatura por si mismo reduce la velocidad de reacción relacionada con muchos procesos importantes; la presencia del hielo en los sistemas congelados implica que la concentración de agua en las fases no congeladas es reducida. La disminución de la actividad de agua es un factor que hace al alimento menos susceptible al deterioro por actividad microbiológica (Reid, 1997).

La refrigeración y la congelación se cuentan entre los métodos más antiguos de conservación de alimentos. La refrigeración maneja un rango de temperatura de 15°C a -2°C, mientras que la congelación trabaja con temperaturas menores a -2°C. A pesar de que el agua pura se congela a 0°C, la concentración

de solutos en un alimento bajan el punto de congelación, haciendo que se congele a temperaturas inferiores (Potter, 1978).

La congelación es un excelente proceso para preservar la calidad de los productos pesqueros por largos periodos de tiempo (Santos-Yap, 1995) y ha sido utilizada desde hace mucho tiempo. En las primeras décadas del siglo XX, Clarence Birdseye observó que los productos pesqueros y carnes que se congelaban en el invierno ártico tenían mejor sabor que aquellos que eran congelados en primavera en lugares con climas menos fríos. De esta observación desarrolló un proceso que él llamó “la máquina de congelación rápida”, dando origen a la era moderna de la congelación (Hedges *et al.*, 2002).

5.1.2 ETAPAS DE LA CONGELACIÓN

5.1.2.1 Desplazamiento de calor

Congelar un alimento implica la remoción de calor acompañada por un cambio de fase del agua contenida en él. La velocidad a la cual el calor puede ser removido es función de muchos factores, los cuales pueden ser agrupados de manera general en dos categorías; la primera comprende factores intrínsecos del objeto a ser congelado, los cuales incluyen el tamaño del objeto, el área superficial y las propiedades térmicas internas. La segunda categoría abarca los factores característicos del sistema de congelación como la temperatura del medio de transferencia de calor y el coeficiente de transferencia de calor entre el medio refrigerante y el objeto a ser congelado (Reid, 1997). Por ejemplo, la solidificación

completa de la fase líquida en músculo de bacalao (*Gadus spp.*) se lleva a cabo alrededor de -70°C (Sikorski y Kolakowska, 1990).

5.1.2.2 Cambios de fase

El calor que debe ser removido del alimento a congelar tiene dos fuentes: el calor **sensible**, o calor específico, asociado con la reducción de la temperatura y refleja cinética molecular; la segunda fuente de calor está asociada con los cambios de fase. Estos cambios no están necesariamente asociados a la temperatura, de hecho en un material puro los cambios de fase se llevan a cabo a temperatura constante. Este calor se conoce como calor **latente**. Ambos deben ser considerados a la hora de calcular las variables relacionadas con la congelación (Reid, 1997). La velocidad de disminución de la temperatura cambia con el tiempo debido al hecho de que la mayoría del calor latente de cristalización es removido en el rango de -1 y -5°C y que la difusividad térmica incrementa debido a la formación de cristales de hielo (Sikorski y Kolakowska, 1990).

5.1.2.3 Nucleación

Desde el punto de vista termodinámico el equilibrio de la fase líquida (agua) y la fase sólida (hielo) se da a los 0°C , por lo que debajo de esa temperatura solo debería haber hielo. Sin embargo, los procesos de congelación no se encuentran sólo bajo el control termodinámico. Antes de que el hielo pueda formarse se requiere que exista una semilla, un núcleo, a partir del cual los cristales pueden crecer; a este fenómeno se le conoce como **nucleación** (Reid, 1997). La

nucleación homogénea (o espontánea) a partir de agua líquida superenfriada no se lleva a cabo hasta llegar a una temperatura cercana a los -40°C (Sahagian y Goff, 1996; Reid, 1997)

5.1.2.4 Propagación

Una vez que la nucleación ha actuado entonces los cristales pueden crecer y propagarse, pero dado que hay liberación de calor asociado al cambio de fases, el crecimiento puede no ser instantáneo. El crecimiento puede ser controlado por la velocidad de remoción de calor y por la velocidad resultante de avance de la isoterma del punto de congelación (Sahagian y Goff, 1996; Hedges *et al.*, 2002). La transferencia de calor, sin embargo, no es el único factor que puede influenciar la velocidad de propagación del hielo; si el hielo cristaliza a partir de una solución, el soluto puede ser desplazado del lugar ocupado por el hielo, por lo tanto, en la propagación existe una transferencia de masa: el agua puede difundir hacia el hielo y los solutos desplazarse desde la superficie del cristal (Reid, 1997; Badui, 1995). Este fenómeno tiene grandes consecuencias en las características finales del alimento.

5.1.2.5 Velocidad de congelación

Como en cada caso anterior, esta variable depende de muchos factores. En términos generales se acepta que la velocidad de congelación puede dividirse en tres rangos: de 1 cm/h o menor (**velocidad lenta**), de 1-3 cm/h (**velocidad media**) y de 3 en adelante (**velocidad rápida**) (Potter, 1978; Mogens, 1984). Las

velocidades más altas aseguran una mejor calidad del producto, sin embargo, el costo implícito en estos procesos es muy alto. Haciendo un balance entre la calidad deseada y el costo, las velocidades medias (1-3 cm/h) presentan el mejor rendimiento manteniendo una calidad alta manteniendo un costo rentable para el proceso (Potter, 1978).

5.1.2.6 Migración de la humedad y recristalización

La migración de la humedad es el principal cambio físico que ocurre en los productos congelados y tiene grandes efectos sobre las propiedades químicas y bioquímicas del alimento; se manifiesta en varias formas: pérdida de humedad por sublimación, reabsorción y redistribución de la humedad en los alimentos o sus componentes, recristalización del hielo y exudación de líquido durante la descongelación (Pham y Mawson, 1997). En filetes de pescado, al inicio se utilizaba un proceso llamado glaseado (se rociaba el filete congelado con agua varias veces para que éste quedara protegido por sucesivas capas de hielo) para evitar la deshidratación; en la actualidad se utilizan envolturas impermeables para este fin (Gorga y Ronsivall, 1988).

La pérdida de humedad de los alimentos es importante y ha recibido mucha atención, sobre todo por las pérdidas económicas que conlleva. Las pérdidas de peso típicas durante el procesamiento convencional de la carne, por ejemplo, van de 1-2% durante el enfriamiento, 1% en la congelación y 0.5% por mes en el almacenamiento y transporte, a menos que el producto sea empacado en una película impermeable. Por otro lado, el aseguramiento de la calidad y sanidad del

alimento está basado en algún grado de pérdida de humedad. Por ejemplo, en el enfriamiento de la carne es necesario un poco de secado en la superficie para prevenir el crecimiento microbiano (por la reducción de la actividad de agua superficial), así como evitar la apariencia de cristal cuando la carne es congelada (Pham y Mawson, 1997).

La recristalización es el proceso por el cual los cristales de hielo aumentan en tamaño y disminuyen en número debido a la redistribución del agua desde los cristales pequeños hacia los grandes (Sahagian y Goff, 1996; Hedges y Nielsen, 2000). En productos como los helados, tejidos vegetales y postres congelados la recristalización puede tener un efecto importante sobre la apariencia y la textura. Durante la congelación algunos productos son susceptibles a un defecto de apariencia conocido como quemadura por congelación, la prevención suele llevarse a cabo de la misma forma que la deshidratación: glaseado o envolturas adecuadas (Rehbein, 2002). El fenómeno está relacionado con la pérdida de humedad, aunque no de una forma directa; la causa es la formación de pequeñas cavidades justo debajo de la superficie por sublimación del hielo, las cuales refractan la luz (Pham y Mawson, 1997).

5.1.3 DESCONGELADO

El proceso de descongelado, también tiene un efecto sobre la calidad final del producto pesquero por ello debe tenerse en cuenta que la descongelación no es simplemente el proceso inverso de la congelación. El hielo y el agua tienen diferentes capacidades caloríficas, conductividad y difusividad térmica (Reid,

1997). Si la combinación congelación-descongelación no es adecuada, al final el producto podría ser totalmente rechazado o disminuiría considerablemente el precio. El color es una de las características que pueden ser afectadas. En los camarones descongelados por encima de los 0°C ocurre el oscurecimiento conocido como melanosis, debido a la exposición al aire, lo que causa oxidación (Santos-Yap, 1995).

Generalmente los productos frescos después de capturados o cosechados se procesan de alguna manera, a fin de conservar sus propiedades por más tiempo. Uno de los procesos consiste en disminuir la temperatura del medio, los tratamientos más comunes son el enhielado, la refrigeración y la congelación; si bien los tres métodos tienen la misma finalidad, el congelado es considerado como un buen método para preservar la calidad del alimento a largo plazo (Santos-Yap, 1995).

5.2 HIPÓTESIS


Durante la congelación del músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) la textura se ve afectada significativamente, por ello la velocidad de congelación tendrá un mayor impacto en la textura que la velocidad de descongelado.


5.3 OBJETIVOS


5.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios microscópicos y de textura en músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) tratado con diferentes métodos de congelación y descongelación

5.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

-  Evaluar la capacidad de retención de agua del músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) tratado con diferentes métodos de congelación y descongelación.

-  Evaluar el cambio del esfuerzo al corte, la dureza y fracturabilidad del músculo de camarón patiblanco (*L. vannamei*) tratado con diferentes métodos de congelación y descongelación.

-  Evaluar el cambio en la estructura microscópica del músculo de camarón patiblanco (*L. vannamei*) tratado con diferentes métodos de congelación y descongelación.

5.4 MATERIALES Y MÉTODOS

5.4.1 CARACTERÍSTICAS Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Los camarones patiblanco *Litopenaeus vannamei* fueron colectados de granjas comerciales ubicadas en Bahía de Kino, Sonora. El peso promedio del abdomen fue de 14.5 ± 1.7 , mientras que el peso promedio de los organismos completos fue de 27.7 ± 2.8 g.

Para el presente experimento dos variables fueron ensayadas: congelación y descongelación. Cada una contó con dos tratamientos; congelación criogénica (C) y por convección (F). Descongelado adecuado (A) (4°C por 24 h), e inadecuado (I) (25°C por 4 h).

Los especímenes para el congelado criogénico fueron tratados inmediatamente después de ser cosechados de los estanques. Los camarones fueron sumergidos, uno por uno, en nitrógeno líquido por 40 s, posteriormente transportados en hieleras con hielo seco (CO_2 sólido). Al llegar al laboratorio (4-5 h después), las muestras se empacaron en bolsas de polietileno, y se almacenaron a -80°C . Para el otro tratamiento de congelación, los especímenes que recibieron el tratamiento de convección, se transportaron en hielo molido hacia el laboratorio, una vez ahí (4-5 h después) se empacaron de acuerdo a las condiciones anteriores y se almacenaron a -20°C dentro de una cámara de congelación por convección. Las muestras se mantuvieron congeladas menos de una semana. Después de eso los camarones almacenados fueron descongelados; el exoesqueleto fue removido

manualmente para obtener el músculo del abdomen para los análisis. A fin de tener controles, se ensayaron muestras sin congelar.

5.4.2 ANÁLISIS DE TEXTURA Y CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA

Los análisis se realizaron de la misma manera que los descritos en el capítulo 2.

5.4.3 FRACCIONAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS DEL MÚSCULO

Las proteínas del músculo fueron extraídas de acuerdo al protocolo de solubilidad desarrollado por Hashimoto *et al.* (1979). Durante la extracción de proteínas se obtuvieron tres fracciones: sarcoplásmicas, miofibrilares y solubles en álcali.

La extracción de proteínas sarcoplásmicas se realizó homogeneizando 1 g de músculo de camarón con 10 mL de buffer de fosfatos A (15.6 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM KH₂PO₄, $i = 0.05$, pH 7.5). El extracto fue centrifugado a 5000 *g* por 15 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en otros 10 mL del buffer de fosfatos A, y fue centrifugado bajo las condiciones anteriores. Los sobrenadantes contenían las proteínas sarcoplásmicas, por lo que se mezclaron.

El precipitado anterior fue resuspendido en 10 mL de buffer de fosfatos B (15.6 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM KH₂PO₄, 0.45 M KCl, $i = 0.5$, pH 7.5) y fue centrifugado bajo las condiciones anteriores. El sobrenadante resultante contenía la fracción miofibrilar. Para extraer las proteínas solubles en álcali, el segundo precipitado fue tratado con 10 mL de una solución de NaOH 100 mM y

almacenado al menos 24 h a 4°C con agitación suave la separación de fases se realizó centrifugando bajo las condiciones ya descritas.

La concentración de proteína se cuantificó según Bradford (1976). Las proteínas de cada fracción se separaron por electroforesis en condiciones reductoras. Para ello se usaron geles discontinuos de poliacrilamida al 10%, (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). El ensayo de electroforesis se realizó a intensidad constante (15 mA/gel) en una unidad tipo SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instrument, San Francisco, CA). Se usaron como estándares de peso molecular bajo: fosforilasa b (97 kDa), albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa) e inhibidor de tripsina (20.1 kDa). Y como estándares de peso molecular alto: miosina (220 kDa), α_2 -macroglobulina (170 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), transferrina (76 kDa), y glutamato deshidrogenasa (53 kDa).

Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos con una solución de azul brillante de Coomasie R (0.5% de colorante, 40% de metanol, 7% de ácido acético). El exceso de colorante fue removido con la misma solución pero sin colorante. Los geles fueron escaneados y analizados con el software 1D Image Análisis (East Kodak Co., Rochester, NY).

5.4.4 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL MÚSCULO DE CAMARÓN

Los tratamientos histológicos se describieron en los capítulos 1 y 2. Los cortes se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina (ver Anexo III).

Para analizar las fotografías se usó el analizador de imágenes ya descrito con anterioridad. Se calcularon las áreas blancas, tejido muscular (rojo) y tejido conectivo (púrpura). Los resultados fueron expresados como porcentajes del área total analizada.

5.4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados usando una ANOVA con un diseño factorial de 2x2 (principal efecto 1: velocidad de congelación; principal efecto 2: velocidad de descongelación, con dos niveles cada uno). Cuando la interacción de los principales efectos no era significativa, se aplicó una ANOVA de una vía y una prueba de comparación (LSD), cuando se requirió. Las muestras de camarones no tratados (control) fueron introducidas en un nuevo diseño estadístico, donde los datos fueron analizados con Análisis de Varianza de una sola vía ($\alpha = 0.05$). El software utilizado para el análisis fue el STATISTICA versión 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.5.1 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS EN LA TEXTURA Y CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA

Las proteínas de los alimentos cambian su estructura durante cualquier tratamiento térmico. Tales cambios definen sus características finales y determinan si el método es adecuado para el producto y por lo tanto, aceptable para el consumidor. Para los parámetros de textura evaluados (esfuerzo al corte, fracturabilidad, dureza y capacidad de retención de agua), los resultados no indican interacción significativa entre los factores principales: congelado y descongelado ($P > 0.05$). Por esta razón, cada tratamiento de congelado-descongelado fue considerado como independiente. Las variables de respuesta que se afectaron significativamente fueron el esfuerzo al corte y la dureza (Tabla III). Si no se cuidan las condiciones del congelado, el producto final puede presentar alteraciones, ejemplo de ellas son la agregación de proteínas y la pérdida de agua después del descongelado, esto da como resultado un producto más duro (Sikorski and Kolakowska, 1990). Estudio realizados por Srinivisan *et al.* (1998) en *Macrobrachium rosenbergii* mostraron que el valor de esfuerzo al corte en langostinos crudos mostraba una dependencia con la presencia de exoesqueleto durante la congelación. Los camarones congelados con exoesqueleto presentaron menos cambios en la textura que los congelados sin el exoesqueleto. Ezquerria Brauer *et al.* (2003) reportó un impacto significativo del

almacenamiento en hielo molido sobre el esfuerzo al corte de músculo de camarón crudo. En el presente trabajo, la variable que más impactó en la textura del camarón fue la congelación. Independientemente del método de descongelación, el congelado criogénico dañó menos la textura del producto (Tabla III).

Tabla III. Efecto de las combinaciones de congelación y descongelación en el esfuerzo al corte, dureza, fracturabilidad y CRA en el músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*)

Tratamiento	Esfuerzo al corte (N)	Fracturabilidad (N)	Dureza (N)	CRA (%)
NT	22.7 ± 4.0 ^a	45.8 ± 10.5 ^{ab}	83.1 ± 15.8 ^a	97.2 ± 0.5 ^a
CA	31.0 ± 6.7 ^{bc}	38.8 ± 10.9 ^a	92.8 ± 19.7 ^{ab}	96.8 ± 0.8 ^a
CI	28.2 ± 5.9 ^b	46.0 ± 17.6 ^{ab}	99.2 ± 16.2 ^b	96.9 ± 0.5 ^a
FA	32.8 ± 3.4 ^c	53.2 ± 7.1 ^b	102.1 ± 10.4 ^b	95.5 ± 0.7 ^b
FI	32.2 ± 4.4 ^{bc}	51.4 ± 9.6 ^b	99.2 ± 16.6 ^b	95.1 ± 0.5 ^b

N = Newton. EC = Esfuerzo al corte, CRA = Capacidad de Retención de Agua, NT = Control, C = Criogénica, F = Convección, A = Adecuada, I = Inadecuada
Las diferencias estadísticamente significativas se indican con una letra diferente dentro de la misma columna ($P < 0.05$).

El agua puede encontrarse de dos maneras dentro de la estructura de una proteína. Puede estar unida a la proteína y no está disponible como solvente, además es altamente dependiente de las características fisicoquímicas de la proteína. La otra forma es atrapada dentro de la matriz de proteína y está afectada por la estructura de la matriz de proteína del músculo (Barbut, 1996).

Los resultados experimentales muestran que independientemente del protocolo de descongelado, la congelación criogénica mantiene intactos los valores de %CRA ($P < 0.05$), esto sugiere una ausencia de agregados protéicos y daño celular mínimo. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en estudios del camarón *Penaeus monodon* y la tilapia (*Oreochromis sp.*) (Chen y Pan, 1997; Pan y Yeh, 1993). Ellos ensayaron tratamientos de congelación similares y encontraron que la congelación con nitrógeno líquido es mejor para mantener intactas las estructuras muscular y celular. Respecto a la vida de anaquel, se observó que los individuos congelados criogénicamente presentaron un mayor valor que los congelados con aire frío.

Durante el proceso de congelación criogénica, algunos camarones sufrieron un rompimiento en la región dorsal del exoesqueleto y la capa muscular externa. Dado que la fracturabilidad es la fuerza necesaria para crear el primer rompimiento significativo cuando se analiza la textura (Bourne, 2002), una ruptura en la capa muscular externa reduce la fuerza necesaria para hacer que una muestra cruja. El consumidor espera un producto firme, por ello durante el congelado criogénico debe evitarse una ruptura del producto.

5.5.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

El efecto de los tratamientos sobre la estructura microscópica de las secciones transversales del músculo se muestra en la Figura 24. La interacción de congelado y descongelado sobre las áreas blancas y de tejido muscular fue significativa ($P < 0.05$), no así para el tejido conectivo, el cual se mantuvo constante en todos los

tratamientos. Al analizar el control con los tratamientos no se observó diferencias significativas ($P > 0.05$), en la Tabla IV se muestran los resultados. Posiblemente no se hayan encontrado diferencias significativas con el control, ya que el tiempo de almacenamiento fue corto.

Tabla IV. Efecto de las combinaciones de tratamientos (congelación y descongelación) en la estructura microscópica del músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*)

Factor		Tejido muscular (%)	Área vacía (%)	Tejido conectivo (%)
Congelado	Descongelado			
NT	NT	44.9 ± 9.9 ^a	39.7 ± 10.7 ^a	15.5 ± 4.8 ^a
C	A	40.7 ± 7.6 ^a	39.2 ± 9.6 ^a	20.0 ± 5.9 ^a
	I	45.5 ± 5.2 ^a	34.9 ± 5.9 ^a	19.7 ± 5.0 ^a
F	A	45.3 ± 8.9 ^a	35.4 ± 9.1 ^a	19.0 ± 4.1 ^a
	I	38.9 ± 6.3 ^a	43.3 ± 6.2 ^a	17.8 ± 3.8 ^a

NT = Control, C = Criogénica, F = Convección, A = Adecuada, I = Inadecuada

Las diferencias estadísticamente significativas se indican con una letra diferente dentro de la misma columna ($P < 0.05$).

La interacción entre los factores fue significativa ($P < 0.05$) para el tejido muscular y el área vacía.

5.5.3 ANÁLISIS DE PROTEÍNA

La relación de proteínas sarcoplásmicas, miofibrilares y del estroma en el músculo está relacionado con la función muscular en el organismo vivo (Matsumoto, 1979). Analizando los perfiles de las fracciones extraídas se encontraron ligeros cambios entre los tratamientos. En las Figuras 25, 26 y 27 se

muestran los los perfiles proteicos de las fracciones sarcoplásmicas, miofibrilares y solubles en álcali, respectivamente.

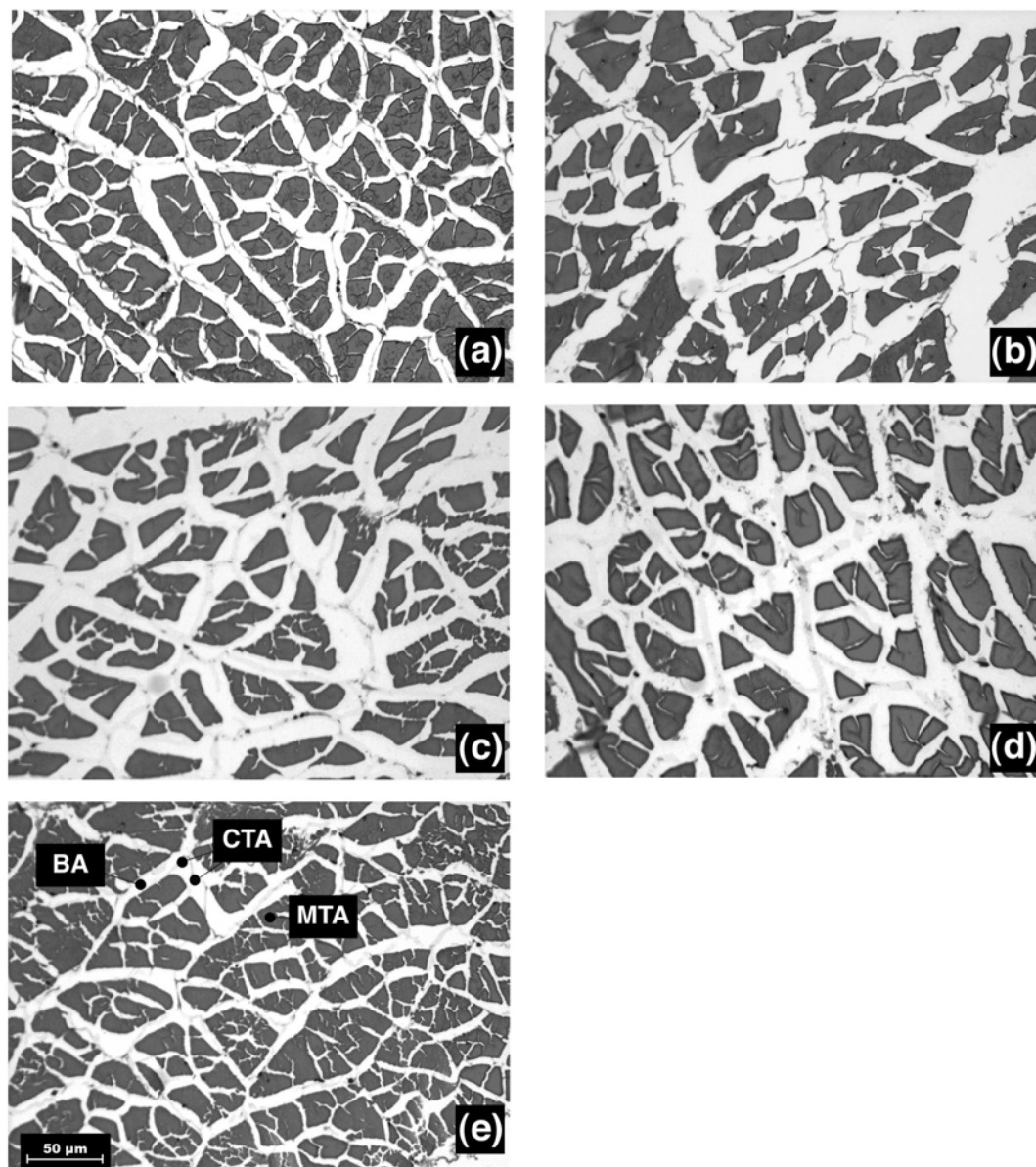
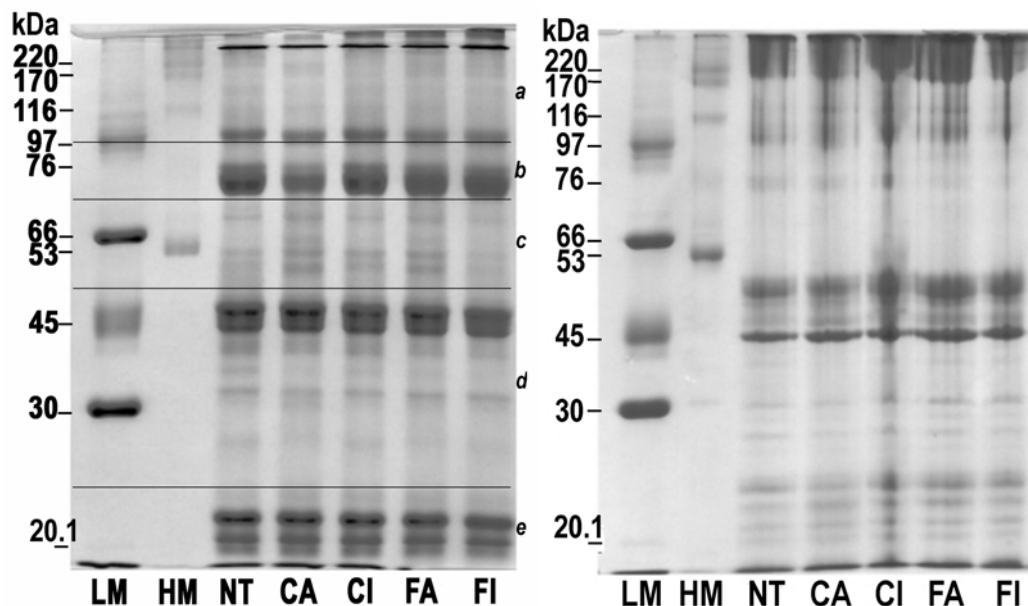


Figura 24. Vistas transversales del músculo de camarón tratado bajo condiciones de congelado y descongelado antes mencionadas. Tratamientos: (a) criogénico-adequado, (b) criogénico-inadecuado, (c) convección-adequada, (d) convección-inadecuada y (e) controles. BA = áreas blancas, CTA = área de tejido conjuntivo, MTA = área de tejido muscular. La escala representa 50 μm

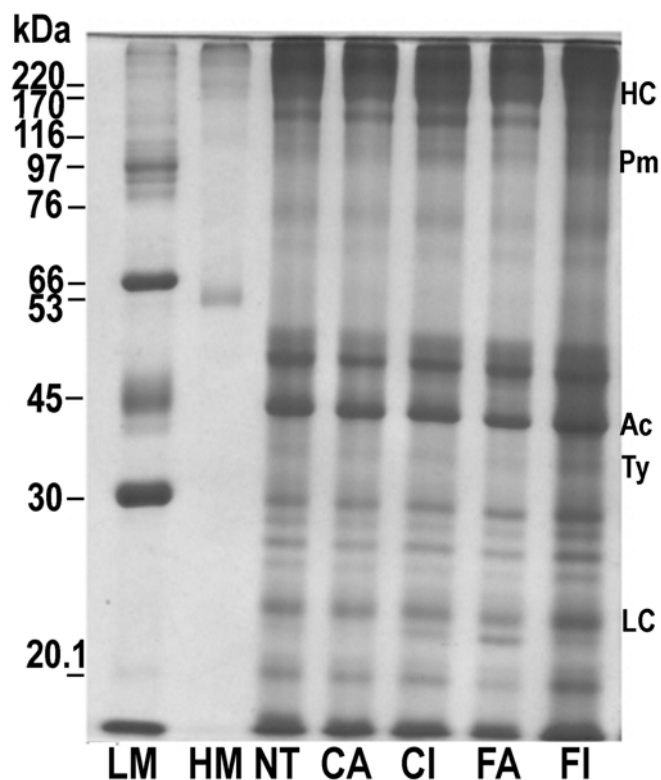


Figuras 25 y 26. Efecto de la congelación y descongelación en la fracción de proteínas sarcoplásmicas (izq) y miofibrilares (der) en músculo de camarón patiblanco. a, b, c, d, y e son las regiones para analizar las bandas de proteína. LM = marcador de peso molecular bajo, HM = marcador de peso molecular alto, NT = control, F = congelado por convección, C = congelado criogénico, A = descongelado adecuado, I = descongelado inadecuado

Las proteínas sarcoplásmicas presentes en el músculo son principalmente enzimas hidrolíticas. Dentro de las cuales se incluyen las proteasas, cuando el músculo es descongelado éstas son liberadas y activadas. La hidrólisis de proteínas musculares desestabiliza la estructura tridimensional. Si la proteólisis es excesiva se observará una modificación en la textura del músculo (Kijowski, 2001, Sikorski *et al.*, 1990b). Para el análisis de la fracción sarcoplásmica las bandas fueron agrupadas en 5 regiones (Figura 25). Comparando con los camarones no tratados, en la región a y b se observó un incremento en todas las bandas de las

muestras CI, FA y FI, principalmente en las proteínas con peso mayor a 220 kDa. En las mismas muestras, las regiones *d* y *e* presentaron una reducción en la densidad de las bandas. Tales cambios indican que el congelado causa desnaturalización y agregación de proteínas por el efecto de formación de hielo que reduce la disponibilidad de agua, incrementa la fuerza iónica en los alrededores. Esto puede inducir la formación de nuevos enlaces covalentes (Shenouda 1980, Sikorski and Kolakowska 1990). Fueron observados cambios en las regiones *b*, *c* y *d* en las muestras CA.

Las fracciones miofibrilares y soluble en álcali presentan un perfil protéico similar (Benjakul *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 1979). Ya que el electroforegrama de la fracción miofibrilar (Figura 26) no permite una comparación entre fracciones, se hicieron los análisis de esta fracción usando la fracción soluble en álcali. En la Figura 27, son presentadas las principales proteínas miofibrilares: miosina (cadenas ligera y pesada), paramiosina, actina y tropomiosina. Kijowski (2001) y Matsumoto (1979), indican que esta fracción es susceptible a cambios estructurales y agregación cuando se congela y descongela. A pesar de ello no se encontraron cambios mayores en el perfil, solo cambió la paramiosina en FA. Posiblemente con un tiempo de almacenamiento mayor se pueden observar cambios más drásticos. French (1986), reportó que el efecto del almacenamiento en congelación sobre las proteínas musculares de la fracción miofibrilar solo se observó después de 10 días a -20°C.



Figuras 27. Efecto de la congelación y descongelación en la fracción de proteínas soluble en álcali en músculo de camarón patiblanco. *a, b, c, d, y e* son las regiones para analizar las bandas de proteína. LM = marcador de peso molecular bajo, HM = marcador de peso molecular alto, NT = control, F = congelado por convección, C = congelado criogénico, A = descongelado adecuado, I = descongelado inadecuado

5.5.4 MELANOSIS

Todos los camarones congelados desarrollaron manchas oscuras durante el descongelado, principalmente en las branquias y el hepatopáncreas (Figura 28). Este fenómeno es llamado melanosis u obscurecimiento enzimático. Esta es una reacción post-mortem en crustáceos causada por la catálisis de la enzima endógena polifenoloxidasasa (PPO) o 1,2 benzenediol:oxígeno oxidoreductasa (EC

1.10.3.1). Dado que el olor, sabor y la calidad nutricional y sanitaria no se modifican significativamente por la melanosis, solo la apariencia puede afectar la aceptación (Kim *et al.*, 2000). Previamente habíamos observado manchas negras en camarones durante almacenamiento a 4°C (datos sin publicar). Comparado con aquellas muestras, el congelado y descongelado de los organismos recientemente capturados, se incrementó significativamente la melanosis, a un nivel similar al de especímenes almacenados solo 2 ó 3 días a 4°C. Esto es debido a que durante el congelado y descongelado, la forma inactiva de la PPO (prePPO) almacenada en los hemocitos, la glándula digestiva (en las células R) y los cromatóforos (en el músculo) (Yang *et al.*, 1993) es fácilmente liberada y activada en presencia de sustratos adecuados y oxígeno, y la melanosis se desarrolla más rápido.



Figuras 28. Camarón patiblanco después de un tratamiento de congelación-descongelación

5.6 CONCLUSIONES

La sanidad alimentaria y las cualidades sensoriales son las principales preocupaciones de los consumidores. Por esta razón es importante medir el impacto de los métodos de preservación sobre las características deseables de los alimentos. En este estudio la mayoría de las variables estudiadas no mostraron diferencias significativas con las interacciones de los tratamientos de congelado y descongelado. Comparados con especímenes no tratados los cambios en la textura de los camarones tratados no muestran diferencias significativas. Con estos resultados, para propósitos comerciales se recomendaría la congelación por convección y no la criogénica. Para propósitos de investigación en estructura celular y tejidos se recomienda la congelación criogénica. Se recomienda la descongelación lenta para propósitos al menudeo. La melanosis se desarrolla en los camarones descongelados; lo que puede afectar la aceptación por parte de los consumidores. Normalmente las reacciones de melanosis pueden ser fácilmente inhibidas o retrasadas por la adición de agentes químicos, pero las nuevas regulaciones en sanidad restringen su uso. Por esta razón el estudio de melanosis sin agentes químicos es esencial para la seguridad del consumidor.

6. LITERATURA CITADA

- Abbot, J.A. 1972. **Sensory assessment of food texture**. Food Tech. January: 40-49.
- AOAC. 1990. **Official Methods of Analysis**, Vol II, 15^{ta}. ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, EUA.
- Atkinson, D.E. y Walton, G.M. 1967. **Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation**. J. Biol. Chem. 242: 3239-3241.
- Badui, S. 1995. **Química de los alimentos**. Editorial Alhambra Mexicana, México. 648 p.
- Bagshaw, C.R. 1982. **Muscle contraction**. J.W. Arrowsmith Ltd.:Bristol, Londres, Inglaterra. 72 pp.
- Bailey, M.E., Fieger, E.A. y Novak, A.F. 1956. **Objective tests applicable to quality studies of ice stored shrimp**. Food Res. 21: 611-620.
- Barbut, S. 1996. **Determining water and fat holding**. En Hall, G.M. Methods of testing protein functionality. Blackie Academic and Professional, Londres, Inglaterra. 186-207.

- Benjakul, S., Visessanguan, W., y Leelapongwattana, K. 2002. **Characteristics of muscle from two species of bigeye snapper. *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*.** J. Food Biochem. 26, 307-326.
- Bourne, M.C. 1978. **Texture profile analysis.** Food Tech. **July**: 62-66, 72.
- Bourne, M.C. 2002. **Food texture and viscosity: concept and measurement.** 2da. ed. Academic Press, Londres, Inglaterra. 420 pp.
- Bradford, M.M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem. 72: 248-254.
- Bremner, H.A. 2002. **Understanding the concepts of quality and freshness in fish.** En: Bremner, H.A. Safety and quality issues in fish processing. CRC Press: Boca Ratón, Florida, EUA. 163-172.
- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R. and Phillips, M. 2004. **Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific.** FAO: Bangkok, Tailandia. 40 pp.
- Bykowski, P.J. 1990. **The preparation of catch for preservation and marketing.** En Sikorski, Z.E. Seafood: Resources, nutritional composition and preservation. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 77-92.

- Cheng, C.S., Hamann, D.D., Webb, N.B. y Sidwell V. 1979. **Effects of species and storage time on minced fish gel texture.** J. Food Sci. 44: 1087-1092.
- Chen, Y.-C. y Pan, B.S. 1997. **Morphologicla changes in tilapia muscle following freezing by airblast and liquid nitrogen methods.** Int. J. Food Sci. Tech. 32: 159-168.
- Chiou, T.-K. y Huang, J.-P. 2004. **Biochemical changes in the abdominal muscle of mud crac *Scylla serrata* during storage.** Fish. Sci. 70: 167-173.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. y Catignani, G.L. 1982. **Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins.** J. Dairy Sci. 66(6): 1219-1227.
- Cobb III, B.F., Vanderzant, C. y Hyder, K. 1974. **Effect of ice storage upon the free amino acid contents of tails of white shrimp (*Penaeus setiferus*).** J. Agric Food Chem. 22(6): 1052-1055.
- Cobb III, B.F., Conte, F.S. y Edwards, M.A. 1975. **Free amino acids and osmoregulation in penaeid shrimp.** J. Agric Food Chem. 23(6): 1172-1174.
- CONAPESCA. 2001. **Plan de manejo para la pesquería de camarón en el litoral del Océano Pacífico mexicano.** Comisión Nacional de Acuacultura

y Pesca. Instituto Nacional de la Pesca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 76 pp.

Ezquerria Brauer, J.M., Salazar Leyva, J.A., Bringas Alvarado, L. y Rouzaund Sánchez, O. 2003. **Effect of dietary protein on muscle collagen, collagenase and shear force of farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)**. Eur. Food Res. Technol. 217 : 277-280.

Fatima, R., Farooqui, B. y Quadri, R.B. 1981. **Inosine monophosphate and hipoxantine as indices of quality of shrimp**. J. Food Sci. 46: 1125-1127, 1131.

Fatima, R. y Qadri, R.B. 1985. **Quality changes in lobster (*Panulirus polyphagus*) muscle during storage in ice**. J. Agric. Food Chem. 33: 117-122.

Frederiksen, M. 2002. **Quality chain management in fish processing**. En: Bremner, H.A. Safety and quality issues in fish processing. CRC Press: Boca Ratón, Florida. 289-307.

French, J.S. 1986. **Postmortem changes in muscle protein structure as fish quality indices**. En: Kramer, E.D. y Liston, J. Seafood quality determination. Proceedings of an international symposium coordinated by the University of Alaska Sea Grant College Program, 10-14 November, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, Holanda. 137-174.

- Ganowiak, Z.M. 1990. **Sanitation in marine food industry**. En: Sikorski, Z.E. Seafood: Resources, nutritional composition and preservation. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 211-230.
- Gonçalves, A.C., López-Caballero, M.E. y Nunes, M.L. 2003. **Quality changes of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) packed in modified atmosphere**. J. Food Sci. 68(8): 2586-2590.
- Gorga, C. y Ronsivall, L.J. 1988a. **Deterioration of seafood quality**. En: Gorga, C. y Ronsivall, L.J. Quality assurance of seafood. van Nostrand Reinhold Company. New York, EUA. 72-85.
- Gorga, C. y Ronsivall, L.J. 1988b. **Measurement of seafood quality**. En: Gorga, C. y Ronsivall, L.J. Quality assurance of seafood. van Nostrand Reinhold Company. New York, EUA. 10-34.
- Haard, N.F. 1992. **Technological aspects of extending prime quality of seafood: a review**. J. Aquat. Food Prod. Tech. 1(3-4): 9-27.
- Haard, N. 2002. **The role of enzymes in determining seafood color, flavor and texture**. En: Bremner, H.A. Safety and quality issues in fish processing. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 220-253.
- Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L. y Holzapfel, W. 1994. **Biogenic amines and their production by microorganisms in food**. Trends in Food Sci. Tech. 5: 42-49.

- Hashimoto, K., Watanabe, S., Kono, M. y Shiro, K. 1979. **Muscle protein composition of sardine and mackerel**. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 45: 1435-1441.
- Hedges, N. y Nielsen, J. 2000. **The selection and pre-treatment of fish**. En: Kennedy, C. Managing frozen foods. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 95-110.
- Hedges, N., Unilever, R. y Sharnbrook, D. 2002. **Maintaining the quality of frozen fish**. En Bremner, A. Safety and quality issues in fish processing. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 379-406.
- Humanson, L.G. 1979. **Animal tissue techniques**. 4^{ta}. edición. Freeman and Company. San Francisco, EUA. 661 pp.
- Huss, H.H. 1995. **Quality and quality changes in fresh fish**. FAO Fisheries technical papers. No. 348. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/V7180E/V7180E00.HTM>
- Jiang, S.-T. 1998. **Contribution of muscle proteinases to meat tenderization**. 1998. Proc. Nat. Sci. Council B. 22(3): 97-107.
- Karube, I., Matsuoka, H., Suzuki, S., Watanabe, E. and Toyama, K. 1984. **Determination of fish freshness with an enzyme sensor system**. J. Agric. Food Chem. 32: 314-319.

- Kijowski, J. 2001. **Muscle proteins**. En: Sikorski, Z.E. Chemical and functional properties of food proteins. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, EUA. 233-269.
- Kim, J., Marshall, M.R. y Wei, C. 2000. **Polyphenoloxidase**. En: Haard N.F. y Simpson B.K. Seafood enzymes. Marcel Dekker. Nueva York, EUA. 271-315.
- Kim, S.-H., Eun, J.-B., Wei, C.-I. Clemens, R.A. y An, H. 2004. **Evaluation of histamine and other biogenic amines and bacterial isolation in canned anchovies recalled by the USFDA**. J. Food Sci. 69(6): M157-M162.
- Kong, B., Xiong, Y.L., Fang, C., Thompson, K.R., Metts, L.S., Muzinic, L.A. y Webster, C.D. 2006. **Influence of gender and spawning on meat quality of Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) stored at 2 °C**. J. Food Sci. 77(6): E320-E325.
- Kress-Rogers, E. 2001. **Sensors for food flavour and freshness: electronic noses, tongues and testers**. En: Kress-Rogers, E. y Brimelow. Instrumentation and sensors for the food industry. CRC Press. Boca Ratón, EUA. 553-622.
- Laemmli, U.K. 1970. **Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4**. Nature. 227: 680-685.

- Leitão, M.F.F. y Rios, D.P.A. 2000. **Microbiological and chemical changes in freshwater prawn (*Macrobrachium rosebergii*) stored under refrigeration.** Braz. J. Microbiol. 31: 178-183.
- Ling, B.H. Leung, P.S. y Shang, Y.C. 1996. **Export performance of major cultured shrimp producers in Japanese and US markets.** Aquaculture Res. 27: 775-786.
- Lou, S.-N. 1998. **Purine content in grass shrimp during storage as related to freshness.** J. Food Sci. 63(3):442-444.
- Marieb, E.N. 2003. **Human anatomy and physiology.** 6ta. ed. Benjamin Cummings. Cambridge, Inglaterra. 1237pp.
- Matsumoto, J.J. 1979. **Denaturation of fish muscle protein during frozen storage.** En: Fennema, O.R. Protein at low-temperatures. American Chemical Society. Washington, EUA. 205-224.
- Mendes, R., Quinta, R. y Nunes, M.L. 2001. **Changes in baseline levels of nucleotides during ice storage of fish and crustaceans from the Portuguese coast.** Eur. Food Res. Technol. 212: 141-146.
- Milewzski, S. 2001. **Protein structure and physico-chemical properties.** En: Sikorski, Z.E. Chemical and functional properties of food proteins. CRC Press. Boca Raton, EUA. 35-56.

- Mogens, J. 1984. **The quality of frozen fish.** Academic Press. Londres, Inglaterra.
- Nack, M. y Artyukhova, A.S. 1990. **Canning.** En Sikorski, Z.E. Seafood: Resources, nutritional composition and preservation. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 181-198.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. Worth Publishers. Nueva York, EUA. 1152 pp.
- NMFS. 2006. **Per capita consumption.** National Marine Fisheries Service Fisheries Statistics Division. Disponible en: <http://www.st.nmfs.gov/st1>. Visitada en octubre del 2006.
- Nip, W.K. y Moy, J.H. 1988. **Microstructural changes of ice-chilled and cooked freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*.** J. Food Sci. 53(2): 319-322.
- NOM-029-SSA1-1993. **Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Productos de la pesca. Crustáceos frescos-refrigerados y congelados.** Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Salud. 7 de Febrero de 1995.
- Ocaño-Higuera, V.M., Pacheco-Aguilar, R. y Maeda-Martínez, A.N. 2001. **Bioquímica postmortem en pectínidos.** En: Maeda-Martínez, A.N. Los

moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. LIMUSA. México. 405-429.

Ocaño-Higuera, V.M., Maeda-Martínez, A.N., Lugo-Sánchez, M.E. y Pacheco-Aguilar. 2006. **Postmortem biochemical and textural changes in the adductor muscle of catarina scallop stored at 0°C.** J. Food Biochem. 30: 373-389.

Okuma, H. y Watanabe, E. 2002. **Flow system for fish freshness determination based on double multi-enzyme reactor electrodes.** Biosens. Bioelectron. 17: 367-372.

Oliveira, A.C.M., O'Keefe, S.F. y Balaban, M.O. 2004. **Video analysis to monitor rigor mortis in cultured Gulf of Mexico sturgeon (*Ancipenser oxyrinchus desotoi*).** J. Food Sci. 69(8): 392-397.

Pacheco-Aguilar, R. Lugo-Sánchez, M.E. y Robles-Burgueño, R. 2000. **Postmortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0 °C.** J. Food Sci. 64(1):40-47.

Pan, B.S. y Yeh, W.T. 1993. **Biochemical and morphological changes in grass shrimp (*Penaeus monodon*) muscle following freezing by airblast and liquid nitrogen methods.** J. Food Biochem. 17, 147-160.

- Pham, Q. T. y Mawson, R.F. 1997. **Moisture migration and ice recrystallization in frozen foods**. En: Erickson, M. y Hung, Y.C. Quality in frozen food. Chapman and Hall. New York, USA. 67-91.
- Potter, N. 1978. **La ciencia de los alimentos**. Edutex, S.A. México. 749 pp.
- Praxiom Research Group Limited, 2004. ISO 9000-2000 **Definitions translated into plain English**. <http://praxiom.com/iso-definition.htm>. Visitada: Septiembre 2004.
- PROFECO. 2006. **¿Quién es quién en los precios?** Procuraduría Federal del Consumidor. México, D.F. México. <http://www.profeco.gob.mx>. Visitada: Agosto del 2006.
- Prusa, K.J., Bowers, J.A. y Chambers IV, E. 1982. **Instron measurements and sensory for texture of poultry meat and frankfurtes**. J. Food Sci. 47:653-654.
- Rehbein, H. 2002. **Measuring the shelf-life of frozen fish**. En Bremner, A. Safety and quality issues in fish processing. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 407-424.
- Reid, D. S. 1997. **Overview of physical/chemical aspects of freezing**. En: Erickson, M. y Hung, Y.C. Quality in frozen food. Chapman and Hall. New York, EUA. 10-28.

- Roe, J.H., Bailey, J.M., Gray, R.R. y Robinson, J.N. 1961. **Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution.** J. Biol. Chem. 236(5): 1244-1246.
- Royuela, M., Faile, B., Arenas M.I. y Paniagua R. 2000. **Characterization of several invertebrate muscle cell types: A comparison with vertebrate muscles.** Microsc. Res. Tech. 48: 107-115.
- Ryder, J.M. 1985. **Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography.** J. Agric. Food Chem. 33: 678–680.
- Saito, T., Arai, K. y Matsuyoshi, M. 1959. **A new method for estimating the freshness of fish.** Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 24(9): 749-750.
- SAGARPA. 2005. **Anuario estadístico de pesca 2003.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Comisión Nacional del Acuacultura y Pesca. México, D.F. México.
- SAGARPA. 2006. **Carta Nacional Pesquera.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial 25 de Agosto del 2006. México, D.F. México.
- Santos-Yap, E.E.M. 1995. **Fish and seafood.** En: Jeremiah, L.E., editor. Freezing effects on food quality. Marcel Dekker, Inc. New York, EUA. 109-133.

- Sahagian, M.E. y Goff, H.D. 1996. **Fundamental aspects of the freezing process**. En: Jeremiah, L. Freezing effects on food quality. Marcel Dekker, Inc. New York, EUA.1-50.
- Shaw, B.L. and Battle, H.I. 1957. **The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin)**. Can. J. Zool. 35: 325-347.
- Shenouda, S.Y.K. 1980. **Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh**. En: Chichester, C.O., Mrak, E.M y Stewart, G.F. Advances in Food Research. Academic Press. New York, EUA. 26: 275-311
- Sheehan, D. y Hrapchak, B.B. 1973. **Theory and practice of histotechnology**. Mosby Company. London, Inglaterra. 481 pp.
- Shimojo, N., Naka, K., Nakajima, C., Yosikawa, C., Okuda, K. y Okada, K. 1989. **Test-strip method for measuring lactate in whole blood**. Clin Chem. 35(9): 1992-1994.
- Shimada, R., Ushio, H. y Yamanaka, H. 1998. **Changes in content of extractive components in the tail muscle of three species of lobsters during storage**. Fish. Sci. 64(6): 979-984.
- Sidhu, G.S., Montgomery, W.A. y Brown, M.A. 1974. **Post mortem changes and spoilage in rock lobster muscle. I. Biochemical changes and rigor mortis in *Jasus novae-hollandiae***. J. Food Tech. 9: 357-370.

- Sikorski, Z.E. 1990. **Chilling of fresh fish.** En Sikorski, Z.E. Seafood: Resources, nutritional composition and preservation. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 93-109.
- Sikorski, Z.E. y Kolakowska, A. 1990. **Freezing of marine food.** En Sikorski, Z.E. Seafood: Resources, nutritional composition and preservation. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 111-124
- Sikorski, Z.E., Kolakowska A., y Pan, B.S. 1990a. **The nutritive composition of the major groups of marine food organism.** En Sikorski, Z.E. Seafood: Resources, nutritional composition and preservation. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 29-54.
- Sikorski, Z.E., Kolakowska, A. y Burt, J.R. 1990b. **Postharvest biochemical and microbial changes.** En Sikorski, Z.E. Seafood: Resources, nutritional composition and preservation. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 55-75.
- Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. y Rege, D.V. 1997a. **The development of the concept of food quality, safety and authenticity.** En: Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. y Rege, D.V. Handbook of indices of food quality and authenticity. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 10-33.

- Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. y Rege, D.V. 1997b. **Meat, fish and poultry**. En: Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. y Rege, D.V. Handbook of indices of food quality and authenticity. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 209-299.
- Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. y Rege, D.V. 1997c. **Indicators of processing of foods**. En: Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. y Rege, D.V. Handbook of indices of food quality and authenticity. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA. 489-536.
- Sista, R.V., Erickson, M.C. y Shewfelt, R.L. 1997. **Quality deterioration in frozen foods associated with hydrolytic enzyme activities**. En: Erickson, M. y Hung, Y.C. Quality in frozen food. Chapman and Hall. New York, USA. 101-110.
- Spurvey, S., Pan, B.S. y Shahidi. 1997. **Flavour of shellfish**. En: Shahidi, F. Flavor of meat, meat products and seafoods. 2nd. ed. Blackie Academic and Professional. Londres, Inglaterra. 159-196.
- Srinivisan, S., Xiong, Y.L., Blanchard, S.P. y Tidwell, J.H. 1998. **Effects of freezing and thawing methods and storage time on physicochemical properties of freshwater prawns (*Machrobrachium rosenbergii*)**. J. Aquat. Food Prod. Tech 7(2): 47-68.
- StatPoint Inc. 2005. **The user's guide to Statgraphics Centurion XV**.: StatPoint, Inc. Herndon, EUA.

Szczesniak, A.S. 1963. **Objective measurements of food texture.** J.Food. Sci. 28: 410

Szczesniak, A.S. 1972. **Instrumental methods of texture measurement.** Food Tech. January: 50-56.

Taylor, S.L. y Sumner, S.S. 1986. **Determination of histamine, putrecine and cadaverine.** En: Kramer, E.D. y Liston, J. Seafood Quality Determination, Proceedings of an International Symposium Coordinated by the University of Alaska Sea Grant College Program, Anchorage, Alaska, USA. 10-14 Noviembre 1986. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, Holanda. 235-245.

Trinder, P. 1969. **Quantitative determination of glucose using the GOP-PAP method.** Clin. Biochem. 6: 24-27.

Tseng, Y.-C., Xiong, Y.L., Feng, J. y Ramírez-Suarez, J.C. 2003. **Quality changes in Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) subjected to multiple freezing-thawing cycles.** J. Food Quality 26: 285-298.

van Handel E. 1965. **Estimation of glycogen in small amounts of tissue.** Anal. Biochem. 11: 256-265.

WHO. 2006. **Global and regional food consumption patterns and trends.** World Health Organization. Disponible en:

http://www.who.int/nutrition/topics/3_foodconsumption/en/index.html.

Consultado octubre del 2006.

Wilaichon, W., Cobb III, B.F., Suter, D.A., Dutson, T.R. y Jones, E.R. 1977. **Effect of rigor mortis, postmortem pH, and stress values for white shrimp (*Penaeus setiferus*)**. En: Proceedings of the 2nd annual tropical and subtropical fisheries technological conference of the Americas. Biloxi, Mississippi, 17-20 Abril 1977. Seafood Science and Technology Society of the Americas. 187-202.

Woyewoda, A.D., Shaw, S.J., Ke, P.J. y Bums, B.G. 1986. **Recommended laboratory methods for assessment of fish quality**. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. N° 1448, Fisheries and Oceans, Canadá.

Xiong, Y.L. 1997. **Protein denaturation and functionality losses**. En: Erickson M. y Hung Y-C. Quality in frozen food. Chapman Hall/Internacional Thomson Publishing. New York, EUA. 111-140.

Xiong, S., Xiong, Y.L., Blanchard, S.P., Wang, B., y Tidwell, J.H. 2002. **Evaluation of tenderness in prawns (*Machrobrachium rosenbergii*) marinated in various salt and acid solutions**. Int. J. Food Sci. Tech. 37: 291-296.

Yan, T.-R., Lee, C.-S. y Lee, J.-Y. 1994. **Studies on proteolytic enzymes of red-tail shrimp (*Penaeus penicillatus*)**. J. Chin. Agric. Chem. Soc. 32(1): 25-32.

- Yang, J.-S., Perng, F.-S. y Marshall, M.R. 1993. **Immunohistochemical localization of phenoloxidase in hepatopancreas, muscle and epidermis of grass shrimp (*Penaeus monodon* F.)**. J. Food Biochem. 17: 115-124.
- Yamagata, M. y Low, L.K. 1995. **Banana shrimp, *Penaeus merguensis*, quality changes during iced and frozen storage**. J. Food Sci. 60(4): 721-726.
- Yokoyama, Y., Sakaguchi, M., Kawai, F y Kanamori, M. 1994. **Chemical indices for assessing freshness of shellfish during storage**. Fish. Sci. 60(3): 329-333.
- Zhang M y Mittal GS. 1993. **Measuring tenderness of meat products by Warner Bratzler shear press**. J. Food Process. Pres. 17: 351-367.

7. ANEXOS

ANEXO I**SOLUCIÓN DAVIDSON**

(Shaw y Battle, 1957)

Compuesto	Volumen (mL)
Glicerina	100
Formaldehído al 37-40%	200
Alcohol etílico 96%	300
Agua de mar filtrada	300
Ácido acético	100

ANEXO II

TÉCNICA HISTOLÓGICA PARA CORTES EN PARAFINA

Deshidratación y aclaramiento

- 1.- Alcohol etílico 70% (mínimo 1 h)
- 2.- Alcohol etílico 80% (1 h)
- 3.- Alcohol etílico 90% (1 h)
- 4.- Alcohol etílico 96% (1 h)
- 5.- Alcohol etílico 100% (dos cambios de 1 h en c/u)
- 6.- Alcohol etílico-xilol 1:1 (20 min)
- 7.- Xilol absoluto (5 min)

Inclusión en parafina

- 8.- Parafina-xilol 1:1 (25 min)
- 9.- Paraplast X-Tra (3 cambios de 1 h cada uno)

ANEXO III

TÉCNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA

(Humason, 1979; Sheehan y Hrapchak, 1973)

Desparafinado e hidratación

- 1.- Xilol (3 cambios de 10 min cada uno)
- 2.- Alcohol etílico 96% (2 min)
- 3.- Alcohol etílico 70% (2 cambios de 2 min c/u)
- 4.- Agua destilada (5 min)

Tinción

- 5.- Hematoxilina de Harris (1-2 min)
- 6.- Agua destilada (dos cambios de 5 min cada uno)
- 7.- Alcohol ácido (10 segundos)
- 8.- Agua destilada (5 min)
- 9.- Agua amoniacal (10 segundos)
- 10.- Agua destilada (5 min)
- 11.- Alcohol etílico 50% (2 min)
- 12.- Alcohol etílico 70% (2 min)
- 13.- Eosina-floxina (3 min)
- 14.- Alcohol etílico 96% (dos cambios de 2 min c/u)
- 15.- Alcohol etílico 100% (dos cambios de 1 min c/u)
- 16.- CitriSolv (sustituto de xilol) (5 min c/u) y montar en Estellan (resina sintética)

ANEXO IV

SOLUCIÓN DE O-FTALDIALDEHÍDO (OPA)

(Church, *et al.* 1982)

16 mg de OPA disueltos en 400 μ L de metanol

10 mL de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 100 mM.

1 mL de SDS al 20 %

0.1 mL de β -mercaptoetanol.

Aforar todo a 100 mL con agua Milli Q.

Notas:

- o La solución de OPA se almacena a 4°C en ausencia de luz. Y la vida útil es de 36 a 48 h como máximo.
- o Es importante manejar el reactivo con guantes y limpiar adecuadamente el área de trabajo.
- o Evitar el contacto con la luz durante el pesado.
- o El borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) necesita cerca de 6 h para solubilizarse.
- o Cada vez que se haga una nueva solución de trabajo (OPA) se debe hacer una curva estándar.

ANEXO V

TRICROMICA DE MASSON

- 1.- Desparafinar e hidratar en agua destilada (Ver Anexo III)
- 2.- Mordentar en Bouin durante 1 h a 58°C a temperatura ambiente
- 3.- Dejar enfriar, lavar en agua corriente hasta quitar el color amarillo (10 min)
- 4.- Teñir con Hematoxilina de Weigert (de hierro) (10 min)
- 5.- Lavar en agua corriente (10 min)
- 6.- Enjuagar en agua destilada
- 7.- Teñir con Escarlata de Biebrich-fucsina ácida (7 a 10 min)
- 8.- Lavar en agua destilada (1-2 min)
- 9.- Solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (10-15 min). Si el colágeno retiene el color rojo de la solución de Biebrich scarlet, repetir la diferenciación en ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico
- 10.- Teñir con Anilina Azul o light green (5 min)
- 11.- Agua destilada (un baño)
- 12a.- Si se usa anilina azulosa diferenciar con ácido acético al 1% por 3-5 min
- 12b. Si se usa verde (light green) diferenciar con solución de ácido fosfotúngstico (15 min)
- 13.- Deshidratar en alcohol etílico 96% (1 min)
- 14.- Deshidratar en alcohol etílico 100% I y II (2 min c/u)
- 15.- Aclarar en Xilol o Citrosolv I, II y III (5 min c/u) y montar en resina sintética

ANEXO VI

Díaz-Tenorio, L.M., García-Carreño, F.L. and Pacheco-Aguilar, R. 2006. Comparison of freezing and thawing treatments on muscle properties of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Biochemistry*. En prensa.

Díaz-Tenorio, L.M., García-Carreño, F.L. and Pacheco-Aguilar, R. 2006. Changes in texture quality of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during storage in ice. *Food Science and Technology International*. Sometido.