

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

“EFECTO DEL ESTRÉS ANTEMORTEM EN LA ESTABILIDAD DEL
SISTEMA PROTEICO MIOFIBRILAR DEL MÚSCULO DE CAMARÓN
BLANCO (*Litopenaeus vannamei*), SOMETIDO A CICLOS DE
CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN”

POR:

HUGO ENRIQUE RAMÍREZ GUERRA


TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS

CARTA DE APROBACIÓN


Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Hugo Enrique Ramírez Guerra, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias, dentro del Programa de Maestría en Ciencias del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.




Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director de Tesis



Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez



Dra. Celia Olivia García Sifuentes




M.C. Ma. Elena Lugo Sánchez

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD, A.C.)

La publicación de comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos a CIAD, A.C. previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del Director o Directora de tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General
C.I.A.D., A.C.

DEDICATORIA

A las personas que siempre han estado a mi lado, que me han enseñado el significado tan valioso de la familia y, que los quiero tanto como a mi propia vida. A ustedes que disfrutan con alegría cada día, justo como aquel primero en que unieron sus vidas...

A mis padres Mauro e Iliana.

*A la persona que decidió vivir su vida junto a la mía...
A ti Malinali mi amor, que me has dado dos hermosos bebés...
Que has atado tu mano a la mía y me has demostrado
que la vida está hecha sólo de pequeños detalles...*

GRACIAS MI AMOR..!



A mis hijos Alexa y Alexis...

*Mis pequeños grandes tesoros, que son la razón de mí existir
Que siempre los llevo con orgullo en mi corazón y por ellos
es que tiene significado mi vida... Gracias chiquitos, los amo.*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el aporte económico que sustentó mi estudios de maestría, facilitando alcanzar una de las metas más importantes en mi vida.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, a la **Coordinación de Programas Académicos** y al **Departamento de Tecnologías de Origen Animal**, por permitir mi ingreso y permanencia en esta institución de alto prestigio y potencial educativo.

A mi asesor de tesis el **Dr. Ramón Pacheco Aguilar**, que con sus valiosas intervenciones mostró su inmenso conocimiento científico y filosófico que lo caracteriza y distingue de los demás.

Especialmente agradezco a la **Dra. Celia Olivia García Sifuentes** por participar como tutora en este trabajo de tesis. Agradezco su valiosa amistad y su gran apoyo en todas y cada una de las actividades realizadas en este proyecto. Por ello, y por ser una excelente persona, le doy mil gracias.

A las maestras **M.C. Guillermina García Sánchez**, **M.C. María Elena Lugo Sánchez** y a la **M.C. María Gisela Carvallo Ruíz** que siempre estuvieron dispuestas a ayudarme. Fue muy gratificante trabajar a su lado ya que son magnificas en todo lo que se proponen hacer, además de ser unas maravillosas personas...Gracias Maestras...

Al **Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez** por ser integrante del comité de tesis y por participar como mi maestro en varias ocasiones. Gracias por su paciencia y le felicito por ser una excelente investigador...

A la **Dra. Teresa Gollas** y al **Dr. Hernández** por facilitarnos la obtención del camarón utilizado en este estudio y colaborar en la logística de los bioensayos, poniendo a disposición al personal y a las instalaciones de CIBNOR.

Agradezco Especialmente también al médico veterinario **Rodolfo Lozano** por su valiosa colaboración en los trabajos de Histología que se realizaron en **CIBNOR** unidad Mazatlán, Sinaloa.

Y por último, agradezco a todo el personal del **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.**, quienes de forma directa o indirecta estuvieron involucrados en este trabajo, especialmente a los pertenecientes al Departamento de Tecnologías de Origen Animal (**DTAOA**).

ÍNDICE TEMÁTICO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Actividad Camaronícola en México	3
Principales Factores Ambientales que Afectan la Fisiología del Camarón	5
Variables de Estrés Antemortem.....	5
Temperatura	6
Salinidad	7
pH	9
Oxígeno Disuelto (OD).....	11
Anatomía General del Camarón	13
Cambios Bioquímicos Posmortem	16
Rigor mortis	18
Disminución de pH muscular	19
Desnaturalización de proteínas	20
Cambios Bioquímicos y Físicoquímicos en Productos Marinos Durante el Almacenamiento por Congelación	21
Desnaturalización de Proteínas	22
Formación de cristales de hielo.....	24
Deshidratación.....	25
Concentración de solutos.....	25
Oxidación.....	26

Efecto de los Ciclos de Congelación-Descongelación	26
Evaluación de la Estabilidad del Sistema Proteico Miofibrilar	28
Capacidad de Retención de Agua (CRA)	28
Solubilidad de Proteínas	29
Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés)	31
Análisis Histológico	32
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	35
Objetivos Específicos	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
Bioensayo y Preparación de la Muestra	36
Evaluación de la Estabilidad del Sistema Proteico Miofibrilar	38
Capacidad de Retención de Agua (CRA)	38
Solubilidad de Proteínas	38
Fraccionación y Análisis de Proteínas	40
Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	41
Análisis Histológico	41
Diseño Experimental	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
Capacidad de Retención de Agua (CRA)	43
Solubilidad de Proteínas	45
Fraccionación y Análisis de Proteínas	49
Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	59
Análisis Histológico	63
CONCLUSIÓN	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Producción de camarón en México por acuicultura y captura; 1985-2006. . 4	
Figura 2. Promedio del peso ganado de <i>F. californiensis</i> a diferentes temperaturas y concentraciones de oxígeno disuelto durante 50 días de exposición..... 8	
Figura 3. Supervivencia (a 20°C) de juveniles de la especie <i>L. vannamei</i> expuestos a diferentes cambios en la salinidad. 10	
Figura 4. Efecto de la concentración de oxígeno disuelto sobre el camarón de cultivo. 12	
Figura 5. Anatomía externa del camarón. 15	
Figura 6. Degradación enzimática del ATP 17	
Figura 7. Diseño del experimental del bioensayo de hipoxia (a) y protocolo experimental para la aplicación de los ciclos de congelación-descongelación (b) en camarón blanco (<i>L. vannamei</i>). 37	
Figura 8. Esquema experimental y evaluaciones analíticas realizadas al músculo del camarón (<i>L. vannamei</i>). 39	
Figura 9. Efecto del estrés antemortem causado por hipoxia sobre la Capacidad de Retención de Agua (g H ₂ O/g de Proteína) del músculo de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>), sometido a ciclos de congelación-descongelación.. 44	
Figura 10. Efecto del estrés antemortem causado por hipoxia sobre la solubilidad (g proteína/100g de músculo) total de las proteínas del músculo del camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) sometido a ciclos de congelación-descongelación.. 47	
Figura 11. Efecto del estrés antemortem causado por hipoxia sobre la solubilidad (g proteína/100g de músculo) de la fracción proteica miofibrilar del músculo de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) sometido a ciclos de congelación-descongelación.. 48	

Figura 12. Análisis de correlación entre las propiedades de CRA y solubilidad de la fracción miofibrilar del músculo del camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) estresado por hipoxia y sometido a ciclos de congelación-descongelación.....	50
Figura 13. Electroforegrama del músculo de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) sometido a ciclos de congelación-descongelación..	51
Figura 14. Electroforegrama del músculo de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) almacenado a -20°C.....	52
Figura 15. Densitograma de los electroforegramas producidos por los extractos proteicos del músculo de camarón (<i>L. vannamei</i>) fresco..	54
Figura 16. Electroforegramas de las fracciones sarcoplásmica (a) y miofibrilar (b) del músculo del camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) sometido a ciclos de congelación-descongelación..	55
Figura 17. Densitogramas de los geles obtenidos del análisis de la fracción miofibrilar del músculo de camarón (<i>L. vannamei</i>) fresco..	56
Figura 18. Densitogramas de los geles obtenidos del análisis de la fracción sarcoplásmica del músculo de camarón (<i>L. vannamei</i>) fresco.....	57
Figura 19. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) del músculo de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>).	61
Figura 20. Micrografía de músculo dorsal del camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) sometido a ciclos de congelación-descongelación.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Temperatura máxima de transición (T_{\max} , °C) y ΔH (J/g) de miosina y actina, del músculo del camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) sometido a ciclos de congelación-descongelación.	60
Tabla 2. Efecto de los ciclos de congelación-descongelación en la estructura microscópica del músculo de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>).	66

RESUMEN

La camaronicultura es una actividad con un dinamismo importante en México. El cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en nuestro país genera más de 110,000 toneladas anuales, representando un ingreso económico importante para el mercado local y de exportación. El camarón es un producto muy perecedero que frecuentemente se maneja fresco o congelado, por lo que requiere de bajas temperaturas para preservar su calidad utilizándose para ello métodos de conservación como refrigeración, enhielado y congelación. Sonora cuenta con un clima extremo, de modo que tanto en temporada de cultivo como en la cosecha de camarón se experimentan incrementos importantes de temperatura, alcanzando hasta los 47°C provocando condiciones de hipoxia en el agua de cultivo del camarón. Esta condición se presenta de forma consistente en el estado, expresándose en una reducción de los niveles de oxígeno disuelto (OD) a un nivel crítico. Esta disminución se presenta en función de los incrementos de temperatura, en combinación con otros factores intrínsecos del sistema de cultivo. La hipoxia induce un estado de estrés en el camarón, lo cual repercute en su crecimiento y reproducción, generando grandes pérdidas por mortandad. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del estrés antemortem en la estabilidad del sistema proteico miofibrilar del camarón blanco (*L. vannamei*), sometido a ciclos de congelación-descongelación. Los resultados obtenidos mostraron que el estrés antemortem causado por hipoxia (0.5 mgL^{-1}), impactó las propiedades fisicoquímicas y térmicas de las proteínas miofibrilares durante el primer ciclo de congelación-descongelación: además disminuyó ($P \leq 0.05$) la capacidad de retención de agua (CRA) del músculo en un 5.7% y la solubilidad de la fracción miofibrilar en un 10.8%. La modificación de las propiedades térmicas de las proteínas miofibrilares del músculo fresco promovieron un incremento ($P \leq 0.05$) de 0.7°C en la temperatura máxima de desnaturalización (T_{max}) y una disminución de 0.07 J/g en la energía necesaria para la desnaturalización (ΔH) de miosina, mientras que para actina el incremento ($P \leq 0.05$) fue de 0.4°C y 0.12 J/g en la T_{max} y ΔH , respectivamente. Los principales cambios en las propiedades térmicas de las proteínas miofibrilares se indujeron por el efecto del estrés y la congelación, no así

por la aplicación de los ciclos de congelación-descongelación. El análisis electroforético (SDS-PAGE), mostró que el sistema proteico miofibrilar del camarón (estresado y no estresado) no presentó cambios visibles por actividad autolítica. La microestructura del músculo se vio afectada debido a la condición de estrés antemortem, registrándose un incremento ($P \leq 0.05$) de más del doble (157.7%) de área blanca en el músculo fresco, y 83.9% en el porcentaje de lisis de los paquetes miofibrilares durante el primer ciclo de congelación-descongelación. Los resultados obtenidos mostraron que la exposición a hipoxia podría ser un factor que limita la estabilidad del sistema miofibrilar del músculo de camarón; además, se observó que el efecto de la congelación potencia el impacto de la hipoxia modificando las propiedades fisicoquímicas y térmicas de las proteínas miofibrilares. El uso de ciclos repetidos de congelación-descongelación no fue un factor de impacto sobre las propiedades fisicoquímicas evaluadas en el músculo. Sin embargo, existe la necesidad de evaluar si la aplicación de ciclos repetidos de congelación-descongelación tiene impacto en otros parámetros de calidad del camarón, por lo que se sugiere complementar esta investigación con otras evaluaciones como el caso de los posibles cambios en color, textura y propiedades sensoriales, que podrían impactar directamente sobre la aceptabilidad del producto por el consumidor.

INTRODUCCIÓN

México ocupa el segundo lugar en cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en el Continente Americano. La camaronicultura como tal, es una actividad que se practica a partir de la década de los 80's, representando sus productos un recurso económico importante para el mercado nacional y de exportación (Díaz-Tenorio y col., 2007). Una de las principales limitantes ambientales, que representa la principal causa de grandes pérdidas en los cultivos del noroeste del país, es el agotamiento del oxígeno disuelto (OD) en el agua (hipoxia). Esta condición induce estrés, afectando de forma negativa al crecimiento, la alimentación y metabolismo del organismo. La hipoxia normalmente se favorece por factores operacionales y ambientales, como un ineficiente sistema de aireación e intercambio de agua, incrementos de temperatura y aumento de la actividad fotosintética de la microflora local (Ibarra y col., 2007).

El estrés, inducido por hipoxia, tiene un fuerte impacto en la fisiología del camarón, propiciando una cascada de respuestas fisiológicas que obligan al organismo a tomar rutas metabólicas alternas para generar energía y mantener la homeostasis (Rosas y col., 1997; Ocampo y col., 2003; Guadagnoli y Reiber, 2005; Mugnier y Soyez, 2005; Mercier y col., 2006). La hipoxia, es responsable de cuantiosas pérdidas en la producción y comercialización del camarón de cultivo. Por ello, se han desarrollado un número considerable de estudios sobre el efecto de las condiciones de hipoxia en la fisiología del camarón y otras especies de acuicultura (Martínez y col., 1998; Rodríguez y Moullac, 2000; Magallón-Servín, 2004). No obstante, existe muy poca información acerca de estudios sobre la influencia del estrés antemortem en la bioquímica posmortem y funcionalidad tecnológica del músculo de este crustáceo.

El camarón es un producto perecedero que requiere de manipulación especial y el uso de bajas temperaturas para ser transportado o almacenado para su consumo posterior. La conservación por congelación es un método muy eficiente

para este fin; sin embargo, si no se realiza de una manera adecuada, se pueden experimentar cambios físico-químicos indeseables en el músculo que demeritan su calidad, aumentando la posibilidad de disminuir la aceptabilidad del consumidor (Santos-Yap, 1995). Otro punto importante a considerar, es que durante la distribución y comercialización, el camarón se congela y descongela en varias ocasiones, promoviendo con ello también los cambios mencionados anteriormente. Por lo tanto, es importante establecer si existe relación entre las variables antemortem, el comportamiento posmortem y el efecto de los ciclos de congelación-descongelación en la calidad final del camarón blanco; para ello es pertinente estudiar el efecto del estrés antemortem (hipoxia) en la estabilidad del sistema proteico miofibrilar del músculo de camarón blanco (*L. vannamei*) sometido a ciclos de congelación-descongelación.

ANTECEDENTES

Actividad Camaronícola en México

En México, la acuicultura fue introducida en los años 30's con resultados poco favorables. No fue sino hasta mediados de los 80's cuando la camaronicultura se convirtió en una de las actividades económicas más dinámicas y crecientes a lo largo del Golfo de California (DeWalt, 2000). El cultivo de camarón en estanques ha generado ganancias para muchos productores, creando también nuevas oportunidades de empleo y proporcionando la posibilidad de disminución de la presión sobre las reservas de camarones silvestres. Para el año 2008, el 90% de las granjas camaroneras en México estaban situadas al noroeste, concentradas en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, con apenas unas pocas ubicadas en la península de Baja California (Juárez, 2008).

Actualmente, el camarón blanco (*L. vannamei*) representa más del 70% de peso vivo y más del 80% del valor del cultivo de toda la producción acuícola del país (Juárez, 2008). México, se posiciona como el séptimo dentro de los países camaronícolas del mundo, y el vigésimo-noveno en la producción acuícola en general. El cultivo de camarón ha crecido de prácticamente no existir producción en 1988, hasta 110,000 toneladas en el 2006 (**Figura 1**). En contraste, durante el mismo periodo, la captura del crustáceo se ha mantenido estable en las 60,000 toneladas anuales, a pesar de los esfuerzos realizados para ello. Mientras que la captura continúa siendo importante, la producción acuícola la ha sobrepasado desde el 2003, casi duplicándola hoy en día. En los últimos tres años, esta actividad ha crecido en un 16% en promedio por año, practicándose tanto en las costas del Pacífico como en el Golfo de México (CONAPESCA; FAO; Juárez, 2008).

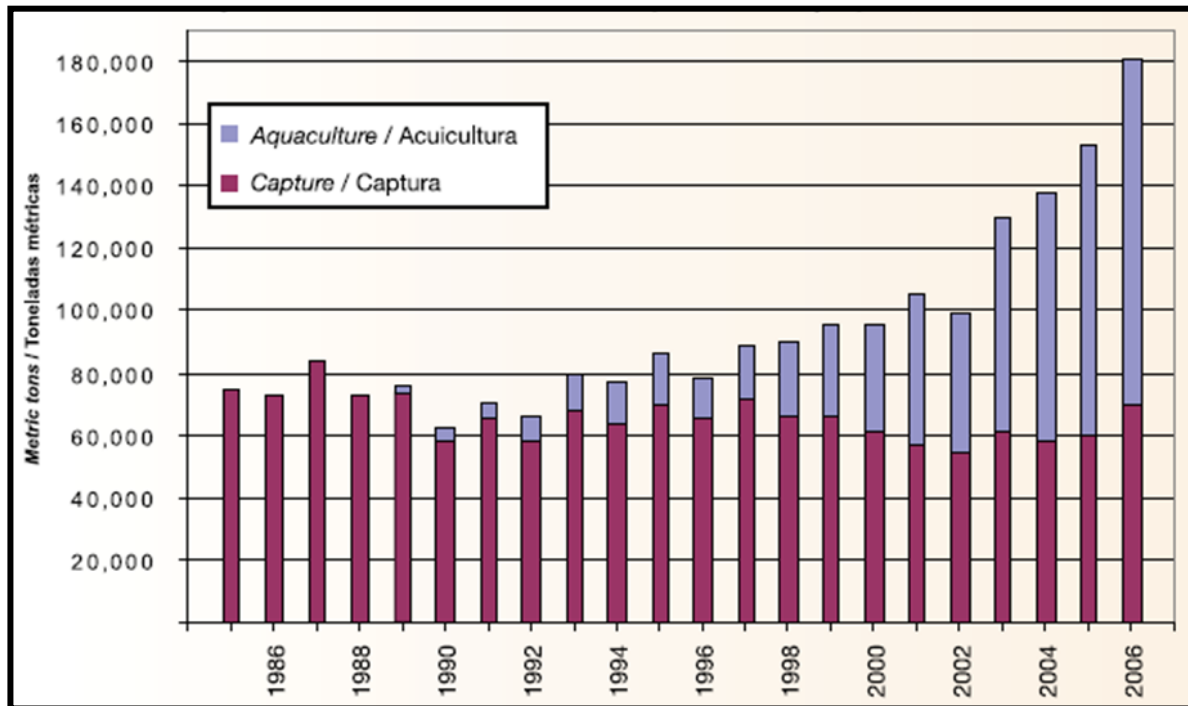


Figura 1. Producción de camarón en México por acuicultura y captura; 1985-2006.
Fuente: CONAPESCA; FAO; Comité de Sanidad Acuícola.

Principales Factores Ambientales que Afectan la Fisiología del Camarón

Cuando se presenta alguna modificación en el ambiente marino (temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto (OD), etc.), pueden ocurrir cambios bioquímicos y fisiológicos en los organismos que les permitan mantener la homeostasis con su hábitat. Los camarones son criaturas susceptibles de sufrir estrés ante condiciones ambientales adversas. En dichas condiciones, el camarón no se alimenta bien, tiende a enfermarse y crece lentamente y/o muere. No obstante, tienen la capacidad de adaptarse dentro de un rango ambiental tolerable o normal, en donde la constancia de la actividad biológica, mantenida por flujos de materia y energía, constituyen al final, la causa y efecto del metabolismo (Boyd, 2000).

La relación organismo-ambiente se mantiene mediante ajustes metabólicos que obedecen a cambios en la bioquímica y/o fisiología de las especies. Esto a su vez, determina la habilidad para adaptarse a variaciones en el ambiente, determinada por la genética de cada una de ellas. Sin embargo, estas adaptaciones se dan de manera extremadamente lenta, en tanto que los ajustes fisiológicos funcionales que favorecen la actividad biológica normal ante un ambiente dado son más simples. Así, los organismos utilizan estos cambios bioquímicos y las respuestas que involucran cambios fisiológicos de energía de la tasa metabólica para mantener la homeostasis (Boyd, 2000).

Variables de Estrés Antemortem

El resultado de alguna variación en el hábitat natural del camarón genera una condición estresante. El estrés se ha definido como uno o varios factores (intrínsecos o extrínsecos) que alteran el equilibrio dinámico de un organismo (homeostasis). Una condición estresante en el camarón desata rápidamente una cascada de respuestas fisiológicas que usualmente pueden ser detectadas con facilidad. Algunos metabolitos utilizados para evaluar este estado fisiológico son: niveles de glucosa,

lactato, hemocianina, proteínas totales, lípidos totales, triglicéridos y colesterol, evaluados comúnmente en hemolinfa, branquias y en músculo (Mercier y col., 2006). Algunos factores ambientales en el ecosistema natural del camarón que pueden propiciar una condición estresante son: temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto (OD), entre otros.

Temperatura

La temperatura es el factor ambiental más importante en la vida de cualquier organismo. Los ajustes bioquímicos o fisiológicos que ocurran en cualquier adaptación, dependerán de reacciones metabólicas que involucren enzimas dependientes totalmente de este factor para su desarrollo. En camarón se ha visto que algunos procesos biológicos, como el crecimiento y la respiración, muestran cierta dependencia a aumentar o disminuir dependiendo de la temperatura. Las adaptaciones metabólicas de las cuales los camarones pueden valerse para prevenir los efectos promovidos por la variación de la temperatura son varios. En primer término se presenta la alternancia en las temperaturas óptimas de enzimas (i.e., enzimas de choque térmico) esenciales en la regulación de reacciones metabólicas involucradas en procesos de termorregulación. En segundo término, es la modificación en la tasa de calor corporal por efecto de la temperatura, a través de comportamientos mecánicos como el ejercicio, mecanismos autónomos como el aumento del metabolismo de las reservas energéticas y la elevación del metabolismo basal. Por último, hay intercambio de calor con el medio ambiente, regulación autónoma del flujo sanguíneo, y el control de la capa de grasa aislante activado por hormonas (Alpuche y col., 2005).

Cuando se presentan condiciones extremas de temperatura, la salinidad del medio aumenta modificando la presión hidrostática del agua, efecto que produce un cambio estructural en las membranas celulares. Por ejemplo, a bajas temperaturas, se da una concentración de fosfolípidos en la membrana celular, los cuales al reaccionar con la enzima Na^+/K^+ ATPasa, pasa de su forma inactiva a su forma

activa. La Na^+/K^+ ATPasa se activa para incrementar la presión osmótica interna y disminuir el punto de congelación de los fluidos extracelulares, lo cual les permite a los organismos sobrevivir (Alpuche y col., 2005).

Algunos estudios han mostrado que el crecimiento del camarón está fuertemente vinculado a la temperatura, el pH, la salinidad y a los niveles de oxígeno disuelto del agua (OD) (**Figura 2**). Zhang y col. (2006) encontraron que la temperatura influencia sobre el consumo de oxígeno en *L. vannamei*; los autores mostraron que la concentración letal de OD disminuyó ($P \leq 0.01$) al incrementar la temperatura de 14.5°C a 24.8°C y posteriormente aumentó ($P \leq 0.01$) al incrementar la temperatura de 24.8°C a 35°C . Estos autores atribuyeron este comportamiento estableciendo una relación lineal entre la concentración letal de OD y el incremento de la tasa metabólica del camarón blanco. Este comportamiento también ha sido observado en peces (Ishibashi y col., 2005), sin embargo no se han realizado investigaciones más específicas sobre este aspecto.

Estudios realizados por Ocampo y col. (2000) muestran que las temperaturas cercanas o por debajo de los 19°C disminuyen la tasa de crecimiento en especies como *F. californiensis* debido a una combinación de factores como: reducción de la tasa metabólica, disminución de la ingesta de alimento y reducción en la actividad física (aletargamiento). En contraste a lo anterior, a temperaturas entre 27 y 28°C , el camarón se mantiene activo la mayoría del tiempo y el consumo de alimento es alto y apropiado.

Salinidad

En el ambiente marino, la concentración de iones (sodio, magnesio, calcio, potasio, cloro, etc.) disueltos en el agua es de aproximadamente $35,000 \text{ mgL}^{-1}$; en cambio, en sistemas de cultivo acuícola, la concentración fluctúa entre $5,000 \text{ mgL}^{-1}$ y $40,000 \text{ mgL}^{-1}$, con variaciones diarias y estacionales. Debido a esto los camarones pueden experimentar problemas fisicoquímicos de ósmosis y difusión. Por ejemplo,

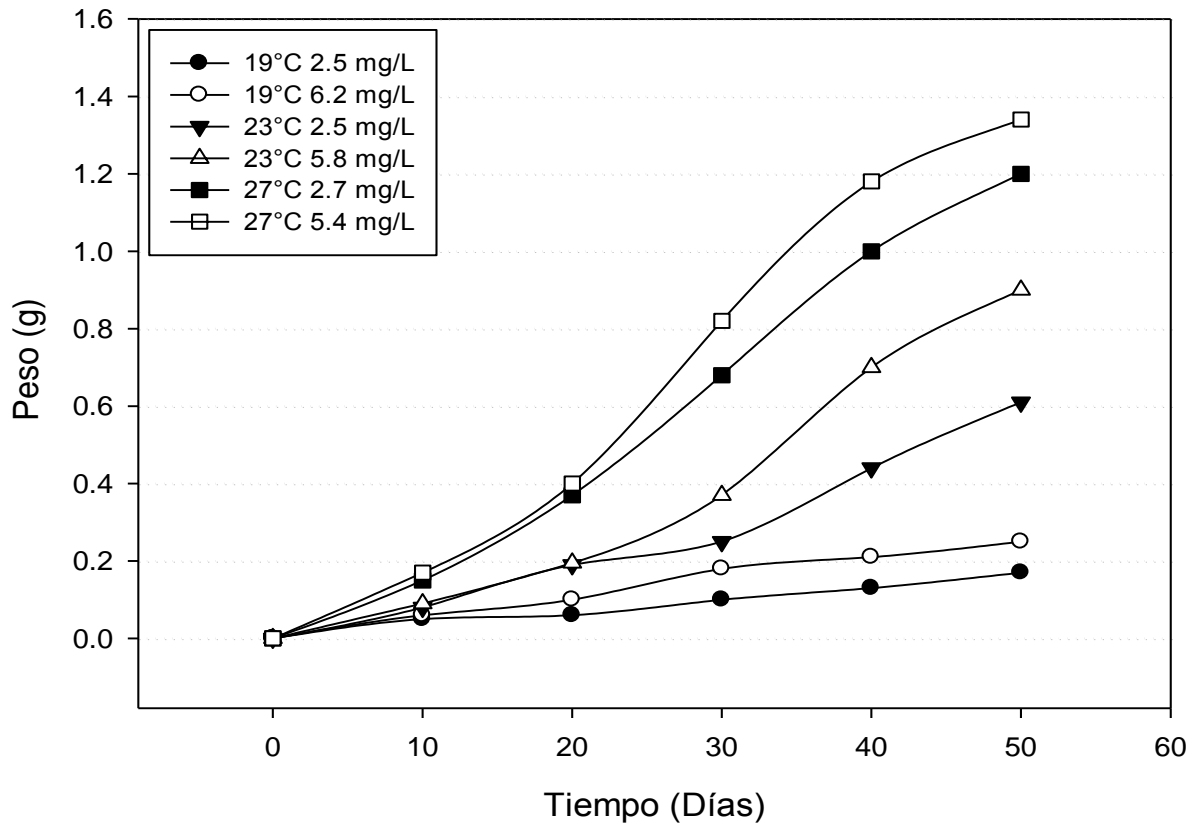


Figura 2. Promedio del peso ganado de *F. californiensis* a diferentes temperaturas y concentraciones de oxígeno disuelto durante 50 días de exposición. (Modificado de Ocampo y col., 2000).

Fuente: Aquaculture Research, 2000 (31):167-171.

en un ambiente diluido, los organismos deben resolver 2 problemas: la entrada de agua al cuerpo y la pérdida de sales corporales. Para contrarrestar estos efectos, los organismos son capaces de cambiar la permeabilidad de las branquias, generar abundante orina diluida a fin de conservar sales útiles y regular la presión osmótica interna. Los iones útiles que se pierden en la orina, se reabsorben a través de las branquias en donde el transporte activo de sales del epitelio al líquido intersticial y a las branquias, se ve favorecido por el intercambio de la bomba sodio/potasio (Alpuche y col., 2005). Cuando existe un cambio brusco en la salinidad del agua, el organismo tiene que ajustar su osmolaridad, modificando la concentración iónica interna. Esto es posible mediante el ajuste de aminoácidos (Gly, Ala, Pro, y Glu) intracelulares libres, debido a la acción enzimática de la glutamato deshidrogenasa (GDH) activada por iones orgánicos.

Zhang y col. (2009), estudiaron el efecto de diferentes salinidades sobre juveniles de la especie *L. vannamei*, demostrando una capacidad limitada de tolerancia a bajas concentraciones de salinidad ($<10,000 \text{ mgL}^{-1}$). Y en temperaturas relativamente bajas (20°C) (**Figura 3**). En contraste, el mismo estudio observó que el camarón pudo restablecerse en las primeras 24 horas, después de soportar cambios abruptos de salinidad (en un rango de $15,000$ a $40,000 \text{ mgL}^{-1}$). Por otro lado, estudios realizados por Villarreal y col. (2003), mostraron un aumento significativo ($P \leq 0.05$) en la tasa de mortalidad superior al 50% en camarón café (*F. californiensis*) a salinidades superiores a los $55,000 \text{ mgL}^{-1}$. Así pues, una disminución o incremento en la salinidad de las aguas de cultivo del camarón influye de manera significativa en el consumo de oxígeno, la excreción de compuestos nitrogenados, la tasa de alimentación. Y el proceso de crecimiento, afectando esto los porcentajes de mortalidad.

pH

Todos los organismos vivos tienen rangos óptimos de pH para su desarrollo. En la camaronicultura, este parámetro es muy variable en las aguas de cultivo, de tal

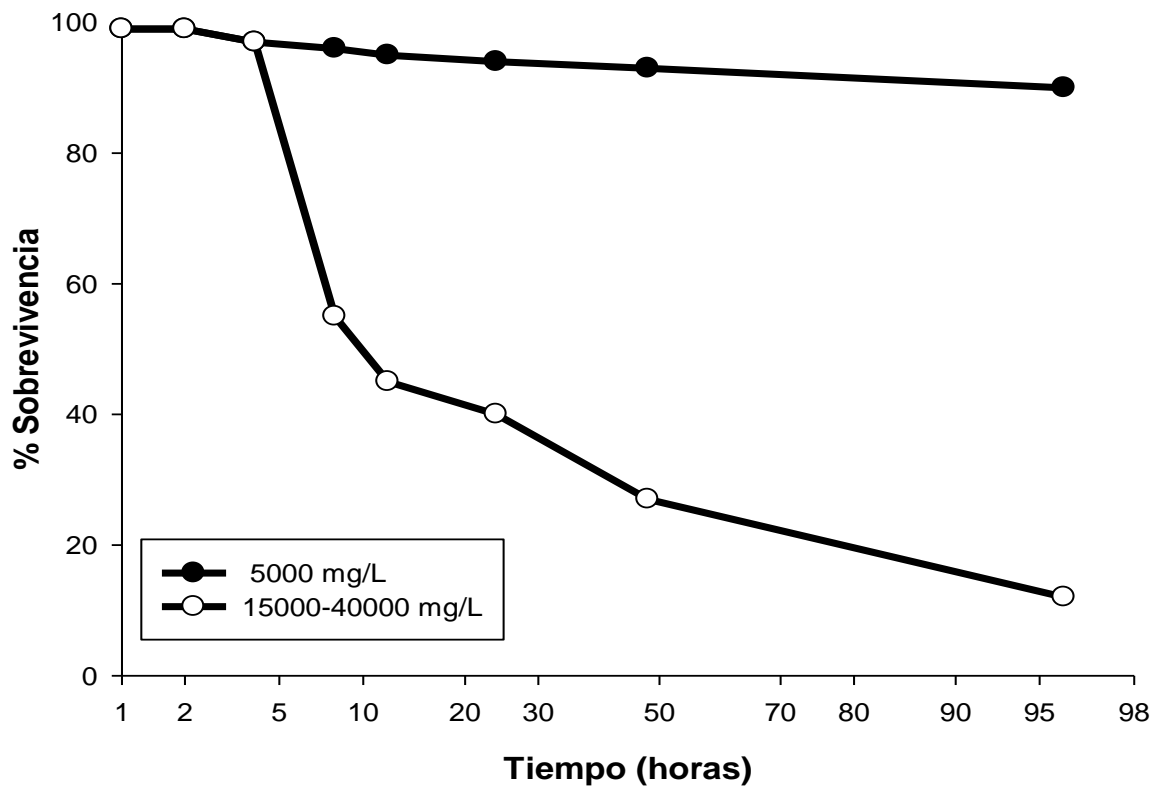


Figura 3. Sobrevivencia (a 20°C) de juveniles de la especie *L. vannamei* expuestos a diferentes cambios en la salinidad. (Modificado de Zhang y col., 2009).

Fuente: Aquaculture Research, 2009 (40): 1919-1427.

manera que puede incrementarse o disminuir de un día a otro e incluso en la transición del día a la noche. Lo anterior se debe al aumento de CO₂ debido principalmente al proceso de respiración del fitoplancton. El camarón puede tolerar valores de pH dentro del rango de 6.5 a 8.5; sin embargo existen diversos factores que condicionan este grado de tolerancia tanto en el ambiente marino como en los sistemas de cultivo. Dentro de los factores, se encuentran: la actividad metabólica del fitoplancton, la carga orgánica, concentración de iones amonio, oxígeno disuelto y otros iones comunes (Lazur, 2007). Zhang y col. (2006) evaluaron experimentalmente el comportamiento de *L. vannamei* a diferentes gradientes de pH, salinidad, OD y periodos de luminosidad, encontrando una relación directa ($r^2=0.99$) entre los valores letales de OD y pH 3.3 en el medio. Allan y Maguire (1991) mostraron que una disminución en el pH incrementó la sensibilidad a las bajas concentraciones de OD en *P. monodon*, mientras que Martínez y col. (1998) reportaron que la tolerancia de postlarvas de *L. setiferus*, en condiciones de hipoxia a pH 6, fueron menores a las obtenidas a pH 8.

Oxígeno Disuelto (OD)

Bajo condiciones normales en el océano, las variables ambientales (i.e., la salinidad, pH, oxígeno) se mantienen estables para el camarón. En cambio, en sistemas de cultivo se presentan incrementos de los niveles de OD durante el día, debido a la fotosíntesis del fitoplancton y a la microflora local acompañante. En contraste, durante la noche los niveles decrecen debido a la respiración, propiciando un ambiente de hipoxia tanto en la columna de agua como en los sitios más profundos del estanque (Magallón-Servín, 2004). El oxígeno es un substrato esencial para todas las reacciones metabólicas que sustentan la vida de los organismos aeróbicos, por lo que niveles bajos de OD pueden tener efectos adversos en el metabolismo del camarón. Respecto a esto, concentraciones iguales o por debajo de 3 mgL⁻¹ pueden llegar a disminuir la síntesis habitual de ATP, retardar el crecimiento, aletargar la actividad física y vulnerabilizan el sistema inmune (**Figura 4**) (Pérez-Rostro y col., 2004).

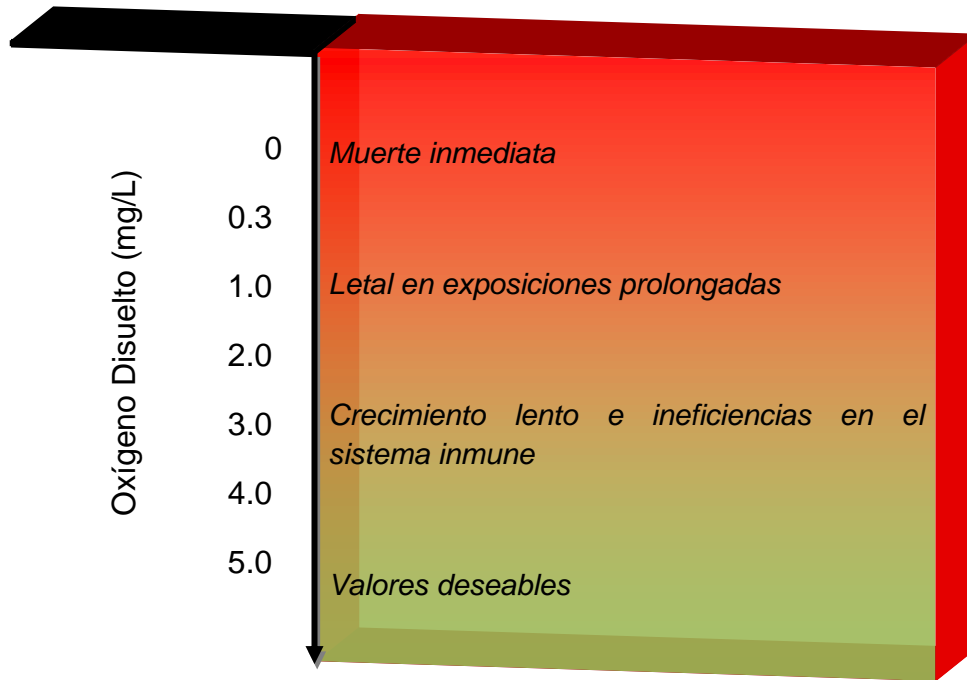


Figura 4. Efecto de la concentración de oxígeno disuelto sobre el camarón de cultivo. (Adaptado de Lazour, 2007).

Fuente: JIFSAN Good Aquacultural Practices Program: Growout Pond and Water Quality Management.

El metabolismo energético del camarón ha sido ampliamente estudiado, encontrando que bajo condiciones de hipoxia, la energía se obtiene parcialmente de rutas anaeróbicas (efecto Pasteur), representando una adaptación fisiológica parcial. En crustáceos expuestos a condiciones de hipoxia, la glucólisis anaeróbica es el principal camino alternativo para la obtención de energía. Ocampo y col. (2000) reportaron una reducción del 11% en la tasa de crecimiento del camarón café (*F. californiensis*) cuando los niveles de OD se encontraron cercanos a 2.7 mgL⁻¹. Mugnier y Soyez (2005) obtuvieron resultados comparables en condiciones similares de OD y temperatura, al estudiar a juveniles de camarón azul (*L. stylirostris*). Ambos estudios, concluyeron que un descenso relativo de la temperatura, disminuye de forma parcial la tasa metabólica, la demanda de oxígeno y el daño por hipoxia.

La tolerancia a condiciones de hipoxia entre especies marinas puede ser distinta, tanto para especies de peces (pelágicos y demersales) como para crustáceos y moluscos. Algunas especies de peces que se han estudiado muestran tolerancia a condiciones de hipoxia, como es el caso de la sardina escamosa (*Harengula jaguana*) (Goodman y Campbell, 2007) y la anguila Europea (*Zoarces viviparous*) (Breitburg y col., 2008). Mientras que entre crustáceos (*Callinectes sapidus*, *Euripanopeus depressus*, *Palaemonetes pugio*, *Penaeus aztecus*, *Litopenaeus vannamei* y *Rhitropanopeus harrisi*) y moluscos (*Crassostrea virginica* y *Thais haemastoma*), los crustáceos son más susceptibles y tienden a modificar en mayor grado su tasa metabólica producto de la exposición crónica de hipoxia (Stickle y col., 1989).

Anatomía General del Camarón

Se han descrito alrededor de 2,6000 especies de crustáceos, habitantes de biotopos propios de medios marinos, acuidulces y terrestres. Sin embargo, la clase es primordialmente acuática, con una mayoría de especies habitando el entorno marino. Los crustáceos se exhiben como miembros de los artrópodos, los cuales presentan tres características fundamentales: un primer par de antenas en el

segundo tetrámero; un segundo par de antenas en el tercer tetrámero y un par de mandíbulas en el cuarto tetrámero. Sin embargo, algunas de estas características son compartidas con los insectos, quilópodos, diplópodos, sínfilos y los paurópodos, es decir, con todas las clases de artrópodos que integran la sub clase de los mandibulados. Pero existe una característica fundamental para diferenciar a los crustáceos del resto de los artrópodos, esto es, la posición de un par de antenas en el tercer tetrámero (Ruppert y Barnes, 1996).

Fundamentalmente, el camarón está constituido por tres regiones anatómicas: el cefalotórax (cabeza), pleon (abdomen) y telson (cola) (**Figura 5**). En la cabeza se sitúan los órganos vitales incluyendo al estómago, hepatopáncreas y corazón. Mientras que el abdomen se encuentra dividido en seis segmentos terminando con una estructura puntiaguda llamada telson. El sistema muscular del camarón aparece segmentado, dado que está dividido por inserciones de tejido conectivo en segmentos musculares o miómeros. En la parte abdominal provista de apéndices, así como en el tórax, no hay un tubo muscular continuo, sino pares de bandas dorsales y ventrales que pasan, por encima y debajo de las inserciones apendiculares respectivamente. Las bandas dorsales parten de la parte frontal de la región cefálica y las ventrales de una placa fuerte y fibrosa, denominada apodema cefálico, situada inmediatamente por detrás del esófago. En forma general, todos los músculos del camarón son estriados, característica que también aplica al resto de los artrópodos (Ruppert y Barnes, 1996).

De las regiones anatómicas antes descritas, la región abdominal del camarón es la parte de mayor consumo. Se sabe que su carne es una excelente fuente de proteínas y de ácidos grasos esenciales como el eicosapentanoico (EPA) y el docosahexanoico (DHA). Además de lo anterior, la carne del camarón representa una buena fuente de minerales como es el calcio (Sriket y col., 2007).

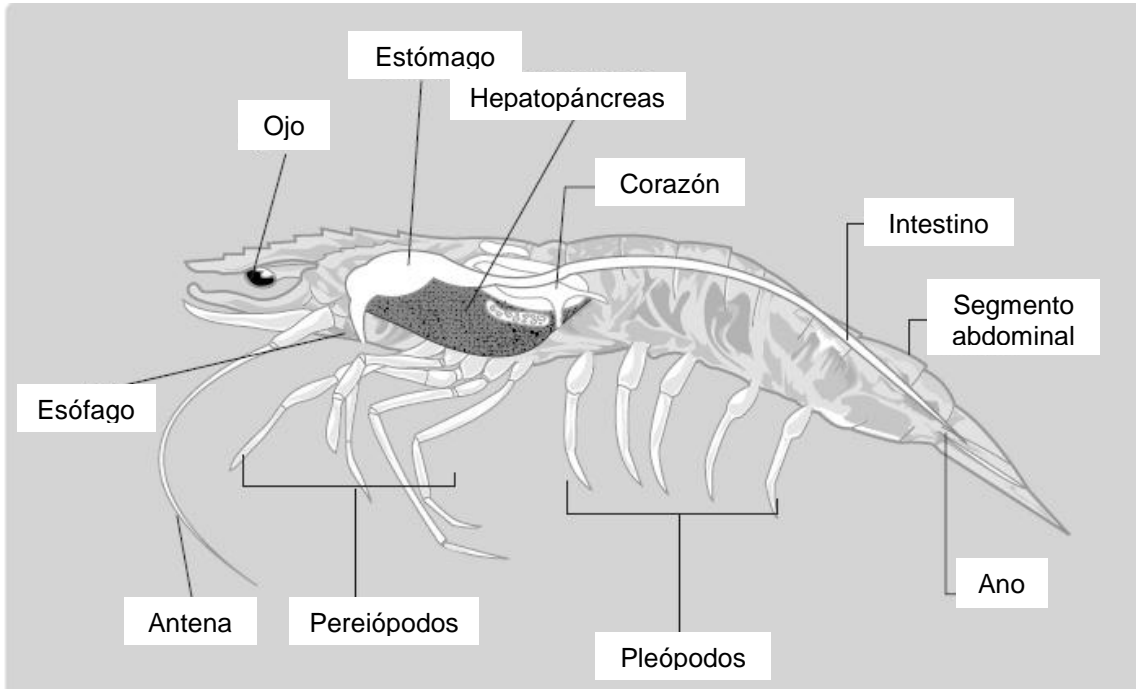


Figura 5. Anatomía externa del camarón.
Fuente: FAO Fisheries Technical Paper 402/2.

Cambios Bioquímicos Posmortem

Después de la muerte, tanto mamíferos como organismos acuáticos presentan diversos cambios bioquímicos. Estos cambios en el músculo se efectúan por dos vías: endógena y microbiana. La primera se lleva a cabo por enzimas propias de la especie, que permanecen activas aún después que haya muerto el animal, mientras que la segunda se experimenta por enzimas secretadas por bacterias. A partir de estos cambios que involucran la degradación de los principales constituyentes químicos del músculo (proteínas, carbohidratos, lípidos y compuestos nitrogenados), se producen metabolitos que pueden ser utilizados como índices de calidad.

La calidad del músculo de cualquier organismo marino (peces, crustáceos, moluscos) disminuye inmediatamente después de su captura y muerte del animal. Esto se debe a la interrupción de la circulación sanguínea, cesando el transporte de oxígeno y las defensas naturales contra microorganismos. Posteriormente se desarrollan una serie de cambios bioquímicos como: producción de energía a partir de las reservas de glucógeno, degradación de la molécula adenosina trifosfato (ATP), *rigor mortis*, disminución del pH muscular, autólisis por proteasas endógenas, desnaturalización de proteínas, oxidación de lípidos y producción de compuestos indeseables como trimetilamina (TMA) y bases volátiles de bajo peso molecular por acción bacteriana.

En forma general, investigaciones realizadas sobre los cambios posmortem en especies de crustáceos y langostinos describen una disminución de los niveles de ATP (**Figura 6**), con un correspondiente incremento en adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), hipoxantina y degradación autolítica por enzimas contenidas en hepatopáncreas (Lou, 1998; Lakshmanam y Gopakumar, 1999). Esto tiene como consecuencia la liberación de enzimas proteolíticas y colagenolíticas de este órgano hacia el músculo (Martínez y col., 2001). Estas enzimas liberadas tienen afinidad sobre los principales constituyentes del músculo como es el caso de proteínas miofibrilares y tejido conectivo, los cuales

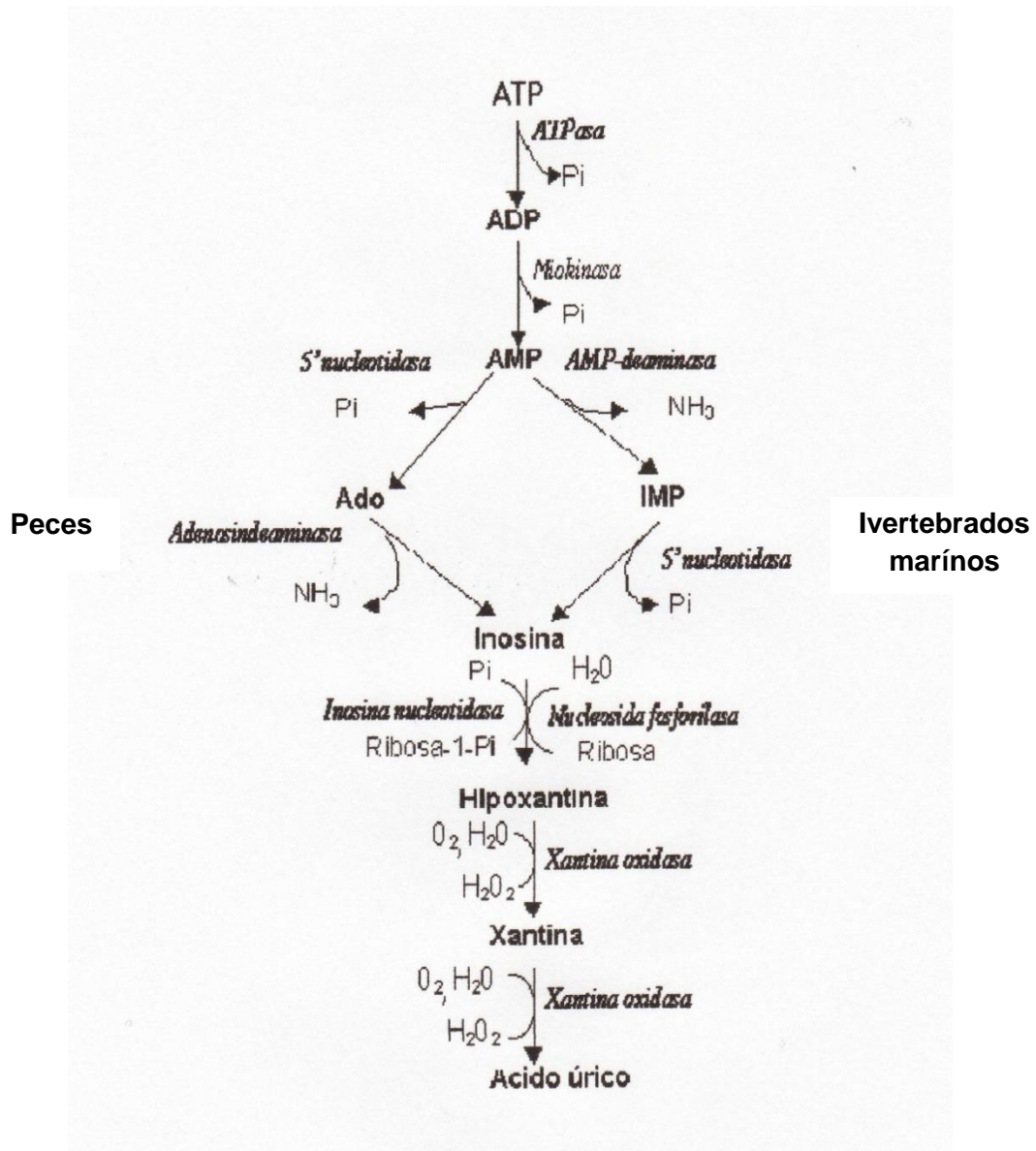


Figura 6. Degradación enzimática del ATP

participan como sustrato de reacciones enzimáticas que pueden inducir cambios físicos y bioquímicos en el músculo.

A continuación se describen brevemente los principales cambios posmortem que suceden en organismos acuáticos.

Rigor mortis

El *rigor mortis* es uno de los procesos posmortem más importantes en el músculo de las especies marinas. Inmediatamente después de la muerte, el músculo se encuentra relajado y su textura es firme y elástica al tacto. Al morir, el suministro de oxígeno proveniente de la respiración se ve obstruido provocando que detenga la síntesis de ATP. Bajo esta situación, las reservas de ATP en las células comienzan a utilizarse hasta a agotarse y cuando esto pasa, el mecanismo de contracción-relajación se detiene dejando el músculo contraído (en *rigor*).

El *rigor mortis* es causado por la unión de las cabezas de la miosina extendidas radialmente al centro activo de los filamentos delgados de la actina, provocando la formación de una estructura rígida de los filamentos. Esta reacción es debida al cambio en las proteínas de regulación como troponina y a la concentración de calcio en el sarcoplasma. A concentraciones de ATP por debajo de 10^{-4} M y calcio por encima de 10^{-6} M se propicia el rigor mortis. Es así que, cuando el músculo se vuelve rígido e inflexible, se dice que se encuentra en *rigor mortis* (Huss, 1995). Con el inicio del *rigor* se lleva a cabo una disminución del pH muscular, debido a la generación de ácido láctico (glicolisis anaeróbica) y su consecuente disociación. Cheftel y Cheftel (1976) propusieron que la resolución del *rigor mortis* no parece ser el resultado de la disociación del complejo acto-miosina generado durante el *rigor*, sino más bien se debe a la separación de los filamentos delgados de actina de la línea Z. Lo anterior, debido a modificaciones iónicas del medio ambiente o por la acción de enzimas endógenas (catepsinas) contenidas en los lisosomas y liberadas

al lisarse la membrana lisosomal como resultado de la caída de pH. Las catepsinas son enzimas proteolíticas que se encargan de la degradación posmortem del sistema proteico miofibrilar, y su actividad tiene un impacto importante en las propiedades físicas de la carne (Bechtel, 1986).

El tiempo involucrado en cada una de las etapas de desarrollo, duración y subsecuente resolución del *rigor mortis* en especies marinas depende de muchos factores, tales como: especie, talla, método de captura, manipulación, temperatura, desgaste energético antes de la muerte y condiciones físicas del pescado (Huss, 1995). Usualmente, el *rigor mortis* se presenta en el pescado entre una y seis horas posmortem, y se resuelve en 1-2 días, siempre y cuando se encuentre almacenado a bajas temperaturas (0-4°C) o en muy pocas horas cuando se almacena a altas temperaturas (Gornik y col., 2009). Para camarón blanco (*L. vannamei*) almacenado en hielo, el *rigor mortis* tiene inicio y resolución entre 5 y 30 h después de la muerte. Los principales cambios posmortem en esta especie son: consumo y descenso de las concentraciones de ATP y síntesis de ácido láctico en ocasiones a partir de 3 h posmortem, seguido de la acumulación de AMP, el cual es transformado lentamente a IMP en las subsecuentes horas (Díaz-Tenorio, 2006). Por otro lado, estudios realizados por Wilaichon y col. (1997) en camarón *P. setiferus* (descabezado *in vivo*) almacenado a 0°C, indicaron un inicio y resolución del *rigor mortis* a las 7 y 11 h posmortem, respectivamente. De este estudio se concluyó que el ejercicio durante la captura y descabezado, ocasiona el consumo de la concentración de ATP, propiciando un inicio y resolución del *rigor* prematuros.

Disminución de pH muscular

Cuando el pH del musculo disminuye hasta alrededor de 6.0, se alcanza el pH óptimo para la actividad ATPasa de miosina, y es en este punto donde la concentración de ATP decrece rápidamente hasta volverse insuficientes para mantener el proceso de contracción-relajación de las proteínas contráctiles (miosina

y actina). Cuando este proceso se detiene, el músculo permanece contraído en un proceso irreversible con la formación del complejo actino-miosina manifestando la llegada del *rigor mortis*. Después que se produce la acumulación de ácido láctico (glicolisis anaeróbica) y disociación de sus protones, el pH del músculo decrece conforme avanza la bioquímica posmortem. La tasa de disminución del pH está muy relacionada con el tipo de músculo, y esto a su vez, depende de sus características contráctiles y metabólicas. La duración de la caída del pH depende principalmente de las reservas de glucógeno y ATP al morir, de la tasa de conversión del ATP y de la capacidad amortiguadora del músculo; por ejemplo, del potencial oxidativo y glicolítico junto con las propiedades contráctiles del músculo (Jiang, 1998).

Desnaturalización de proteínas

La desnaturalización de proteínas se describe como un fenómeno complejo que involucra la alteración en la estructura nativa de la proteína; estos cambios incluyen la ruptura de enlaces que contribuyen a la estabilidad de la estructura nativa, sin la ruptura de enlaces covalentes (peptídicos) a través de la cadena polipeptídica (Sikorski, 1976). Cuando se presenta la desnaturalización, las propiedades funcionales de las proteínas se ven disminuidas. Los principales factores que influyen sobre la desnaturalización de proteínas incluyen: el pH, concentración de sales, fuerza iónica, tensión superficial, efectos físicos provocados por la formación de cristales de hielo y la deshidratación (Moosavi-Nasab y col., 2005).

La hidrólisis de las proteínas miofibrilares es considerada como resultado del desarrollo del *rigor mortis* y el proceso de tenderización. En este caso, la actividad enzimática juega un rol muy importante al momento de actuar sobre las proteínas contráctiles. En el músculo, la relación posmortem entre tiempo y temperatura tiene un efecto profundo sobre la integridad y estabilidad de las proteínas, mientras que el proceso de tenderización es asumido a la actividad de enzimas proteolíticas que se

activan conforme van disminuyendo los valores de pH durante el *rigor mortis* (Jiang, 1998).

Se han descrito diferentes propuestas para explicar cómo se da la degradación enzimática endógena del músculo, con el objetivo de interpretar como se induce y regula este proceso. El sistema endógeno de enzimas calpainas juega el papel más importante en la regulación proteolítica posmortem de las proteínas musculares (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005). Las calpainas tienen afinidad sobre proteínas como la desmina, sinemina, talina y vinculina que forman parte de la estructura citoesquelética del músculo. Este sistema enzimático de calpainas está compuesto por una serie de cistein-proteasas que se activan en presencia de los iones calcio liberados durante la fase de *rigor*, de las cuales se han caracterizado dos clases de ellas: μ -calpainas y m-calpainas. La actividad enzimática de las calpainas en el músculo es regulada por un inhibidor competitivo, las calpastatinas (Belitz y col., 2009).

Se ha propuesto que las calpainas tienen un comportamiento cooperativo y sinérgico con las catepsinas. La mayoría de las enzimas catepsinas son endopeptidásas contenidas en los lisosomas que, durante el proceso del *rigor* y disminución del pH, son liberadas hacia los espacios extracelulares donde utilizan como sustrato a las proteínas miofibrilares (Jiang y col., 1997).

Cambios Bioquímicos y Fisicoquímicos en Productos Marinos Durante el Almacenamiento por Congelación

Cuando un pez muere, de inmediato se inician en su tejido muscular, una serie de cambios químicos, físicos, microbiológicos e histológicos. Este suceso se relaciona usualmente con la pérdida de calidad, o el desarrollo de diversos compuestos que afectan la calidad de los productos pesqueros. Regularmente, cuando se habla de pérdida de calidad se refiere a los cambios físicos indeseables ó

atributos de aceptación del producto al momento de ser adquirido por el consumidor (Rahman, 2007).

Idealmente, se pensaría que no debería de haber diferencia alguna entre un pescado fresco, y otro que haya sido congelado y descongelado; sin embargo, esto no se cumple en la mayoría de los casos. Aunque la finalidad de la congelación es mantener buenos atributos de calidad y frescura, antes de que estos productos sean consumidos o utilizados en algún otro proceso tecnológico, se sabe que los cambios por deterioro en productos pesqueros, pueden tener lugar durante la congelación, el almacenamiento (en congelado) y la descongelación, mismos que influyen en la calidad final del producto. Por ello, para evitar dichos cambios, se recomienda que la congelación de los productos pesqueros se lleve a cabo a una temperatura de -30°C o menos.

Durante el proceso de congelación, la velocidad de formación y el tamaño de los cristales de hielo en el músculo, contribuyen a la modificación de la textura del producto. En algunos casos, el tipo de congelación y/o la velocidad con la que lleva a cabo este proceso pueden originar regiones en el músculo donde se concentran los solutos como carbohidratos, lípidos, proteínas y sales. Debido a esto, existe la posibilidad de experimentar cambios de pH, presión osmótica y fuerza iónica pudiendo alterar las propiedades del músculo y promover la desnaturalización de proteínas, oxidación de lípidos y degradación enzimática de óxido de trimetilamina (TMAO), generando cambios en la calidad (Hui y col., 2004). Por esta razón, es esencial entender las reacciones que se pueden presentar en productos pesqueros congelados, y así, buscar encontrar y garantizar los atributos óptimos de calidad por tiempos prolongados de almacenamiento.

Desnaturalización de Proteínas

Las proteínas del pescado y diversos organismos acuáticos son particularmente susceptibles a la desnaturalización por congelación, comparadas con

las demás proteínas de origen animal. Este fenómeno puede ser estudiado midiendo las alteraciones en las superficies hidrofóbicas, composición de aminoácidos, estabilidad conformacional, solubilidad, agregación y actividad enzimática. Se ha demostrado que la desnaturalización modifica la textura y las propiedades funcionales de las proteínas. La textura del músculo puede volverse más fibrosa y flácida promovida por la pérdida de solubilidad y capacidad de retención de agua. Estos cambios en la textura, dan lugar a diversos atributos sensoriales indeseables como una apariencia seca y pérdida de jugosidad, factores que podrían repercutir en el grado de aceptabilidad de un producto (Haard, 1992).

Otro efecto negativo que propicia la congelación, es la insolubilidad de la fracción proteica miofibrilar, puesto que aumenta la fuerza iónica en la fase líquida durante la formación de cristales de hielo. Estos cambios se transcriben a una desestabilización de las fuerzas que mantienen la estructura nativa, e induce un desenvolvimiento aumentando las interacciones proteína-proteína (Makri, 2009). Este desenvolvimiento de la proteína tiene como resultado la exposición de grupos funcionales con la capacidad de reaccionar con otras moléculas proteicas u otros componentes del músculo como son los carbohidratos y los lípidos, formando complejos de mayor peso molecular y menor solubilidad.

La pérdida de funcionalidad en las proteínas se evalúa comúnmente midiendo las propiedades de capacidad de retención de agua (CRA), viscosidad, gelificación, capacidad emulsificante y de espumado (Xiong, 1997). En estudios realizados por Li-Chang y col. (1985), se estableció un orden de desnaturalización de las proteínas del músculo de pescado congelado (-10°C), siendo las proteínas miofibrilares las primeras en sufrir modificaciones estructurales, seguidas de las proteínas sarcoplásmicas y finalmente las proteínas del estroma. Esta desnaturalización puede ser propiciada por uno o varios factores que han sido estudiados tales como; la formación de cristales de hielo, efecto de la deshidratación, concentración de solutos, interacción de las proteínas con lípidos o ácidos grasos libres e interacción con

compuestos derivados de la oxidación de lípidos (Shenouda, 1980). A continuación se describen brevemente algunos de estos factores de importancia para este trabajo:

Formación de cristales de hielo. La formación amorfa de cristales de hielo, puede ocasionar daño físico al tejido y la consecuente ruptura de la estructura miofibrilar. El tamaño y la ubicación de los cristales durante la congelación, se ve influenciado por el tipo de congelación, el tiempo de almacenamiento y la fluctuación en la temperatura de almacenamiento (Xiong, 1997). En un ciclo de congelación lento, el fluido extracelular se enfría rápidamente en comparación con el intracelular; ese super enfriamiento del fluido extracelular alcanza una temperatura crítica, lo cual causa que el agua se separe de los solutos y forme los cristales de hielo. En cambio, en un ciclo rápido de congelación, el agua intracelular se enfría rápidamente dando lugar a cristales pequeños a lo largo de las fibras musculares. Usualmente estos cristales pequeños se forman separados de las proteínas en el interior de la célula, lo que representa que haya menos probabilidades de que las proteínas sufran cambios conformacionales por deshidratación (Hung y Erickson, 1997).

En los últimos años se ha incrementado el estudio en el comportamiento microscópico de los alimentos congelados, siendo unos de los principales aspectos que se han abordado, la velocidad de congelación y el tamaño de los cristales de agua que se forman durante este proceso. Además, se ha visto que el uso de la congelación rápida (minutos) a muy bajas temperaturas (inferiores a -30°C) tiene una aplicación muy practica para conservar la calidad de los alimentos (Magnussen y col., 2008).

Durante la congelación, la difusión de agua de los espacios intracelulares hacia los extracelulares, se representa como una exudación del músculo que se puede observar durante la descongelación (Jiang y Lee, 2004). Dicho exudado puede contener proteínas, péptidos, aminoácidos, ácido láctico, vitaminas del complejo "B" y algunas sales en solución. Cuando se experimentan fluctuaciones en las temperaturas de almacenamiento, se provoca la recrystalización ó agregación de

cristales, que consiste en la fusión de los cristales de agua, para dar lugar a cristales de mayor tamaño. Éste proceso, es comúnmente observado en alimentos almacenados a temperaturas cercanas a la zona crítica (-0.8 a -5°C), donde se presenta una variación en la morfología del cristal y cierta movilidad de los mismos, propiciando daño y aceleración de la desnaturalización proteica (Hung y Erickson, 1997).

Deshidratación. En general, la estructura nativa de las proteínas es estabilizada por muchas fuerzas, incluyendo los puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, interacciones electrostáticas y enlaces disulfuro. Cuando estas fuerzas se desestabilizan, la proteína puede desdoblarse su estructura nativa y modificar su arreglo tridimensional (Benjakul y Bauer, 2000). Durante la congelación, la formación de hielo remueve agua de las proteínas provocando su deshidratación. Esta interrupción de los enlaces entre las moléculas de agua y la proteína nativa, provoca la exposición de sitios hidrofílicos o hidrofóbicos de la molécula (Shenouda, 1980). Estos cambios en las propiedades de hidratación de la molécula inducen fenómenos de agregación entre proteínas mediante interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas e incluso mediante interacciones covalentes, como la formación de puentes disulfuro.

Concentración de solutos. Las proteínas del músculo se encuentran interactuando con las moléculas de agua, pudiendo estar o no, en contacto con otros componentes celulares. La proporción de agua congelada en un proceso de congelación, depende de la cantidad y la naturaleza de los solutos disueltos, incluyendo los componentes iónicos como las sales. En la congelación, mientras se da la formación de cristales, aumenta la concentración de sales minerales y sustancias orgánicas solubles en la región de la matriz no congelada, lo cual puede causar una modificación de pH (Einen y col., 2002), la fuerza iónica y cambios conformacionales en las proteínas, induciendo su desnaturalización. Los iones concentrados en la matriz, compiten con las fuerzas electrostáticas existentes, interrumpiendo las interacciones agua-proteína promoviendo interacción y agregación de las cadenas polipeptídicas de las proteínas

(Shenouda, 1980). Este proceso de agregación puede ser reversible dependiendo del grado de desestabilización que haya sufrido la proteína, de tal forma que al modificar la fuerza iónica del ambiente proteico a su estado inicial, la proteína tenga la capacidad de volverse a rehidratar. El proceso puede ser irreversible cuando durante el desenvolvimiento de la proteína se logran exponer grupos reactivos como los –SH que pueden reaccionar con otros grupos funcionales y formar uniones covalentes (Belitz y col., 2009).

Oxidación. Los procesos oxidativos también contribuyen a la desnaturalización de las proteínas durante el almacenamiento en congelación. Las proteínas expuestas a ambientes oxidativos son susceptibles a diferentes cambios químicos, como destrucción de aminoácidos, hidrólisis peptídica y formación de complejos lípido-proteína. Algunos de los agentes oxidantes son enzimas, grupos heme y metales de transición almacenados en los organelos de la célula. Pero también existen otros agentes oxidantes de las proteínas, aquellos que provienen de la oxidación lipídica y que pueden ser generados durante el proceso de congelación-descongelación. Muchos de los productos provenientes de la degradación de lípidos como al malonaldehído, propanal y hexanal, pueden reaccionar formando enlaces covalentes con grupos específicos funcionales de los residuos de las proteínas, incluyendo a los grupos –SH de cisteína, amino de lisina y amino N-terminal del ácido aspártico, tirosina, metionina y arginina. Muchas de estas interacciones incrementan la hidrofobicidad de las proteínas, haciéndolas poco solubles en agua y afectando sus propiedades de hidratación (Santos-Yap, 1995).

Efecto de los Ciclos de Congelación-Descongelación

La congelación es un método muy importante para preservar la calidad de los productos marinos. Sin embargo, el proceso de congelación y el almacenamiento como tal, pueden llegar a afectar atributos de calidad como la textura, sabor y color de los productos pesqueros (Benjackul y Brauer, 2000). Así, la pérdida de calidad es

un proceso dependiente de varios factores, incluyendo las condiciones de temperatura, velocidad y la cantidad de ciclos de congelación-descongelación que hayan tenido lugar durante el almacenamiento (Srinivasan y col., 1997; Díaz-Tenorio y col., 2007; Alizadeh y col., 2007).

El proceso de congelación induce cambios en el músculo debido a la formación y propagación de cristales de hielo, su deshidratación e incremento de solutos. Durante la congelación se rompen las estructuras celulares del músculo, liberando enzimas de los componentes mitocondriales contenidos en el sarcoplásma, las cuales juegan un papel sumamente importante en los procesos de proteólisis endógena (Sikorski, 1976). Por otra parte, durante el proceso de descongelación se puede presentar la pérdida de agua por exudación, deshidratación que se traduce en un incremento de la dureza (resistencia al corte) del músculo, combinado con una apariencia seca y pérdida de solubilidad de las proteínas miofibrilares. Todos estos cambios se atribuyen principalmente a la desnaturalización por agregación y formación de enlaces entrecruzados entre las moléculas de miosina (Benjackul y Brauer, 2000; Tseng y col., 2003; Sriket y col., 2007). Adicionalmente, después de varios ciclos de congelación-descongelación también se pueden presentar cambios en la integridad y microestructura del músculo; esto debido a la destrucción y deslocalización de los discos Z, resultando una estructura de los paquetes miofibrilares menos compacta (Sriket y col., 2007).

En algunas especies marinas, la oxidación de lípidos también tiene lugar en el músculo durante los procesos de congelación-descongelación (Castrillón y col., 1996; Tseng y col., 2003). En sí, la oxidación de lípidos se favorece con el daño mecánico del tejido propiciado por este proceso, lo cual se refleja en las propiedades de textura del músculo (Shenouda, 1980). La oxidación rápida de los lípidos durante los ciclos de congelación-descongelación, mantiene una estrecha relación con la liberación de enzimas oxidativas y agentes prooxidantes de varios organelos celulares, que al utilizar a los lípidos como substrato en la reacción de oxidación, generan compuestos como peróxidos que al degradarse forman productos finales de

oxidación como el hexanal, propanal y malonaldehído (Srinivasan y col., 1997). Los compuestos derivados de la degradación enzimática de los lípidos, son los responsables, en gran medida, de la agregación de las proteínas miofibrilares.

La seguridad alimentaria y cualidades sensoriales de los productos pesqueros representan actualmente dos de las principales preocupaciones de los consumidores. Por ello, es importante medir el impacto de los métodos de preservación sobre los atributos de calidad del músculo. Se deben elegir métodos más eficientes de congelación para prevenir la pérdida de calidad durante el transporte y el almacenamiento, puntos críticos donde llegan a generarse de forma no intencionada los ciclos repetidos de congelación-descongelación (Boonsumrej y col., 2006; Díaz-Tenorio y col., 2007).

Evaluación de la Estabilidad del Sistema Proteico Miofibrilar

El deterioro de la calidad en los productos marinos durante el almacenamiento en fresco o en congelación ha sido ampliamente estudiado (Shenouda, 1980; Kye y col., 1988; Castrillon y col., 1996; Pacheco-Aguilar y col., 2000; Makri y col., 2009). Para evaluar la calidad y estabilidad del músculo, se han propuesto diversos métodos clasificados como: físicos, químicos, bioquímicos y sensoriales. Así mismo, en función del método, se han agrupado en dos categorías, una integrada por pruebas sensoriales o subjetivas, y la otra por determinaciones instrumentales u objetivas (Huss, 1995). Enseguida se describen algunas de las propiedades que son utilizadas para evaluar la estabilidad e integridad del músculo de productos marinos.

Capacidad de Retención de Agua (CRA)

El principal constituyente del músculo de productos marinos es agua, y representa aproximadamente el 70% de su peso en fresco. En el músculo, las proteínas miofibrilares, actina y miosina principalmente, son las responsables de la

CRA. La CRA puede ser definida como la capacidad y habilidad que posean las proteínas del músculo para mantener inmovilizadas a las moléculas de agua, o la añadida, durante la aplicación de cualquier fuerza. Una fluctuación abrupta de pH en el ambiente de las proteínas afecta significativamente la CRA. Lo anterior se observa principalmente durante el *rigor mortis* donde hay una disminución del pH de 7 hasta aproximadamente 5.5, cerca del punto isoeléctrico de las proteínas (Hudson, 1982).

La CRA en el músculo, es influenciada por variables de procesamiento, manipulación, *rigor mortis*, almacenamiento, temperatura, congelación y secado. Alguna variación en el ambiente natural de las proteínas del músculo (i.e., pH, fuerza iónica, temperatura, etc.) ejercerá un cambio en la CRA de sus proteínas debido a la modificación de las interacciones entre sus proteínas y las moléculas de agua. La medición de este tipo de parámetros objetivos en el músculo intacto es muy importante debido a que puede ser utilizada como una prueba para estimar el grado de desnaturalización de las proteínas. Este método mide el volumen de agua perdida por exudación. Este procedimiento es relativamente sencillo, y puede reflejar la disminución en la capacidad de las proteínas de reabsorber el agua durante la descongelación (Shenouda, 1980).

La deficiencia en la capacidad de retención de agua de los productos cárnicos y sus derivados, genera pérdidas de millones de dólares anuales en la industria alimentaria (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005). Para las aplicaciones en alimentos la capacidad de retención de agua se refiere a la capacidad para embeber agua y retenerla contra una fuerza gravitacional dentro de una matriz proteica, como en geles ó músculos de carne y pescado. Por ejemplo, la capacidad de atrapar agua se asocia con la jugosidad y suavidad de la carne picada para alcanzar la textura requerida en los embutidos (Badui, 2006).

Solubilidad de Proteínas

La solubilidad de una proteína es la manifestación termodinámica del equilibrio

de las interacciones proteína-proteína y solvente proteína, que a su vez dependen de la hidrofobicidad e hidrofiliidad y naturaleza iónica de las mismas (Badui, 2006). Esta propiedad se rige por diversos factores como son a) su grado de hidratación, b) densidad y distribución de cargas, y c) presencia de compuestos no proteicos como fosfatos, carbohidratos o lípidos. La solubilidad de las proteínas está íntimamente relacionada con su estado estructural, por lo que esta propiedad se puede utilizar como un indicador de grado de desnaturalización durante los procesos de extracción, aislamiento y procesos de purificación, ó como indicador en aplicaciones potenciales de las proteínas.

La prueba de solubilidad total de proteínas se utiliza con mayor frecuencia para estudiar los cambios que ocurren durante el almacenamiento por congelación de productos pesqueros. Estos cambios están relacionados con la pérdida de solubilidad de los principales grupos de proteínas: las proteínas sarcoplásmicas y las miofibrilares. Las condiciones de extracción utilizadas en esta técnica usualmente no están estandarizadas, por lo que el porcentaje de extracción de las proteínas dependerá del tipo de sales utilizadas, la fuerza iónica, la incorporación de detergentes como el dodecil-sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés), el pH y la capacidad del buffer. Además, existen otros factores que influyen sobre la solubilidad como la cantidad de músculo utilizado y las condiciones de agitación y/o centrifugación. Todas las variables antes mencionadas determinan el tipo y el grado de solubilización de la mayoría de las proteínas (Shenouda, 1980).

Estudios en el área de productos pesqueros han mostrado claramente una relación entre la disminución del porcentaje de extracción de proteínas y el incremento en la flacidez del músculo de pescado (Kye y col., 1988; Castrillon y col., 1996; Ramírez y col., 2000). Haciendo una comparación entre las proteínas miofibrilares y las sarcoplásmicas; las proteínas sarcoplásmicas tienden a ser más estables bajo congelación permaneciendo su solubilidad relativamente invariable, excepto en aquellos casos donde los periodos de almacenamiento son más pronunciados. En cambio, en el grupo de las proteínas miofibrilares, la miosina es la

proteína con más tendencia a la insolubilización por efecto de agregación, mientras que actina solo experimenta pequeños cambios. La tropomiosina es la proteína miofibrilar más estable que se ha evaluado bajo congelación (Matsumoto, 1979).

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés)

El calor inducido en sistemas proteicos propicia un cambio en energía de transición (ΔH), este cambio puede ser detectado por medio de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y se expresa como el resultado de desnaturalización o desdoblamiento de la estructura nativa de la proteína. Uno de los parámetros más estudiados con esta técnica, es la medición de la temperatura cuando ocurre la transición. Esta temperatura específica corresponde al pico máximo de desnaturalización, y puede ser denotada con distintos símbolos (T_d , T_m , T_{max}) (Hudson, 1982).

El deterioro de las proteínas del músculo de organismos acuáticos puede tener lugar durante la aplicación de algún tipo de procesamiento, durante su congelación y/o durante la aplicación de varios ciclos de congelación-descongelación. Hastings y col. (1985) sugirieron que la estabilidad de miosina puede variar de acuerdo a la temperatura del hábitat y a la variabilidad de cada especie. La estabilidad térmica y funcionalidad del sistema acto-miosina, en diversas especies de pescado y crustáceos ha sido estudiado por DSC. Srinivasan y col. (1997) mostraron que la entalpia de desnaturalización (ΔH) para miosina en músculo de langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) congelado disminuyó hasta en un 21%, sugiriendo que este comportamiento puede agravarse al aplicar ciclos repetidos de congelación-descongelación. De la misma forma, Tseng y col. (2002), utilizaron DSC para determinar la estabilidad térmica de actina y miosina en músculo de langosta (*Cherax quadricarinatus*) a 0°C, encontrando una reducción en la entalpia de desnaturalización de miosina, de más del 60% durante los primeros 14 días de almacenamiento. Esto significa, en términos termodinámicos, que la estructura

espacial de la proteína se desarrolló (desnaturalizó) parcialmente requiriendo menos energía calorífica para completar su desnaturalización.

Análisis Histológico

La histología tiene como objetivo fundamental el estudio microscópico y organizacional de los tejidos biológicos que conforman la materia viva (Alonso de León y col., 2009). En esencia, la base metodológica de la histología permite conocer las leyes objetivas de la naturaleza y dirigirlas racionalmente. Las regularidades de la formación de las numerosas estructuras del organismo pueden comprenderse perfectamente haciendo un enfoque evolutivo desde las estructuras más simples a las más complejas. Así pues, su tarea consiste no sólo en describir la microestructura de las células, los tejidos y órganos, sino también en establecer las relaciones entre los mismos y la correspondencia entre estructura y función (Alonso de León y col., 2009).

En general, el uso de técnicas histológicas tiene lugar en diversas áreas básicas de estudio como la fisiología y la biomedicina, pero también tiene utilidad en áreas de desarrollo tecnológico como en la acuicultura, donde representa una herramienta de apoyo fundamental para el entendimiento de la biología (función y estructura) de los organismos de estudio en estado normal o patológico.

Recientemente se ha facilitado la detección de disturbios o daños en la micro ó macro estructura de los tejidos o células, promovidos durante la congelación de productos pesqueros (Boonsumrej y col., 2006; Alizadeh y col., 2007; Díaz-Tenorio y col., 2007; Sriket y col., 2009). Esta detección se realiza por medio de exámenes visuales de la ultra estructura muscular auxiliándose de técnicas como microscopía óptica, microscopía electrónica (TEM, por sus siglas en inglés) y microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). El tratamiento del tejido o de la sección de tejido utilizado requiere de la aplicación de más de una sola técnica histológica preparativa, que en teoría no deberían de producir anomalías que alteren

la ultra estructura del tejido, enmascarando los resultados de las imágenes durante el análisis (Shenouda, 1980).

HIPÓTESIS

La condición de hipoxia es un factor de estrés antemortem que impacta la estabilidad del sistema proteico miofibrilar del músculo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) sometido a ciclos de congelación-descongelación.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del estrés antemortem causado por hipoxia, sobre la estabilidad del sistema proteico miofibrilar de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) sometido a ciclos de congelación-descongelación.

Objetivos Específicos

Evaluar el efecto del estrés antemortem causado por hipoxia, sobre las propiedades físicas y químicas relacionadas con la estabilidad de las proteínas miofibrilares del músculo de camarón blanco sometido a ciclos de congelación-descongelación.

Evaluar la estabilidad térmica de la fracción proteica miofibrilar del camarón blanco estresado por hipoxia, y sometido a ciclos de congelación-descongelación.

Evaluar el efecto del estrés antemortem causado por hipoxia, sobre la integridad del sistema proteico miofibrilar del camarón blanco sometido a ciclos de congelación-descongelación.

MATERIALES Y MÉTODOS

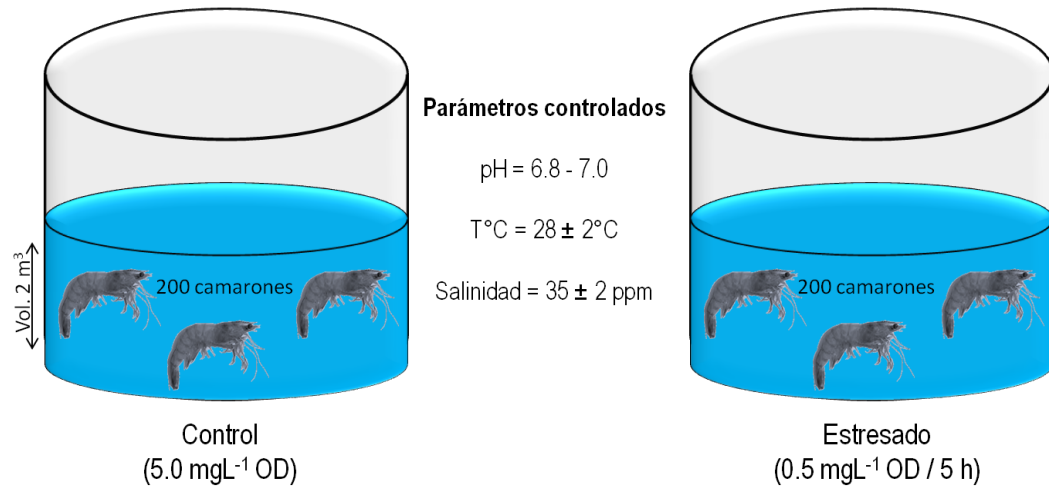
Bioensayo y Preparación de la Muestra

El camarón utilizado en este estudio fue obtenido a partir de tres muestreos distintos realizados en una granja comercial de Guaymas, Sonora. Se utilizaron 400 organismos de la especie *Litopenaeus vannamei* con peso de 15.35 ± 1.55 g por cada muestreo, mismos que se distribuyeron equitativamente en dos tinas de plástico circulares con capacidad aproximada de 2000 L cada una, representando una tina el grupo control y la otra el estresado por hipoxia. Estos organismos fueron aclimatados durante cinco días previos al experimento, manteniéndose bajo las siguientes condiciones: pH 6.8-7.0, salinidad 35 ± 2 ppm, OD 5 mgL^{-1} y temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Durante este periodo de aclimatación, los organismos fueron alimentados dos veces por día, donde la relación de ingesta fue el 3% del peso total de la biomasa.

Para el bioensayo, los camarones se dividieron en dos lotes (uno por tina): un lote se sometió a estrés por hipoxia (0.5 mgL^{-1}) durante 5 horas, y el otro se mantuvo en condiciones de normoxia (5.0 mgL^{-1}), el cual fue utilizado como control (**Figura 7a**). Ambos lotes fueron sacrificados simulando las mismas condiciones que de las granjas; esto es, reduciendo el volumen de agua de las tinas. El camarón fue recolectado en hieleras y puesto en capas alternas de hielo-camarón-hielo, donde murieron por frío. Seguido de esto, los camarones fueron descabezados, almacenados en bolsas ziploc® (10 camarones por bolsa) y congelados a -20°C . Posteriormente se sometieron al protocolo experimental, de tal forma que cuando se realizaron los ciclos de descongelación (**Figura 7b**), ambos lotes se descongelaron en las mismas condiciones (1 hora a 25°C) para obtener las muestras y realizar los análisis contemplados en el estudio. Adicionalmente, se destinó una proporción de camarones de cada lote para evaluar el efecto por el tiempo de congelación al quinto día de almacenamiento en congelación. Una vez descongelada y obtenida la muestra se procedió a congelar de nuevo ambos lotes. Se realizaron tres ciclos de congelación-descongelación a cada uno de los lotes.

(a)

Condiciones experimentales



(b)

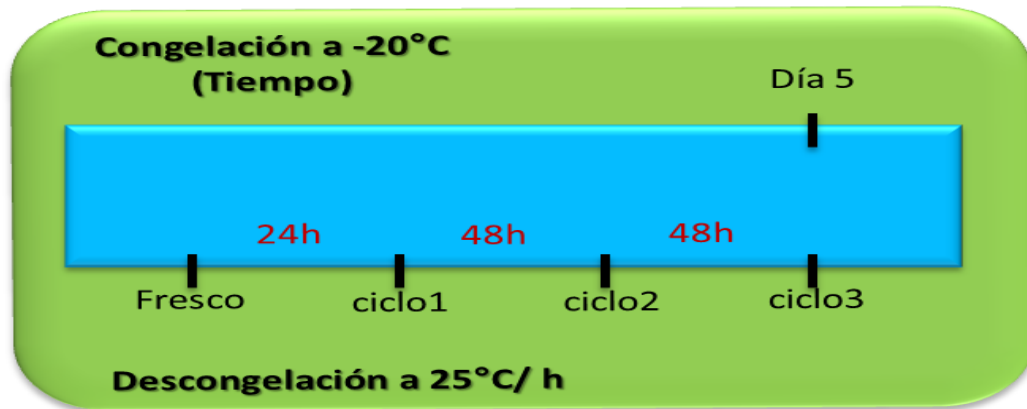


Figura 7. Diseño del experimental del bioensayo de hipoxia (a) y protocolo experimental para la aplicación de los ciclos de congelación-descongelación (b) en camarón blanco (*L. vannamei*).

Evaluación de la Estabilidad del Sistema Proteico Miofibrilar

En esta sección se describe la metodología que se utilizó para la evaluación de la estabilidad del sistema proteico miofibrilar del camarón blanco (*L. vannamei*) (Figura 8). Las principales propiedades físicas y químicas evaluadas fueron: capacidad de retención de agua (CRA) y la solubilidad de proteínas totales. La estabilidad térmica de las proteínas miofibrilares se evaluó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Además, con el objetivo de evaluar una la presencia de actividad autolítica en el músculo bajo las condiciones de estudio, se llevó a cabo una fraccionación y un análisis electroforético en gel de proliacrilamida y dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) de las proteínas miofibrilares. Por último, se realizó un examen histológico de la microestructura del músculo del camarón mediante microscopía óptica.

Capacidad de Retención de Agua (CRA)

Para evaluar la CRA, se aplicó el procedimiento establecido por Cheng y col. (1979), utilizando el segundo segmento del músculo del camarón, previamente pesado (W_i), y colocado en el tubo de la centrifuga. Las muestras fueron centrifugadas a 28,000 x g por 20 minutos a 4°C. Una vez centrifugada la muestra, se removió y secó con papel filtro, para pesarse y registrar el peso final (W_f). La CRA se expresó en gramos de agua retenida por gramo de proteína presente en la muestra y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$CRA (g H_2O/g Proteína) = \frac{W_i - W_f}{Proteína\ total\ de\ la\ muestra}$$

Solubilidad de Proteínas

Se evaluó la solubilidad total a I=0.65 M de las proteínas del músculo y la solubilidad de la fracción miofibrilar aislada. La solubilidad total se llevó a cabo según

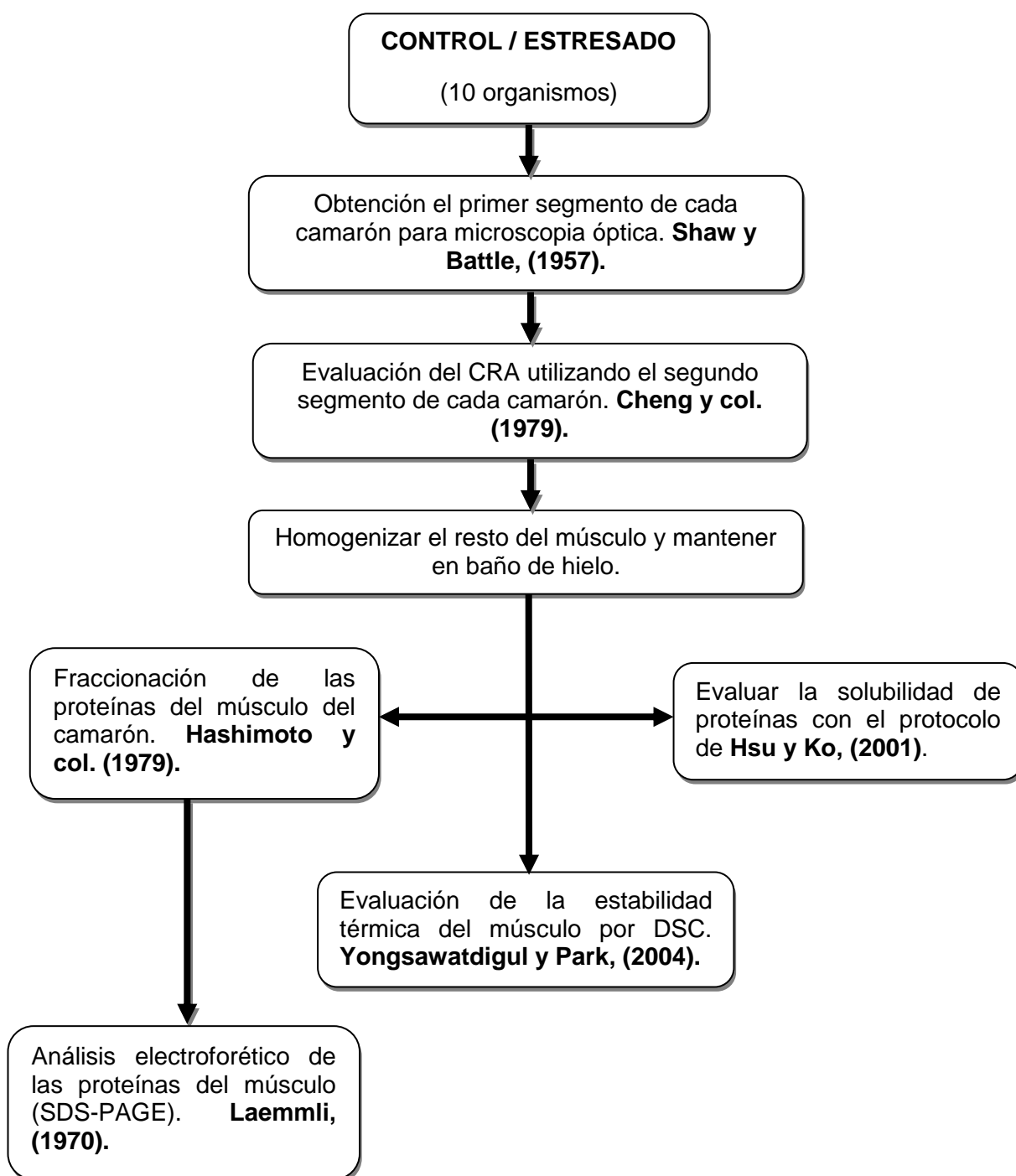


Figura 8. Esquema experimental y evaluaciones analíticas realizadas al músculo del camarón (*L. vannamei*).

la metodología descrita por Hsu y Ko (2001) utilizando una relación 1:19 (muestra:buffer) de músculo de camarón y buffer de fosfatos 20 mM (pH 7.0, NaCl 0.6 M). La mezcla resultante fue homogenizada por un minuto con un homogenizador de tejidos Tissumizer, modelo TR-10 (Tekmar Co., Cincinnati, OH, USA) cuidando que no hubiera producción de espuma. El homogenado fue centrifugado a 20,400x g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante generado en el paso anterior se utilizó para determinar el contenido de proteína soluble por el método de Biuret (Gornall y col., 1949). Simultáneamente, se evaluó la solubilidad de la fracción miofibrilar de cada muestra aislando previamente la proteína mediante el protocolo de extracción establecido por Hashimoto y col. (1979), cuantificándose la proteína por Bradford (1976). El contenido de proteína soluble en el músculo y de la fracción miofibrilar se expresaron en g de proteína soluble por 100 g de músculo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Solubilidad (g proteína/100 g músculo)} = \frac{\text{Proteína soluble}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Fraccionación y Análisis de Proteínas

Las proteínas del músculo de camarón fueron extraídas y fraccionadas mediante el protocolo de solubilidad establecido por Hashimoto y col. (1979), donde se obtuvieron las fracciones miofibrilares y sarcoplásmicas, mismas que fueron cuantificados mediante el método de Bradford (1976). Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE), en condiciones desnaturizantes y reductoras, utilizando los extractos proteicos obtenidos de la fraccionación. Se utilizó un gel de poliacrilamida discontinuo con 4% y 10% de entrecruzamiento para el gel de inyección y separación, respectivamente (Laemmli, 1970). Utilizando un sistema MINI PROTEAN® 3 Cell Multi-Casting Chamber (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con un estándar de proteínas de amplio rango (Bio-Rad, Broad protein standard). En la corrida electroforética se aplicó un campo eléctrico de 160 Volts a 25°C durante 1.5 horas. Las bandas se

tiñeron con azul coomassie R-250 al 0.125% en 40% de metanol y 7% de ácido acético, destiñéndose en una solución de metanol al 25% con ácido acético al 10%. Finalmente, los geles se escanearon con un densitómetro de Imagen (Bio-Rad, Modelo GS-700) y las bandas de proteínas se analizaron con el software Quantity One.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El análisis de DSC se realizó siguiendo la metodología descrita por Yongsawatdigul y col. (2004) empleando un calorímetro diferencial de barrido Perkin Elmer modelo DSC7 (Perkin Elmer de México, S.A., Monterrey, México). Para ajustar la precisión de la temperatura se calibró el instrumento utilizando indio con un flujo de nitrógeno purgado de 20 mLmin⁻¹. Para la obtención de la línea base se utilizó un porta muestras vacío. Los termogramas del músculo en cada ciclo de congelación-descongelación se obtuvieron empleando 50 mg de muestra. Las muestras fueron escaneadas de 10 hasta 90°C, con incrementos de temperatura de 5°C min⁻¹. Los parámetros analizados fueron la temperatura máxima (T_{max}) de transición, así como también los cambios en la entalpía (ΔH) de desnaturalización.

Análisis Histológico

Para llevar a cabo este estudio, el primer segmento del músculo de camarón se fijó por 36 horas con solución de Davidson (Shaw y Battle, 1957). Después el ejido se deshidrató, aclaró e incluyó en parafina para luego obtener cortes transversales de 5 μ m de espesor, los cuales fueron teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina (Humason, 1979; Sheehan y Hrapchak, 1973). Las laminillas obtenidas se analizaron con un microscopio óptico (CX31RBSF, Olympus Optical Co. LTD), fotografiándose los campos de interés con una cámara digital (Camedia C-3030, Olympus Optical Co. LTD) acoplada al microscopio. Una vez que se tomaron las micrografías de cada preparación histológica del tejido del camarón, se realizó un análisis exhaustivo para elegir la región donde se evaluarían los parámetros del estudio histológico. El

resultado del análisis exploratorio mostró que la región dorsal del abdomen del camarón fue la región que presentó mayor uniformidad, representatividad y reproducibilidad del total de las muestras preparadas, por lo que ésta fue utilizada para evaluar los cambios posmortem por efecto de los factores de estudio. Se cuantificó el porcentaje total de las áreas blancas y el porcentaje de área lisada de los paquetes miofibrilares utilizando el software Image Pro-Plus versión 6.0 (Media Cybernetics, Inc.). El incremento del área blanca se interpretó como una contracción del músculo, mientras que el porcentaje de área lisada se expresó como aquella región o regiones de paquetes miofibrilares donde se presentó deformación y ruptura de tejido.

Diseño Experimental

El experimento constó de tres repeticiones, donde cada determinación analítica se realizó por triplicado utilizando un diseño factorial 2x4 donde los principales factores de estudio fueron: nivel de OD (dos niveles) y ciclos de congelación-descongelación (cuatro niveles). Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confiabilidad ajustado a un Modelo Lineal General (GLM) con el paquete estadístico NCSS 2007. Para identificar las diferencias significativas entre las medias se empleó una prueba de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capacidad de Retención de Agua (CRA)

La habilidad que posee un músculo de retener agua es, indudablemente una de las características de calidad más importantes de los productos frescos. El músculo de camarón contiene aproximadamente 75% de agua, donde alrededor del 85% de ella es retenida por las proteínas miofibrilares. La **Figura 9** muestra la CRA (g H₂O/g de Proteína) del músculo de camarón blanco (*L. vannamei*) sometido a ciclos de congelación-descongelación. Se puede observar una disminución ($P \leq 0.05$) del 5.7% en los valores de CRA del músculo por efecto del estrés antemortem durante el primer ciclo de congelación-descongelación. El análisis estadístico del diseño factorial mostró un efecto ($P \leq 0.05$) en los dos principales factores de estudio, pero no de su interacción ($P > 0.05$). Por lo que el efecto de cada una de las variables de estudio, puede ser aislado y explicado por separado.

Los resultados obtenidos mostraron que las condiciones de almacenamiento utilizadas (tiempo y temperatura), no contribuyeron ($P > 0.05$) en la pérdida de la CRA del músculo del camarón al momento de emplear más de un ciclo de congelación-descongelación. No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en la pérdida del CRA del músculo entre el primer y quinto día de almacenamiento a -20°C (**9a y 9b**), lo cual sugiere que la temperatura utilizada en este estudio puede ser empleada como temperatura de conservación del camarón, y no presentar pérdidas en peso por lo menos en los primeros días de almacenamiento.

Estos resultados podrían permitir establecer un posible mecanismo que explique cómo se afectan algunas propiedades, como la CRA, de las proteínas miofibrilares del músculo de camarón durante la condición de hipoxia. En relación a lo anterior, diversos estudios indican que bajo condiciones de hipoxia extrema ($< 1\text{mgL}^{-1}$ OD), el metabolismo energético de los camarones se ve

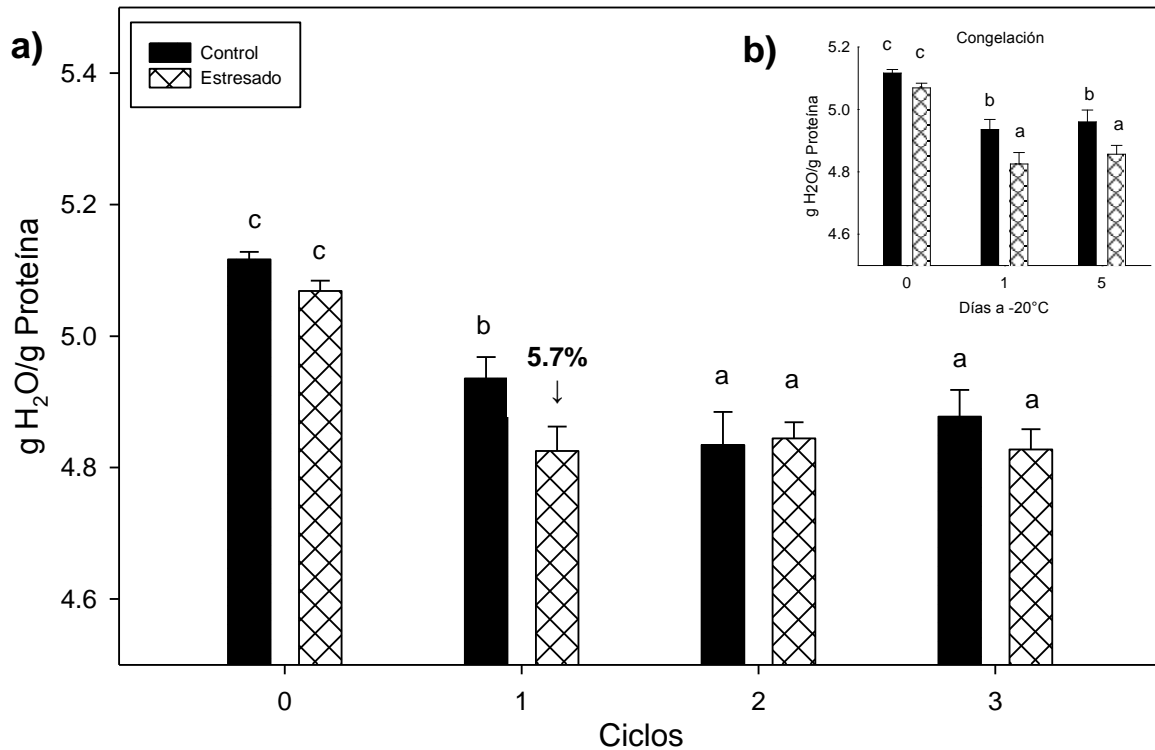


Figura 9. Efecto del estrés antemortem causado por hipoxia sobre la Capacidad de Retención de Agua (g H₂O/g de Proteína) del músculo de camarón blanco (*L. vannamei*), sometido a ciclos de congelación-descongelación. Media ± EEM, n=3. El tiempo cero representa el músculo fresco (<1 hora posmortem).

reducido debido al déficit de oxígeno, disminuyendo la síntesis habitual de ATP mediante el ciclo de Krebs. Con el fin de compensar esta disminución de ATP, se activa la ruta de glucólisis anaeróbica que tiene como producto final ácido láctico, generado por acción de la enzima piruvato deshidrogenasa sobre su substrato piruvato; el ácido láctico se acumula en hemolinfa y en el músculo. (Rosas y col., 1997; Ocampo y col., 2003; Guadagnoli y Reiber, 2005; Mugnier y Soyez, 2005; Mercier y col., 2006).

Posteriormente, el ácido láctico acumulado en el tejido muscular, se disocia reduciendo el pH. Cuando el pH alcanza el punto isoeléctrico (pI) de la mayoría de las proteínas, especialmente miosina (pI=5.4), la carga neta de la proteína es cero, debido a un número igual de cargas positivas y negativas. Esta distribución de cargas positivas y negativas a través de la estructura proteica, trae como resultado una reducción en las interacciones entre proteínas y moléculas de agua; entonces al ser desplazadas estas moléculas de agua, terminan por ocupar los espacios inter miofibrilares (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005). Cuando la carga neta de la proteína se acerca a cero, la repulsión entre las miofibrillas se reduce permitiendo un mayor empaquetamiento entre ellas. Finalmente, la desnaturalización de miosina a pH bajo es el resultado en gran parte por la movilización del ácido láctico hacia los espacios inter-miofibrilares.

Acorde a la discusión anterior y al comportamiento de la CRA del músculo de camarón sometido a hipoxia, podría sugerirse una mayor acumulación de ácido láctico en forma de lactato en el músculo por esta condición (Morán-Morales, 2003), a tal grado que podría llegar a desestabilizar a las proteínas modificando sus propiedades fisicoquímicas y estructurales.

Solubilidad de Proteínas

En algunos casos se pueden presentar alteraciones en las proteínas del músculo durante la congelación de los productos pesqueros. Esas alteraciones

involucran desenvolvimiento de la molécula, además de otras reacciones secundarias entre los grupos reactivos de las mismas proteínas ó con componentes no proteicos del músculo, formando enlaces entrecruzados y agregados entre proteínas. Por lo tanto, el resultado de estos cambios repercute en la funcionalidad de las proteínas manifestándose en una disminución de las propiedades de solubilidad, retención de agua, capacidad de formar geles y de emulsificación, por mencionar algunas (Sikorski, 1990).

En la **Figura 10** se ilustran los valores de solubilidad (g de proteína/100 g de músculo) total de las proteínas del músculo de camarón blanco (*L. vannamei*) sometido a ciclos de congelación-descongelación, donde la solubilidad ($I=0.65\text{ M}$) de las proteínas aparentemente no sufre cambios ($P>0.05$) tanto por efecto de la hipoxia como por los ciclos de congelación-descongelación. Por otro lado, la evaluación de la solubilidad de la fracción miofibrilar (**Figura 11**) del camarón se observó que la condición de estrés antemortem disminuyó ($P\leq 0.05$) su solubilidad en un 10.8% durante el primer ciclo de congelación-descongelación. Esta pérdida de solubilidad durante el primer ciclo se debe tanto al impacto del estrés antemortem como al efecto de la congelación *per sé* sobre el músculo, ya que ambos factores contribuyeron en la modificación del ambiente fisicoquímico de las proteínas generando un efecto negativo sobre sus propiedades de hidratación y por ende su capacidad de permanecer en solución. Aunque los resultados obtenidos indicaron que ambos factores de estudio contribuyen a la pérdida de solubilidad de la fracción miofibrilar ($P\leq 0.05$) al aplicar el primer ciclo de congelación descongelación, el análisis estadístico mostró que el efecto inicial de la congelación, fue el principal factor que promovió la pérdida de solubilidad de la fracción miofibrilar, y no así, los subsecuentes ciclos de congelación-descongelación (2^{do} y 3^{er} ciclos).

Estos resultados de solubilidad concuerdan en gran medida con los obtenidos en la CRA (**Figura 9**), donde además se observa el impacto de la hipoxia sobre el músculo en el primer ciclo de congelación-descongelación. Lo anterior evidencia que existe cierta relación entre las propiedades de retención de agua y de solubilidad de

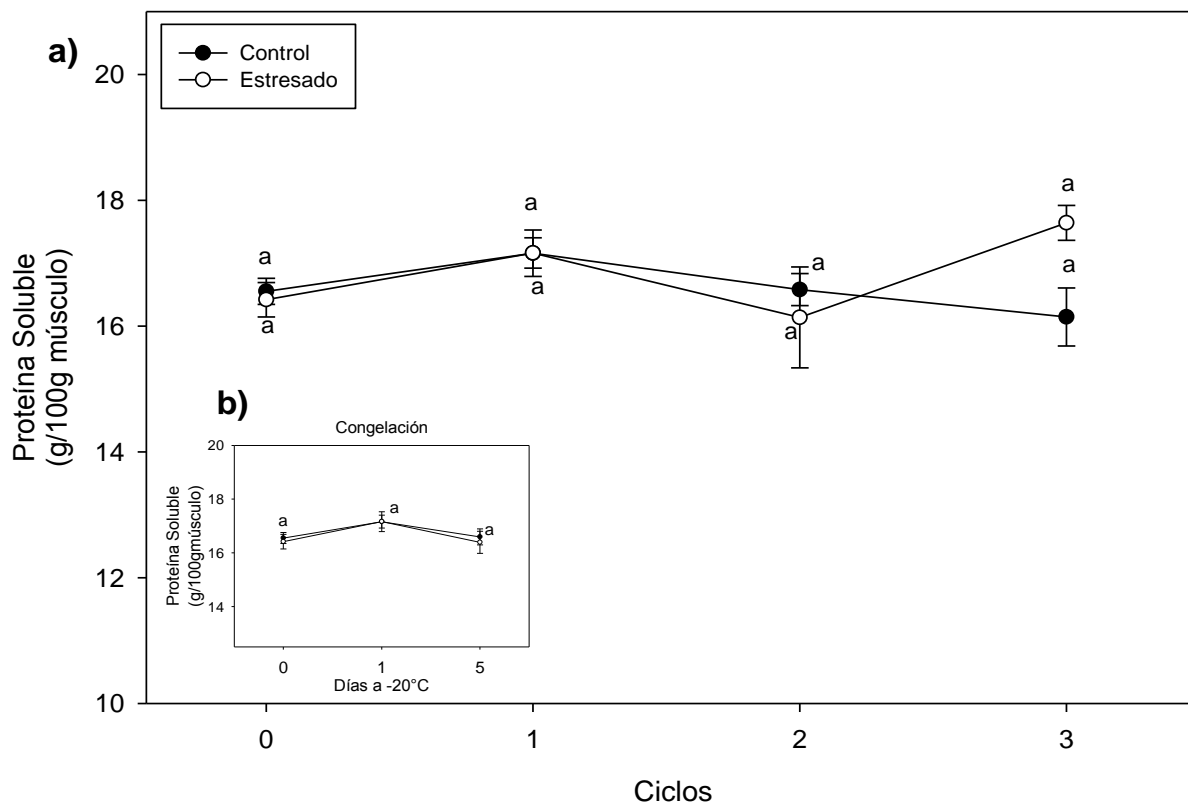


Figura 10. Efecto del estrés antemortem causado por hipoxia sobre la solubilidad (g proteína/100g de músculo) total de las proteínas del músculo del camarón blanco (*L. vannamei*) sometido a ciclos de congelación-descongelación. Media \pm EEM, n=3. El tiempo cero representa el músculo fresco (<1 hora posmortem).

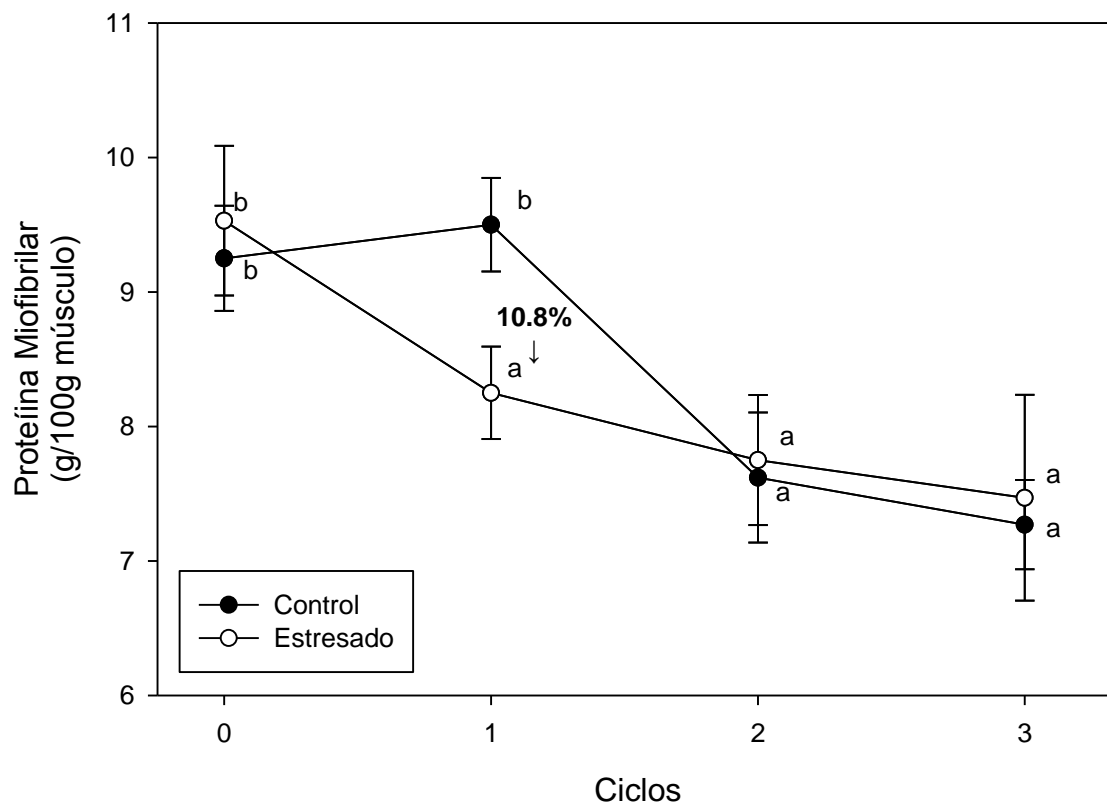


Figura 11. Efecto del estrés antemortem causado por hipoxia sobre la solubilidad (g proteína/100g de músculo) de la fracción proteica miofibrilar del músculo de camarón blanco (*L. vannamei*) sometido a ciclos de congelación-descongelación. Media \pm EEM, n=3. El tiempo cero representa el músculo fresco (<1 hora posmortem).

las proteínas, puesto que en ambas son propiedades de hidratación de las proteínas en las que se ven involucradas las propiedades fisicoquímicas (carga neta, hidrofiliidad, reactividad química, potencial de enlaces hidrogeno y naturaleza química del grupo -R) de los aminoácidos que las conforman (Fennema, 1996). La **Figura 12** muestra el grafico obtenido a partir del análisis de correlación entre las variables CRA y solubilidad de la fracción miofibrilar, el cual estableció un coeficiente de correlación r con un valor calculado de 0.47. Lo anterior significa que cerca del 50% de los cambios en la CRA también explican la disminución de solubilidad en la fracción miofibrilar.

Otros estudios han mostrado resultados similares en cuanto al efecto de los ciclos de congelación-descongelación sobre la solubilidad de las proteínas del músculo de *Clupea pilchardus* (Castrillón y col., 1996), *Macrobrachium rosenbergii* (Srinivasan y col., 1997), bacalao (Benjakul y Bauer, 2000), *Cherax quadricarinatus* (Tseng y col., 2003), entre otros. Los resultados obtenidos en el presente estudio, a diferencia de los que se mencionaron anteriormente, muestran la importancia de las condiciones antemortem y su relación con posibles cambios biológicos homeostáticos en el camarón causados durante la exposición a hipoxia; cambios que podrían promover una modificación en el ambiente bioquímico de los principales componentes proteicos del músculo.

Fraccionación y Análisis de Proteínas

Las **Figuras 13 y 14** muestran los electroforegramas de las proteínas totales del músculo de camarón blanco. No se observaron cambios importantes en el perfil electroforético. La cadena pesada de miosina y actina ubicadas a los 200 kDa y 45 kDa respectivamente, no sufrieron modificaciones. Sin embargo, la α -actinina, ubicada alrededor 116 kDa, parece sufrir una disminución en intensidad de la banda. No obstante, no se observó la aparición de nuevas bandas. En la bibliografía existen estudios que reportan un comportamiento electroforético similar en músculo de langostinos (*Macrobrachium rosenbergii*) y langostas (*Cherax quadricarinatus*) de

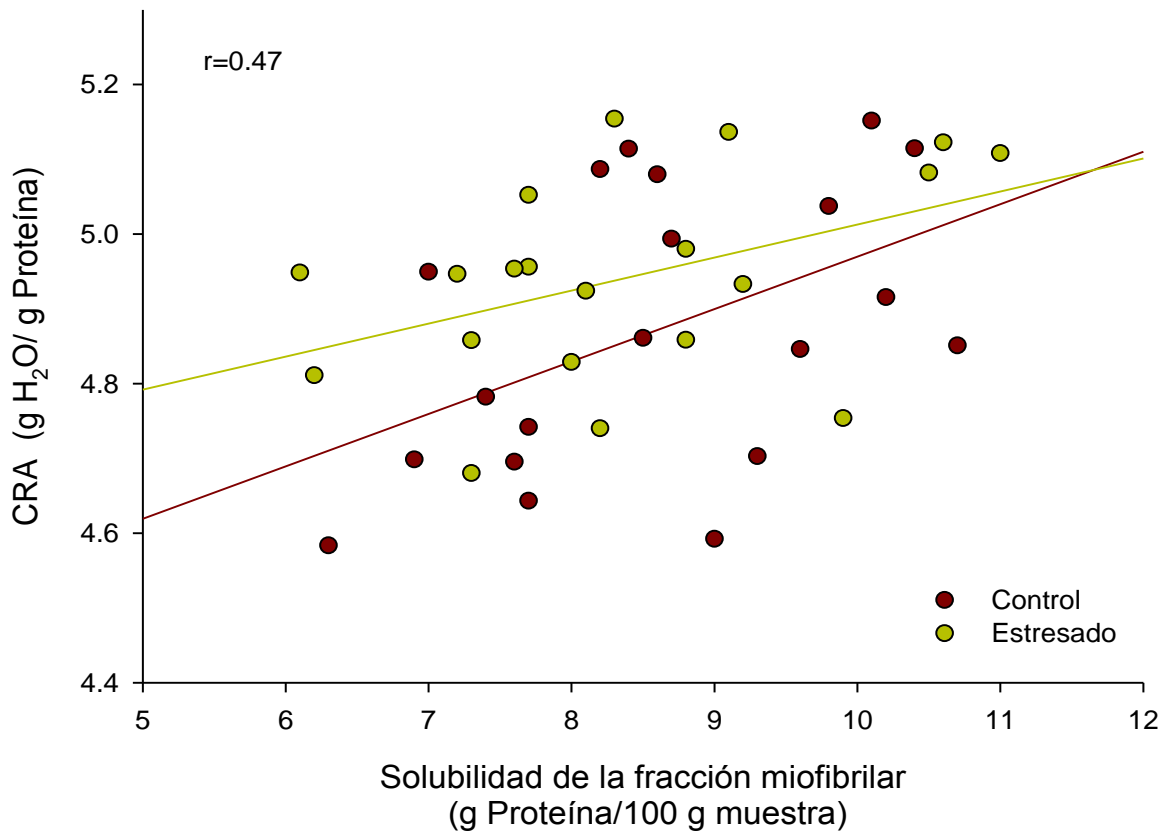


Figura 12. Análisis de correlación entre las propiedades de CRA y solubilidad de la fracción miofibrilar del músculo del camarón blanco (*L. vannamei*) estresado por hipoxia y sometido a ciclos de congelación-descongelación.

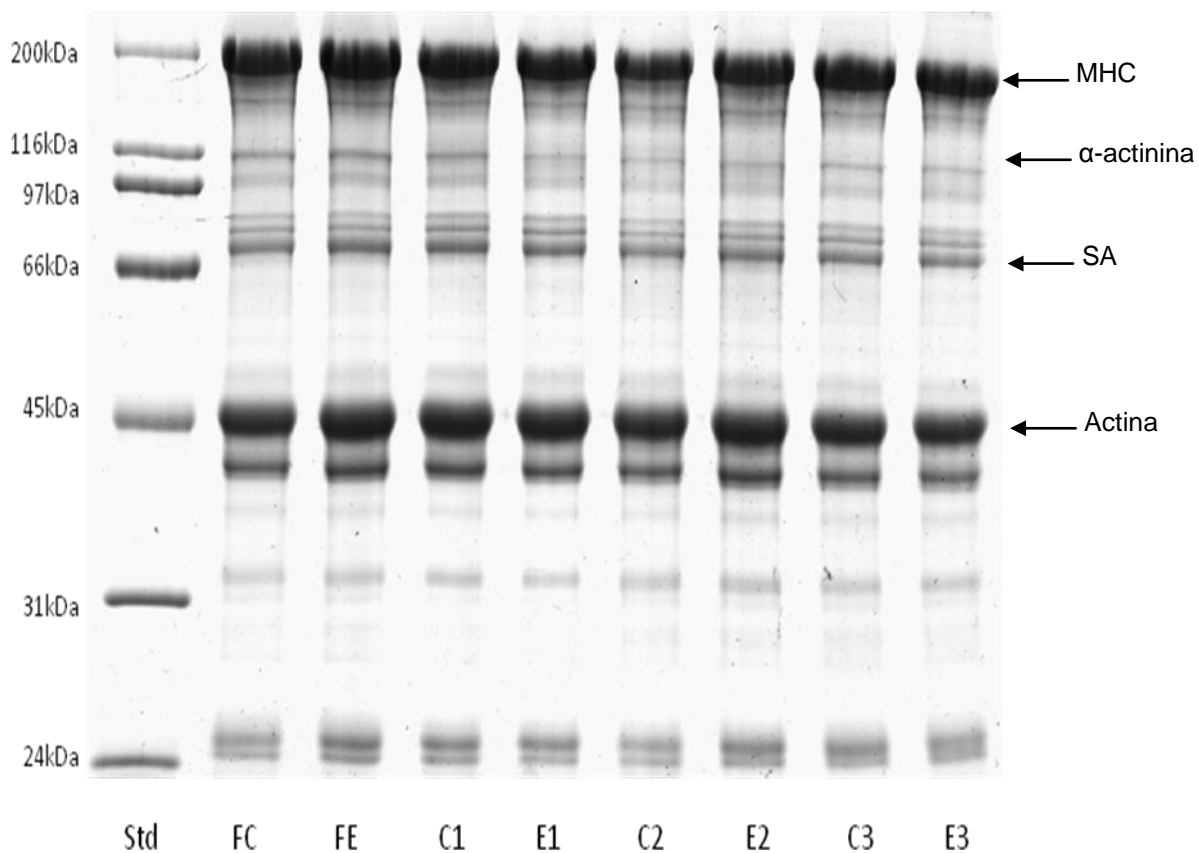


Figura 13. Electroforegrama del músculo de camarón blanco (*L. vannamei*) sometido a ciclos de congelación-descongelación. Std: estándar de amplio rango, F: músculo fresco, C: control, E: estresado, 1,2 y 3: ciclos de congelación-descongelación, MHC: cadena pesada de miosina, SA: seroalbumina.

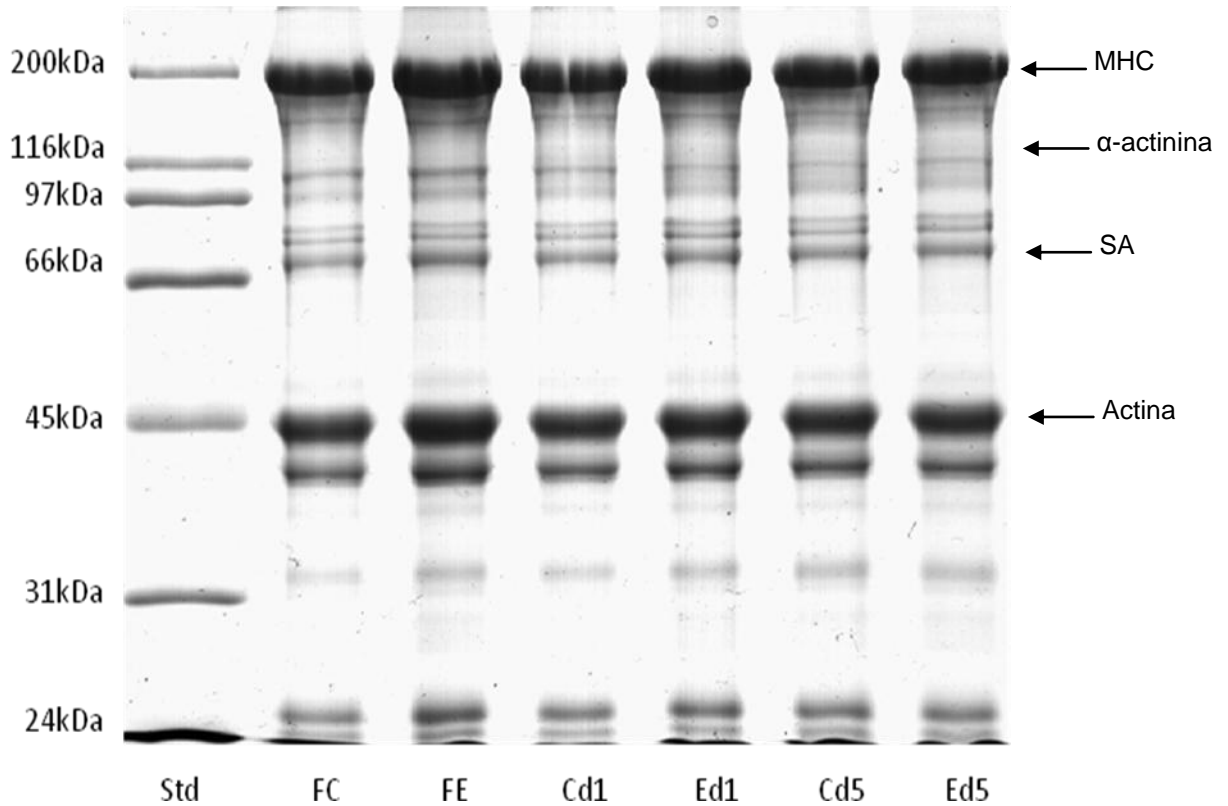


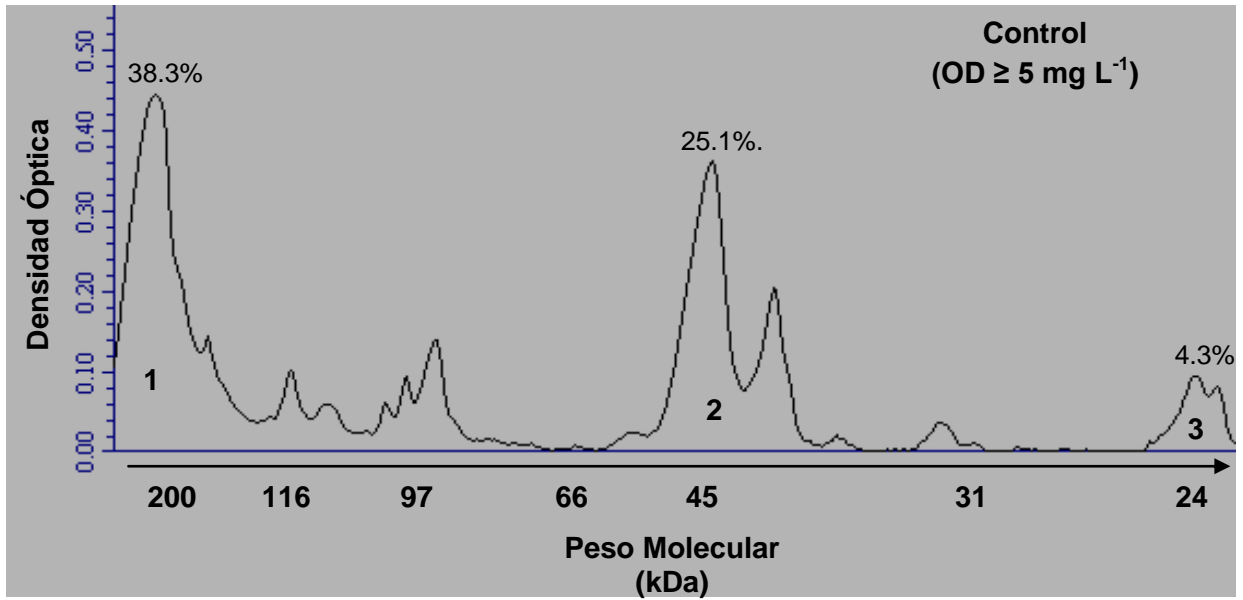
Figura 14. Electroforegrama del músculo de camarón blanco (*L. vannamei*) almacenado a -20°C . Std: estándar de amplio rango, F: músculo fresco, C: control, E: estresado, d: días almacenados en congelación, MHC: cadena pesada de miosina, SA: seroalbumina.

agua dulce (Kye y col., 1988; Sirinivasan y col., 1997; Tseng y col., 2002), donde se ha observado que el músculo de esas especies fue bastante estable al momento de someterse a ciclos de congelación-descongelación. Con la finalidad de aumentar la precisión del análisis, se practicó un análisis densitométrico de las bandas de proteínas del músculo analizadas por SDS-PAGE, calculándose los porcentajes relativos para cada una de ellas (**Figura 15**). Los resultados revelaron un incremento de 38.3 a 38.4% y de 25.1 a 25.4% en la intensidad de las bandas de miosina (200 kDa) y actina (45 kDa), respectivamente. Además, se observó un aumento de 4.3 a 5.7% en la intensidad de las bandas cercanas a los 24 KDa (**15b**).

Se ha reportado que los procesos asociados con la congelación y descongelación de diversos productos pesqueros durante el almacenamiento promueven la hidrólisis de proteínas, dando lugar a fragmentos de péptidos con menor peso molecular. Esas mismas proteínas y dichos fragmentos pueden ser sustrato de proteasas endógenas como calpainas y catepsinas que se han encontrado en músculo de muchas especies de crustáceos (Tseng y col., 2003).

Las proteínas sarcoplásmicas, miofibrilares y del estroma en el músculo están relacionadas con la función muscular en el organismo (Matsumoto, 1979). Al realizar el análisis de los electroforegramas (y sus densitogramas) de las fracciones sarcoplásmicas y miofibrilares extraídas del músculo, solo se observaron cambios mínimos en el camarón fresco (**Figuras 16, 17 y 18**), no así para los ciclos de congelación-descongelación. Las proteínas sarcoplásmicas del músculo se encuentran disueltas en el sarcolema; éstas incluyen un gran número de proteínas como la mioglobina, albumina y algunas enzimas (hidrolasas, oxidoreductasas, transferasas). Estas enzimas se consideran responsables de la pérdida de calidad en el pescado (Hui y col., 2004). En la fracción sarcoplásmica (**Figura 16a**) del músculo del camarón (control y estresado), se observó que a través de los ciclos de congelación-descongelación incrementó la intensidad de algunas de las bandas generadas por debajo de los 116 kDa en esta fracción. En tanto que el análisis densitométrico de la misma fracción en músculo fresco, mostró una disminución de

(a)



(b)

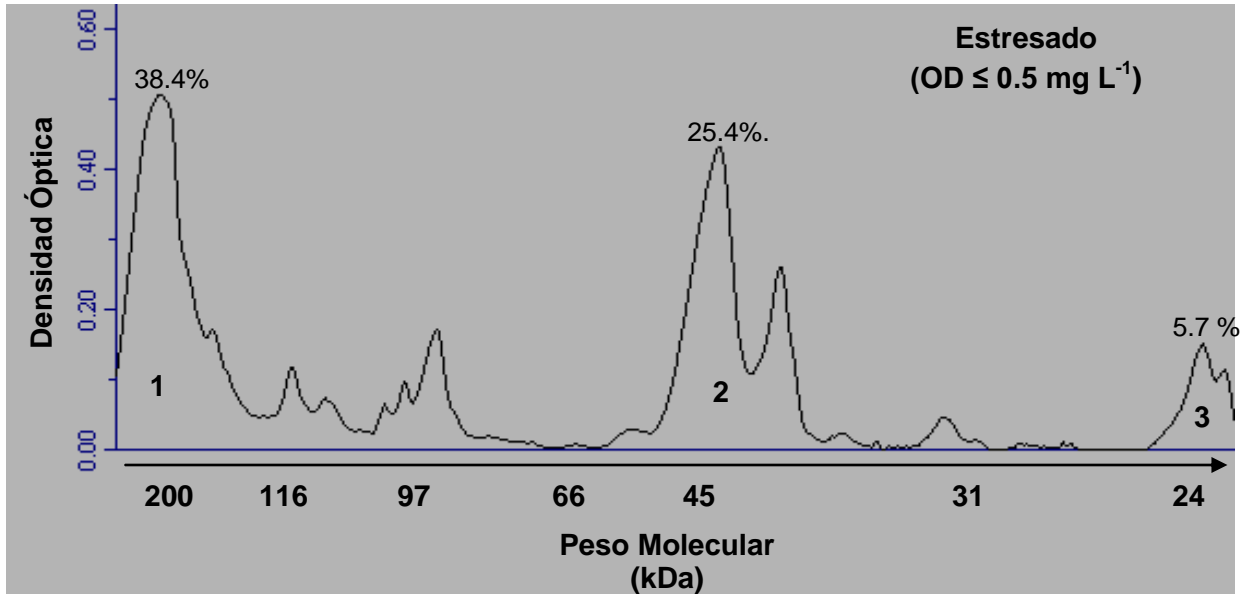


Figura 15. Densitograma de los electroforegramas producidos por los extractos proteicos del músculo de camarón (*L. vannamei*) fresco. (a) Músculo del camarón control, (b) Músculo del camarón estresado. Pico 1, miosina (200kDa); Pico 2, actina (45 kDa); y zona 3, proteínas de bajo peso molecular.

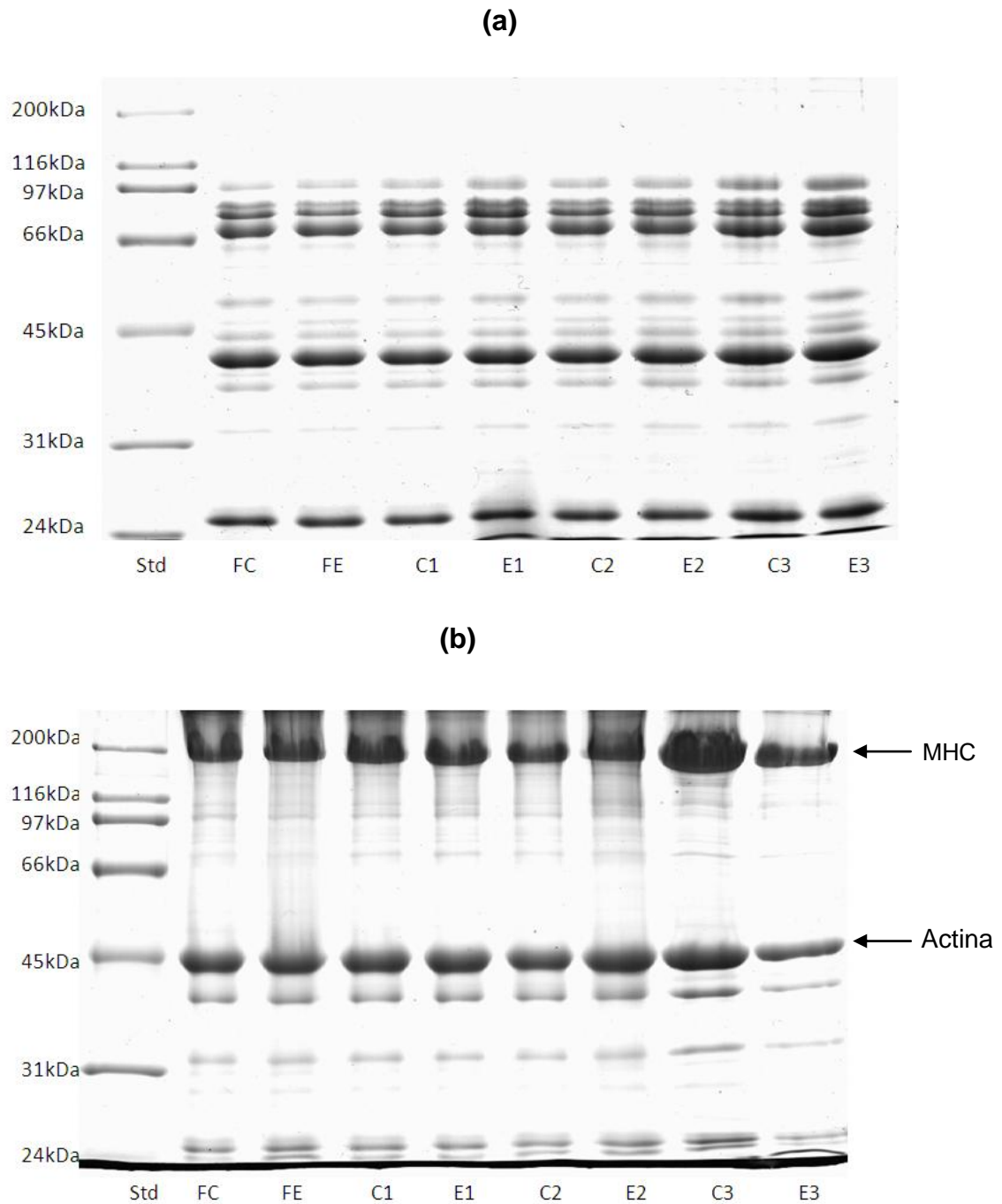
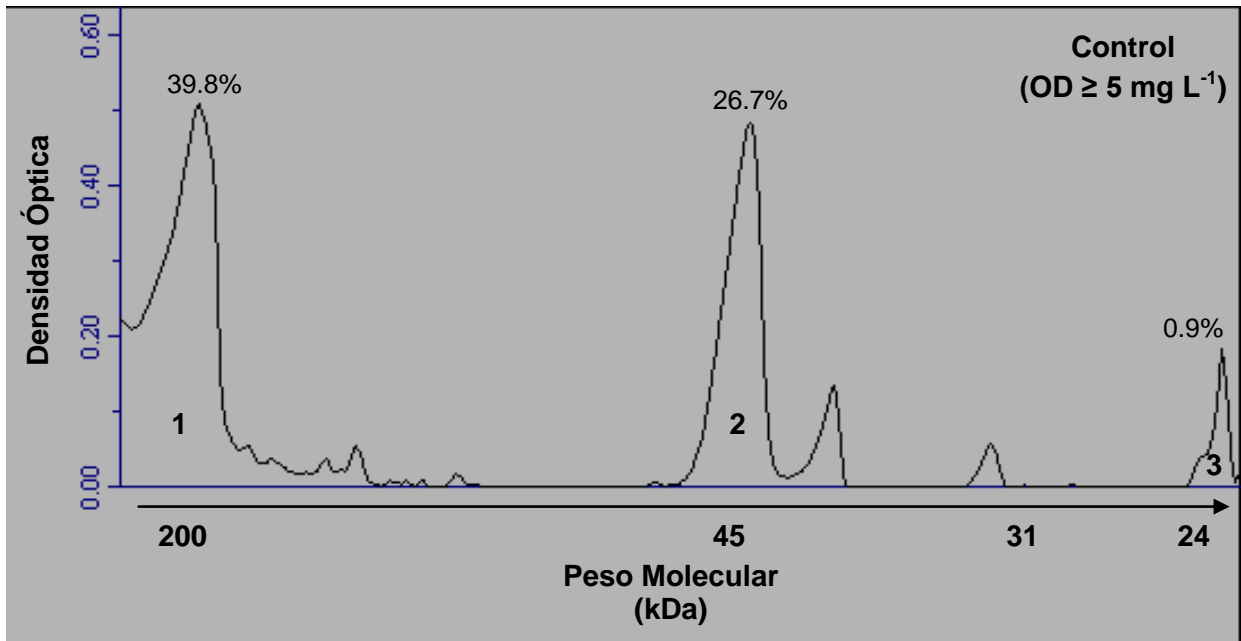


Figura 16. Electroforegramas de las fracciones sarcoplásmica (a) y miofibrilar (b) del músculo del camarón blanco (*L. vannamei*) sometido a ciclos de congelación-descongelación. Std: estándar de amplio rango, F: fresco, C: control, E: estresado, 1,2 y 3: ciclo de congelación-descongelación.

(a)



(b)

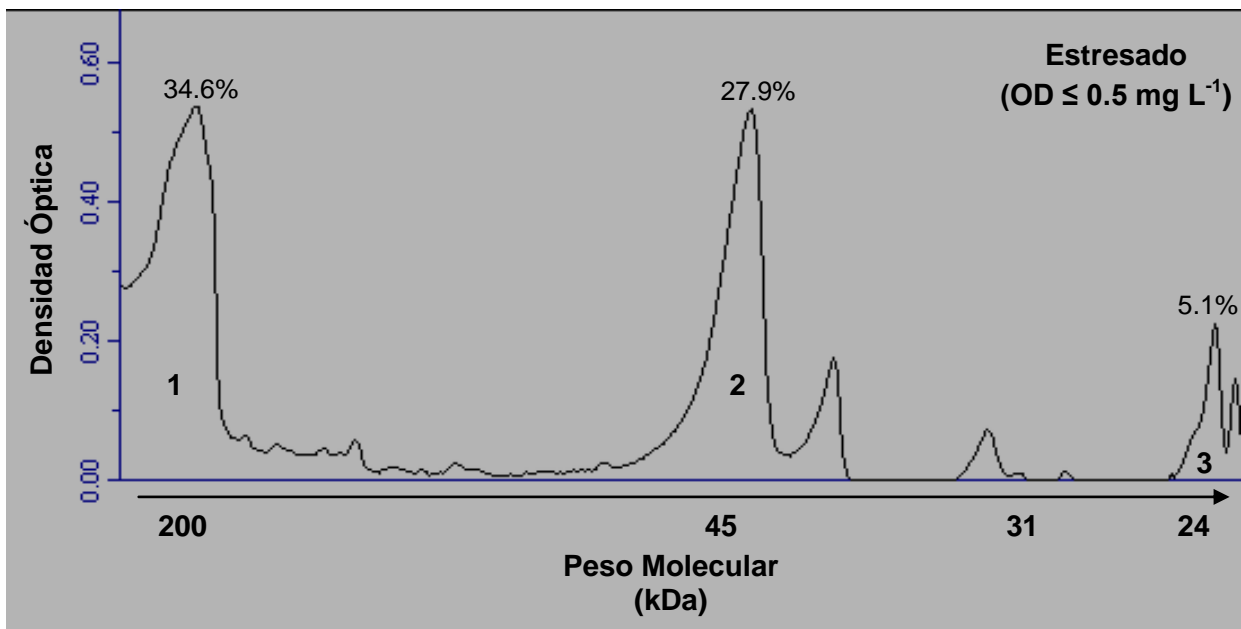
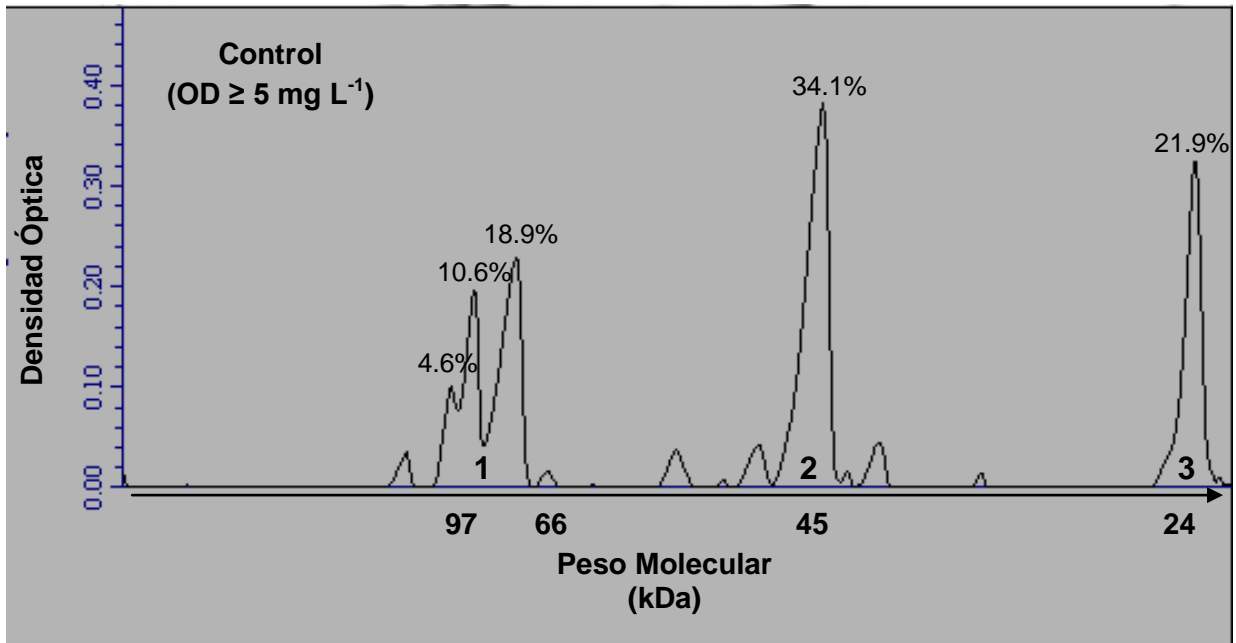


Figura 17. Densitogramas de los geles obtenidos del análisis de la fracción miofibrilar del músculo de camarón (*L. vannamei*) fresco. (a) Control, (b) Estresado. Pico 1, miosina (200kDa); Pico 2, actina (45 kDa); y la zona 3, proteínas de bajo peso molecular.

(a)



(b)

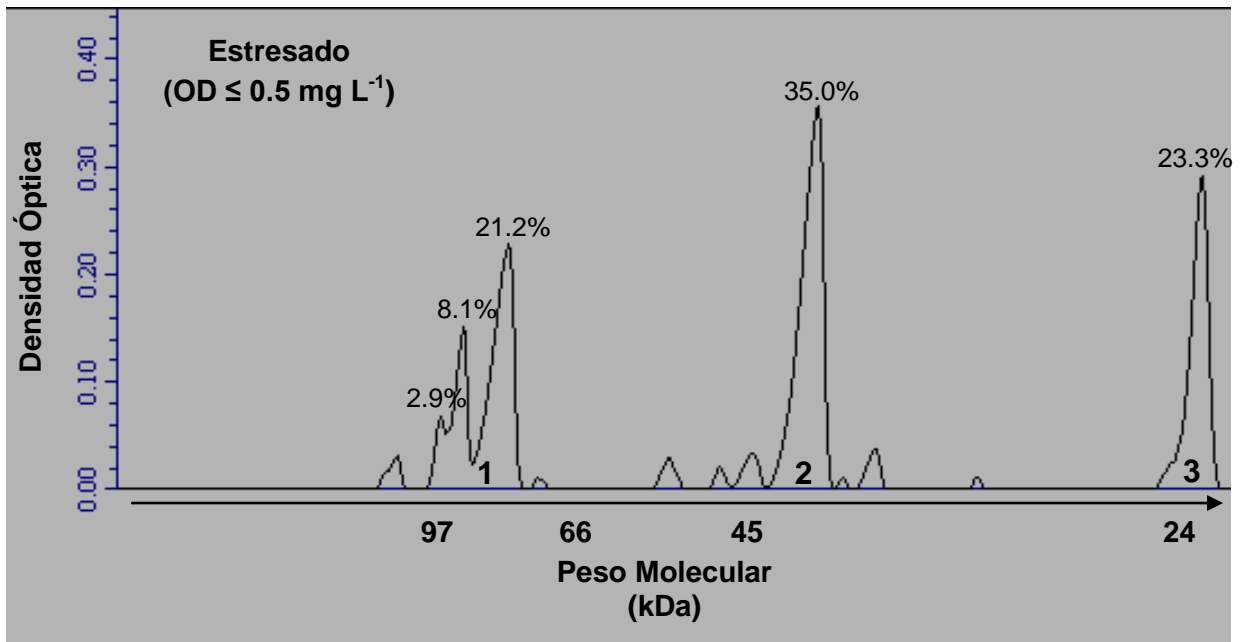


Figura 18. Densitogramas de los geles obtenidos del análisis de la fracción sarcoplásmica del músculo de camarón (*L. vannamei*) fresco. (a) Control, (b) Estresado. Región 1; seroalbumina (66 kDa), Regiones 2 y 3; proteínas sarcoplásmicas de bajo peso molecular.

4.6% a 2.9% y de 10.6% a 8.1% en las bandas de 85 kDa y 79 kDa, respectivamente. Mientras que los incrementos de 18.9% a 21.2%, de 34.1% a 35% y de 21.9% a 23.3% se dieron en las bandas de 70, 40 y 22 kDa respectivamente. Esto podría deberse al efecto de los ciclos de congelación-descongelación sobre la fuerza iónica del sistema dentro del músculo del camarón, induciendo la exposición de los grupos hidrofóbicos de la proteína y favoreciendo la formación de agregados proteicos mediante interacciones no covalentes.

Las proteínas miofibrilares pueden sufrir cambios durante y después del *rigor mortis*, así como también en condiciones de congelación. Las proteínas miofibrilares más comunes son: miosina, actina, tropomiosina y troponinas C, I y T. En productos pesqueros congelados, la degradación se traduce en una pérdida de las propiedades funcionales de las proteínas miofibrilares, principalmente en la solubilidad, CRA, capacidad gelificante y de emulsificación (Hui y col., 2004). Los principales cambios en la fracción miofibrilar (**Figura 16b**) se observaron en la banda de los 200 kDa y 45 kDa, que corresponden a las proteínas miosina y actina respectivamente. En el primer caso, la banda de miosina muestra una tendencia a disminuir su intensidad a través de los ciclos de congelación-descongelación (**Figura 16b**), sin embargo también se presenta un barrido por arriba de esa área, producto de agregación de las mismas proteínas miofibrilares (**Figura 17b**). La banda de actina muestra un aumento en su intensidad a través de los ciclos, esto puede ser atribuido a la agregación de proteínas de ese peso molecular, inducido por el incremento en la fuerza iónica del sistema (**Figura 16b y 17b**).

En general, el perfil electroforético del músculo del camarón sometido a ciclos de congelación-descongelación, muestra un comportamiento bastante estable del sistema miofibrilar, donde la presencia de actividad autolítica puede ser nula o prácticamente despreciable. Por ello, este comportamiento se relaciona más aun fenómeno de agregación proteica, que coincide con la disminución del CRA y la pérdida de solubilidad de la fracción miofibrilar.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Durante la congelación puede promoverse un desdoblamiento de la estructura nativa de las proteínas debido a la desestabilización de las fuerzas que la mantienen unida; esto puede suceder cuando se experimentan fluctuaciones de temperatura durante el almacenamiento o por el uso excesivo de los ciclos de congelación-descongelación. También se ha observado que el método de descongelación juega un papel muy importante para lograr mantener la integridad del músculo, así como sus atributos sensoriales. Así pues, en este caso tanto la estabilidad térmica como las propiedades termodinámicas de las proteínas pueden ser afectadas por condiciones inadecuadas de congelación y por el tipo de descongelación (Benjakul y Bauer, 2000).

Para evaluar la estabilidad térmica de las proteínas miofibrilares del músculo de camarón blanco utilizado en el presente estudio, se llevó a cabo un análisis calorimétrico. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1**, donde se observa la temperatura máxima (T_{max}) de desnaturalización y el diferencial de entalpia (ΔH) que corresponden a miosina y actina. En general, el músculo del camarón exhibió tres picos máximos de transición (**I, II y III**) que se muestran en la **Figura 19**. En diferentes estudios, la resolución del pico **I** se ha atribuido a la desnaturalización de la cabeza de miosina, mientras que el pico **II** a una mezcla entre las cadenas livianas de miosina con proteínas sarcoplásmicas y estromales, y por último el pico **III**, atribuido al comportamiento térmico de la proteína actina (Srinivasan y col., 1997; Tseng y col., 2003).

El análisis estadístico del diseño factorial que se utilizó para evaluar el efecto de los factores estrés antemortem y ciclos de congelación-descongelación sobre la estabilidad térmica del sistema miofibrilar del músculo del camarón, no mostró efecto ($P>0.05$) en la interacción. Esto significa que los efectos de ambos factores sobre la estabilidad del músculo pueden ser interpretados de forma individual o aislada.

Tabla 1. Temperatura máxima de transición (T_{max} , °C) y ΔH (J/g) de miosina y actina, del músculo del camarón blanco (*L. vannamei*) sometido a ciclos de congelación-descongelación.

Condición		Control				Estresado			
		Miosina		Actina		Miosina		Actina	
		T_{max}	ΔH	T_{max}	ΔH	T_{max}	ΔH	T_{max}	ΔH
Ciclos (No.)	Fresco	49.6±0.21 ^a	1.0±0.13	66.7±0.15 ^a	0.47±0.04 ^z	50.3±0.38 ^b	0.93±0.07	67.1±0.15 ^b	0.35±0.05 ^{xy}
	1	50.2±0.14 ^b	0.93±0.02	66.7±0.22 ^a	0.36±0.02 ^y	50.6±0.15 ^{bc}	0.91±0.01	66.7±0.12 ^a	0.27±0.01 ^x
	2	50.4±0.12 ^{bc}	0.90±0.02	66.6±0.23 ^a	0.29±0.02 ^{xy}	50.7±0.19 ^{bc}	0.86±0.02	67.0±0.29 ^a	0.30±0.03 ^{xy}
	3	50.3±0.16 ^b	0.97±0.02	66.6±0.11 ^a	0.29±0.01 ^{xy}	51.1±0.16 ^c	0.84±0.05	67.0±0.10 ^a	0.25±0.02 ^x
Congelación (Días a -20°C)	5	50.75±0.21 ^b	0.86±0.02	66.5±0.18 ^a	0.30±0.04 ^y	50.8±0.06 ^{bc}	0.9±0.03	67.1±0.14 ^{ab}	0.27±0.01 ^x

Media \pm EEM, n=3. Variables distintas para cada columna y fila indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$). No se encontró efecto ($P > 0.05$) por la interacción de los factores en la T_{max} , y ΔH de miosina y actina.

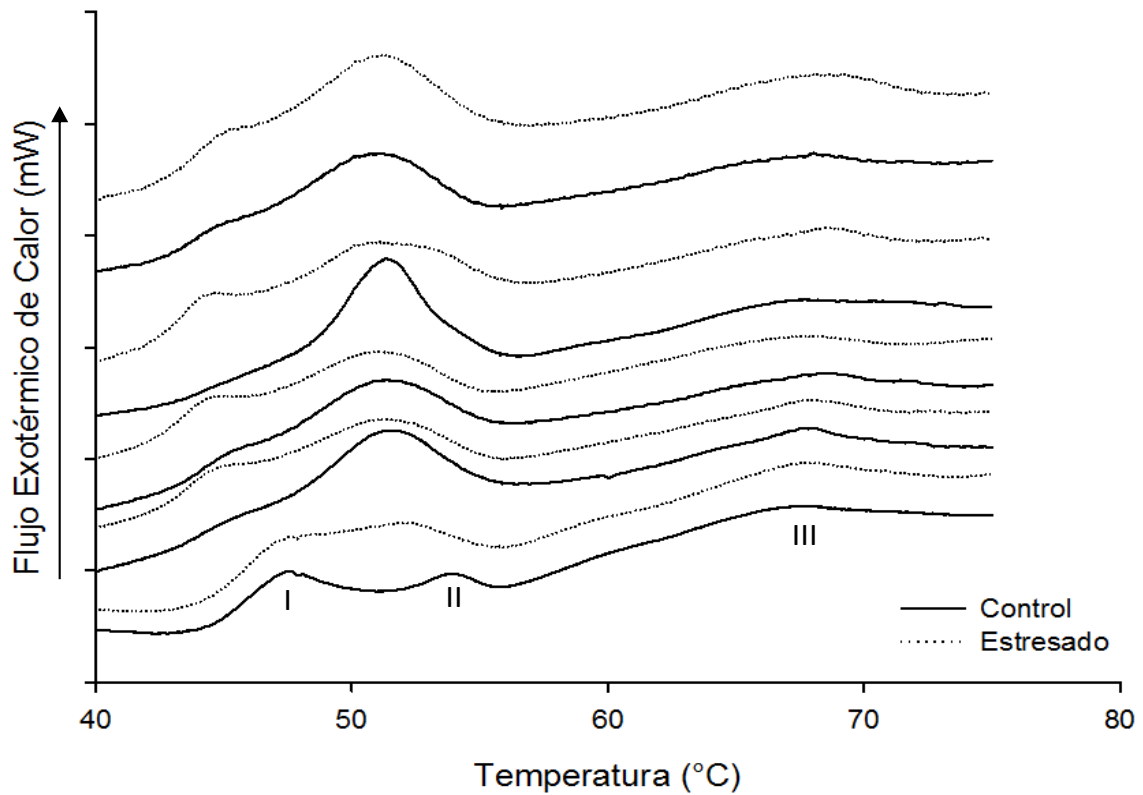


Figura 19. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) del músculo de camarón blanco (*L. vannamei*). C-1, C-2 y C-3: ciclos de congelación-descongelación, d-5: quinto día de congelación a -20°C.

Inicialmente, el impacto del estrés antemortem sobre el sistema miofibrilar fue visible ($P \leq 0.05$) principalmente en fresco, donde en primera instancia se registró un incremento ($P \leq 0.05$) de 0.7°C y una disminución de 0.07 J/g en la T_{max} y ΔH de miosina respectivamente, mientras que para actina el incremento ($P \leq 0.05$) fue de 0.4°C y 0.12 J/g respectivamente (**Tabla 1**). El comportamiento térmico de las proteínas miofibrilares antes descrito, puede explicarse por una combinación entre un desajuste del metabolismo energético del camarón inducido durante la exposición a las condiciones agudas de hipoxia y la llegada anticipada del *rigor mortis*, modificando con esto el pH muscular y con ello, la estructura de las proteínas. Por otra parte, no se encontró efecto ($P > 0.05$) en la T_{max} y en el ΔH de las proteínas miofibrilares durante la aplicación de ciclos repetidos de congelación-descongelación; sin embargo el impacto *per se* de la congelación sobre el sistema miofibrilar fue tal que se expresó en una reducción ($P \leq 0.05$) de 0.09 J/g sobre el ΔH de actina al aplicar el primer ciclo de congelación-descongelación. La formación de cristales de hielo y el incremento de la fuerza iónica del medio durante la congelación, pueden inducir cambios en la conformación espacial de las proteínas generando cambios en la distribución de las cargas. Esto se puede reflejar en un desdoblamiento parcial o total de la estructura, permitiendo con ello la exposición de grupos hidrófobos de las proteínas, que son capaces de interactuar inter o intra molecularmente con otros grupos funcionales mediante fuerzas electrostáticas.

En términos de funcionalidad tecnológica, una variación en las propiedades térmicas de las proteínas miofibrilares durante la congelación puede ser un factor que limite una o varias propiedades funcionales de la proteína como puede ser: capacidad de emulsificación, gelificación y espumante. En general, se ha registrado que en el músculo, la miosina posee mucho menos estabilidad que la actina, desnaturalizándose en las primeras semanas de congelación o al ser sometidas a ciclos repetidos de congelación durante el almacenamiento (Sirinivasan y col., 1997; Tseng y col., 2002).

En nuestro estudio, se observó que la condición antemortem de hipoxia en el músculo de camarón combinado con la aplicación de ciclos repetidos de congelación-descongelación, creó cambios en la estabilidad térmica de las proteínas miofibrilares. El comportamiento térmico de miosina fue más estable que el de actina durante el primer ciclo de congelación-descongelación, mientras que en los ciclos posteriores no se observaron mayores cambios en ambas proteínas. En referencia a lo anterior, se ha encontrado que tanto en animales acuáticos como terrestres, la estabilidad de las proteínas miofibrilares puede estar condicionada por factores intrínsecos como la especie (Hastings y col., 1985), temperatura, condiciones del hábitat, sexo y edad del organismo (Akahane y col., 1985; Howell y col., 1991; Davies y col., 1994).

La discusión anterior permite relacionar los resultados con el efecto negativo del estrés antemortem promovido por la falta de oxígeno en el metabolismo energético del camarón. Al igual que sucedió con la CRA y solubilidad de la fracción miofibrilar (**Figuras 9 y 11**), dicho estrés podría ser causante de la modificación de las propiedades térmicas del sistema proteico miofibrilar del músculo.

Análisis Histológico

La **Figura 20** muestra las micrografías de un corte transversal de músculo dorsal de camarón blanco (*L. vannamei*) sometido a ciclos de congelación-descongelación, teñido con la técnica de Hematoxilina-Eosina. En el análisis histológico se evaluaron dos parámetros principales en esta muestra: la separación de los paquetes miofibrilares, el cual se denominó área blanca. Y la medición del grado de lisis de los paquetes miofibrilares, el cual fue definido como área lisada.

El análisis factorial mostró diferencias ($P \leq 0.05$) en el porcentaje de áreas blancas en el músculo fresco del camarón estresado, registrando un incremento ($P \leq 0.05$) de más del doble (157.7%) de área blanca en el músculo con respecto al control (**Tabla 2**). Adicionalmente, los ciclos de congelación-descongelación tuvieron

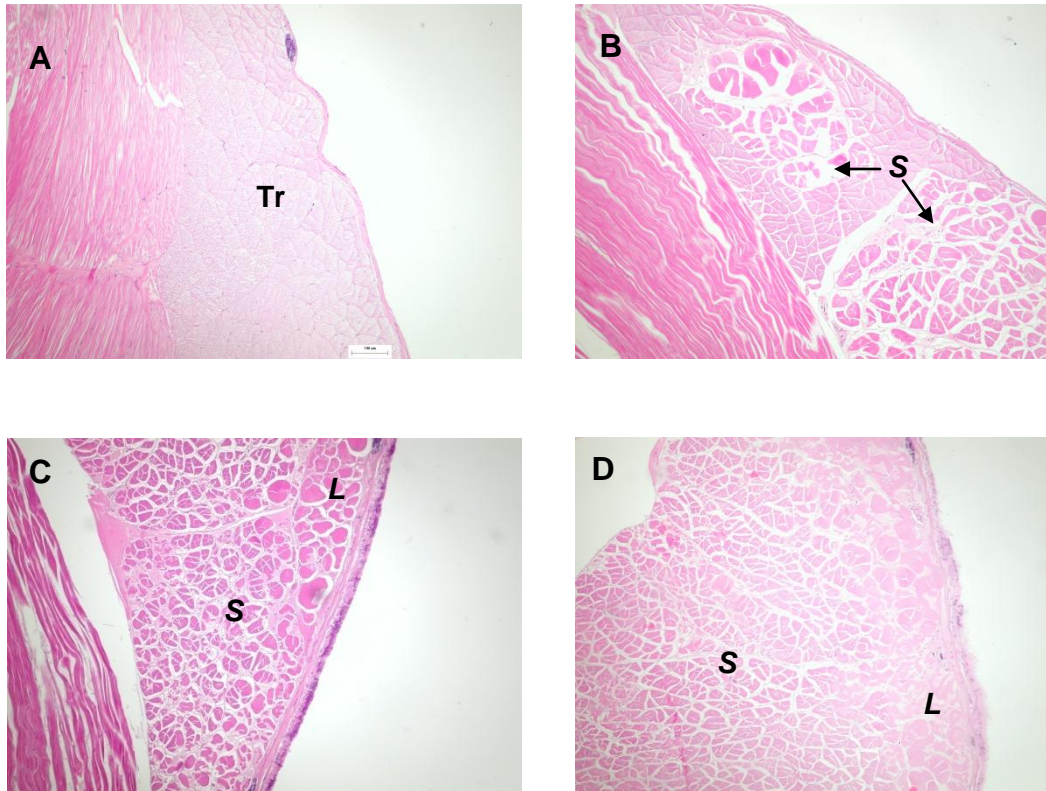


Figura 20. Micrografía de músculo dorsal del camarón blanco (*L. vannamei*) sometido a ciclos de congelación-descongelación. A y B; músculo fresco, C y D: 1er ciclo, A y C; camarón control, B y D; camarón estresado, Tr: corte transversal del músculo estriado, S: Separación del paquete miofibrilar, L: área lisada.

un impacto ($P \leq 0.05$) sobre la integridad del músculo dorsal del camarón, promoviendo la deformación y licuefacción de los paquetes miofibrilares de esa región. El área lisada en el músculo de camarón estresado aumentó ($P \leq 0.05$) en un 83.9% comparado con el control, durante el primer ciclo de congelación-descongelación (**Tabla 2**). Para el resto de los ciclos, no se encontraron cambios importantes ($P > 0.05$). No obstante el músculo de camarón control registró el mayor incremento del área lisada al final de los ciclos.

El incremento en los espacios inter miofibrilares y la ruptura de miofibrillas se debe en gran parte al daño mecánico de la congelación y se vuelve más obvio a medida que aumentan los ciclos de congelación-descongelación. La formación de cristales de hielo y el fenómeno de recristalización tiene lugar en gran parte en los espacios extracelulares, modificando la concentración de solutos del sistema. Finalmente, estas células pierden agua por ósmosis pudiendo estar expuestas a una deshidratación exhaustiva (Boonsumrej y col., 2007). Los cambios en la microestructura del músculo de camarón pueden relacionarse con la disminución en la **CRA (Figura 9)** y se reflejan como un aumento en la exudación, con la pérdida de solubilidad de la fracción proteica miofibrilar (**Figura 11**) y los cambios en la estabilidad térmica de miosina (**Tabla 1**). Esto coincide en cierto grado con un cambio en la textura del músculo, observándose fibrosa y seca.

Durante el análisis histológico se visualizó la importancia y el impacto del estrés generado por hipoxia antemortem sobre la integridad del músculo del camarón blanco (*L. vannamei*). Debido a lo anterior, es factible plantear la posibilidad de que las condiciones agudas de hipoxia utilizadas en este estudio hayan activado de alguna forma los mecanismos de defensa celular frente al estrés, provocando variaciones e inestabilidad en los constituyentes estructurales del músculo del camarón. Sin embargo, se requiere de más estudios para clarificar esto último.

Tabla 2. Efecto de los ciclos de congelación-descongelación en la estructura microscópica del músculo de camarón blanco (*L. vannamei*).

Condición	ÁREA BLANCA (%)		ÁREA LISADA (%)		
	Control	Estresado	Control	Estresado	
Ciclos (No)	Fresco	14.9±5.1 ^a	38.4±6.7 ^b	NA	NA
	1	33.7±2.1 ^b	27.3±5.7 ^b	23.1±4.1 ^b	42.5±8.0 ^c
	2	21.3±2.9 ^a	34.3±2.3 ^b	47.1±5.9 ^c	30.1±4.7 ^b
	3	20.4±3.1 ^a	24.2±0.9 ^a	54.4±8.3 ^c	45.7±4.6 ^c
Congelación (Días a -20°C)	5	33.3±3.3 ^b	35.5±2.9 ^b	34.8±2.9 ^b	25.6±6.1 ^b

Media ± EEM, n=3. Variables distintas en cada columna indican diferencias ($P \leq 0.05$). Se encontró efecto ($P \leq 0.05$) en la interacción de los dos factores en las áreas blancas y áreas lisadas del músculo. NA: ausencia.

CONCLUSIÓN

Los cambios fisicoquímicos inducidos por el estrés antemortem sobre el músculo fresco de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) contribuyeron a la desestabilización del sistema proteico miofibrilar, modificando las propiedades de hidratación y adsorción de agua. No obstante, dichos cambios no fueron tan evidentes como los promovidos por la congelación *per se* y, aunque el daño en la integridad del músculo se potenció por efecto de la hipoxia antemortem, una vez almacenado y sometido a más de un ciclo de congelación-descongelación el impacto o daño físico originado ya no fue significativo.

Los resultados de este estudio despiertan la necesidad de conceptualizar al factor de hipoxia como un problema real en los sistemas de cultivo del camarón. Para ello se debe valorar la hipoxia antemortem, realizando estudios de campo complementarios, que permitan extrapolar los resultados experimentales con las condiciones reales, y de esta manera evaluar si la hipoxia presentada en los sistemas de cultivo pudiera tener un efecto sobre los parámetros de aceptabilidad en el consumo de camarón estresado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso de León MT, Durba Nelson MG, Pérez I. 2009. Manual de Histología General Veterinaria. Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior.
- Akahane T, Chihara S, Niki TP, Sano T, Tsuchiya T, Noguchi SF, Ookami H, Matsumoto JJ. 1985. Differential Scanning Calorimetric Studies on Thermal Behaviors of Myofibrillar Proteins. Bull Jpn Soc Sci 51(11):1841-1846.
- Alizadeh E, Chapleau N, Lamballerie M, LeBail A. 2007. Effects of freezing and thawing processes on the quality of atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. J Food Sci 72(5):279-284.
- Allan GL, Maguire GB. 1991. Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *Penaeus monodon*. Aquaculture 94: 27-37.
- Alpuche J, Pereira A, Agundis C. 2005. Biochemical responses in shrimps to marine environmental factors. Revista electrónica de veterinaria REDVET. 6:1-10.
- Badui SD. 2006. Química de los alimentos. 4^{ta} ed., editorial Pearson Addison Wesley.
- Bechtel PJ. 1986. Muscle as Food. Academic Press. Inc. Orlando, Florida. EUA. pp. 406-443.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. Food chemistry. 4th ed., Berlin: Springer.
- Benjakul S, Bauer F. 2000. Physicochemical and enzymatic changes of cod muscle proteins subjected to different freeze and thaw cycles. J Sci Food Agric 80:1143-1150.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem 177: 751-766.
- Boonsumrej S, Chaiwanichsiri S, tantratian S, Suzuki T, Takai R. 2007. Effects of freezing and thawing on the quality changes of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) frozen by air blast and cryogenic freezing. J Food Eng 80(1):292-299.
- Boyd CE. 2000. Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón. Department of Fisheries and Allied Aquacultures Auburn University. Alabama, EUA. pp.1-30.

- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Breitburg DL, Hondorp DW, Davias LA, Díaz RJ. 2008. Hipoxia, Nitrogen and Fisheries: Integrating Effects Across Local and Global Landscapes. *Annu Rev Mar Sci* 1:329-349.
- Castrillón AM, Alvarez-Pontes E, García Arias MT. 1996. Influence of frozen storage and defrosting on the chemical and nutritional quality of sardine (*Clupea pilchardus*). *J Sci Food Agric* 70:29-34.
- Cheftel JC, Cheftel H. 1976. Carne y pescado. En: *Introducción a la bioquímica y tecnología de alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 65-97.
- Cheng CS, Hamann DD, Webb NB, Sidwell V. 1979. Effects of species and storage time on minced fish gel texture. *J Food Sci* 44:1087–1092.
- Davies JR, Ledward DA, Bardsley RG, Poulter RG. 1994. Species dependence of fish myosin stability to heat and frozen storage. *Inter J Food Sci Tech* (29):287-301.
- DeWalt BR. 2000. *Camaronicultura, Sociedad y Ambiente en el Golfo de California*. Centro para Estudios Latinoamericanos. Universidad de Pittsburgh. EUA.
- Díaz-Tenorio LM. 2006. Cambios post-mortem en el músculo de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) y el efecto de procesos post-cosecha en su textura. CIBNOR. La Paz Baja California, México.
- Díaz-Tenorio LM, García-Carreño FL, Pacheco-Aguilar R. 2007. Comparison of freezing and thawing treatments on muscle properties of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Food Biochem* 31:563-576.
- Einen O, Guerin T, Fjaera FO, Skjervold PO. 2002. Freezong of *pre-rigor* fillets of Atlantic salmon. *Aquaculture* 212:129-140.
- Fennema O. 1996. *Food Chemistry*. Third Edition. ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Gornik SG, Albalat A, Atkinson RJA, Neil DM. 2009. Biochemical investigations into the absence of rigor mortis in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *J Exp Mar Biol Ecol* 373:58-65.
- Goodman LR, Campbell JG. 2007. Lethal levels of hypoxia for gulf coast estuarine animals. *Mar Biol* 152:3742.

- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction, *J Biol Chem* 177: 751-776.
- Guadagnoli JA, Reiber CL. 2005. Changes in cardiac output and hemolymph flow during hypoxic exposure in the gravid grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *J Comp Physiol B* 175:313-322.
- Haard NF. 1992. Technological aspects of extending prime quality of seafood: a review. *J Aquat Food Prod Tech* 1(3-4): 9-27.
- Hashimoto K, Watanabe S, Kono M, Shiro K. 1979. Muscle protein composition of sardine and mackerel. *Bull Jpn Soc Sci* 45:1435–1441.
- Hastings RJ, Rodger GW, Park R, Matthews AD, Anderson EM. 1985. Differential scanning calorimetry of fish muscle: the effect of processing and species variation. *J Food Sci* 50(2):503-506, 510.
- Howell BK, Matthews AD, Donnelly AP. 1991. Thermal stability of fish myofibrils: a differential scanning calorimetric study. *Inter Food Sci Tech* (26):283-295.
- Hudson BJ. 1982. *Developments in Food Proteins-1*. Applied Science Publishers. Englewood, New Jersey. EUA. pp. 61-87.
- Huff-Lonergan E, Lonergan SM. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci* 71:194-204.
- Hui YH, Cross N, Kristinsson HG, Lim MH, Nip WK, Siow LF, Standfield PS. 2004. Food processing manual. In: *biochemistry of Seafood Processing*. Published by Science Technology Sistem, West Sacramento, California. EUA.
- Humanson LG. 1979. *Animal tissue techniques*. 4th ed., editorial Freeman and Company. San Francisco, EUA.
- Hung Yen-Con, Erickson MC. 1997. *Quality in Frozen Food*. Thomson Publishing. EUA. pp. 111-134.
- Huss HH. 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries technical papers*. No. 348. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Hsu KC, Ko WC. 2001. Effect of Hydrostatic Pressure on Aggregation and Viscoelastic Properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Miosin. *J Food Sci* 66(8):1158-1162.
- Ibarra AM, Pérez-Rostro CI, Ramírez JL, Ortega-Estrada E. 2007. Genetics of the resistance to hypoxia in postlarvae and juveniles of the Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone 1931). *Aquacult Res* 38:838-846.
- Ishibashi Y, Inoue K, Nakatsukasa H, Ishitani Y, Miyashita S, Murata, Osamu. 2005. Ontogeny of tolerance to hypoxia and oxygen consumption of larval and juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 244: 331-340.
- Jiang ST, Lee BL, Tsao CY, Lee JJ. 1997. Mackerel Cathepsins B and L Effects on Thermal Degradation of Surimi. *J Food Sci.* 62(2):310-315.
- Jiang ST. 1998. Contribution of muscle proteinases to meat tenderization (Review). *Proceedings of the National Science Council ORC, ROC. Part B: Life Sciences* 22(3):97-107.
- Jiang ST, Lee TC. 2004. Frozen seafood and seafood products: Principles and applications. In: *Handbook of Frozen Foods*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 245-294.
- Juárez LM. 2008. Current status of shrimp aquaculture in Mexico. *Panorama Acuícola Magazine* 13:48-53.
- Kye HW, NIP WK, Moy JH. 1988. Changes of Myofibrillar Proteins and Texture in Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, During Iced Storage. *Marine Fisheries Review* 50:53-56.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-684.
- Lakshmanam PT, Gopakumar K. 1999. K-value an index for estimating fish freshness and quality. *Current Science* 76(3):400-404.
- Lazur A. 2007. *JIFSAN Good aquacultural practices manual*. Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition. University of Mariland, EUA. pp. 6-16.
- Lou Shyi-Neng. 1998. Purine content in grass shrimp during storage as related to freshness. *J Food Sci* 63(3):442-444.

- Magallón-Servín P. 2004. Evaluación de moléculas asociadas al sistema inmune, bajo condiciones agudas de hipoxia en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931. CIBNOR, Baja Cal., México. pp. 3-21.
- Magnussen OM, Hemmingsen AKT, Hardarsson V, Nordvedt TS, Eikevick TM. 2008. Freezing of Fish. In: Frozen Food Science and Technology. Backwell Publishing Ltd. EUA. pp. 151-164.
- Makri M. 2009. Biochemical and textural properties of frozen stored (-22°C) gilthead seabream (*Sparus aurata*) fillets. *Afric. J Biochem* 8:1287-1299.
- Martínez E, Aguilar M, Trejo L, Hernández I, Díaz-Iglesia E, Soto LA, Sanchez A, Rosas C. 1998. Lethal low dissolved oxygen concentrations for postlarvae and early juvenile *Penaeus setiferus* at different salinities and pH. *J World Aquac Soc* 29 (2):221-229.
- Martínez I, Friss TJ, Careche M. 2001. Post mortem muscle protein degradation during ice-storage of Arctic (*Pandalus Borealis*) and tropical (*Panaeus japonicus* and *Panaeus monodon*) shrimps: a comparative electrophoretic and immunological study. *J Sci Food Agric* 81:1199-1208.
- Matsumoto JJ. 1979. Denaturation of fish muscle protein during frozen storage. In: Fennema, O.R. Protein at low-temperatures. American Chemical Society. Washington, EUA. 205-224.
- Mercier EP, Campa-Córdova AI, Tovar-Ramírez D, Hernández-Herrera R, Racotta IS. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture* 258:633-640.
- Moosavi-Nasab M, Alli I, Ismail AA, Ngadi MO. 2005. Protein structural changes during preparation and storage of surimi. *J Food Sci* 70(7):448-453.
- Morán-Morales L. 2003. Niveles de ácido láctico en hemolinfa y músculo de camarón café *Penaeus californiensis* (Holmes, 1900) en diferentes grados de hipoxia, alcalosis e hiperamonia. CIBNOR, Baja California, México.
- Mugnier C, Soyeux C. 2005. Response of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* to temperature decrease and hypoxia in relation to molt stage. *Aquaculture* 244:315-322.

- Ocampo L, Villareal H, Vargas M, Portillo M, Magallon F. 2000. Effect of dissolved oxygen and temperature on growth, survival and body composition of juvenile *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes). *Aquacult Res* 31:167-171.
- Ocampo L, Patiño D, Ramírez C. 2003. Effect of temperature on hemolymph lactate and glucose concentrations in spiny lobster *Panulirus interruptus* during progressive hypoxia. *J Exp Mar Biol Ecol* 296:71-77.
- Pacheco-Aguilar R, Sánchez-Lugo ME, Robles-Burgueño MR. 2000. Postmortem biochemical and functional characteristics of Monterrey Sardine muscle stored at 0°C. *J Food Sci* 65(1):40-47.
- Pérez-Rostro CI, Raccota IS, Ibarra AM. 2004. Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. *J Exp Mar Biol Ecol* 302:189-200.
- Rahman MS. 2007. Postharvest Handling and Preservation of Fresh Fish and Seafood. In: *Handbook of Food Preservation*. 2nd ed. CRC Press. New York. pp 151-172.
- Ramírez JA, Martín-Polo MO, Bandman E. 2000. Fish myosin aggregation as affected by freezing and initial physical state. *J Food Sci* 65(4):556-560.
- Rodríguez J, Moullac GL. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191:109-119.
- Rosas C, Sánchez A, Díaz-Iglesia E, Brito R, Martínez E, Soto LA. 1997. Critical dissolved oxygen level to *Penaeus setiferus* and *Penaeus schmitti* postlarvae exposed to salinity changes. *Aquaculture* 152:259-272.
- Ruppert E, Barnes D. 1996. *Zoología de los invertebrados*. McGraw Hill Interamericana. Madrid.
- Santos-Yap EEM. 1995. Fish and seafood. En: Jeremiah, L.E., editor. *Freezing effects on food quality*. Marcel Dekker, Inc. New York, EUA. pp. 109-133.
- Sikorski Z, Olley J, Kostuch S. 1976. Protein changes in frozen fish. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 8:97-129.
- Sikorski Z. 1990. Seafood: resources, nutritional composition and preservation: in *Freezing of Marine Foods*. CRC press, Inc. pp.111-124.

- Shaw BL, Battle HI. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can J Zool* 35:325–347.
- Sheehan D y Hrapchak BB. 1973. Theory and practice of histotechnology. Mosby Company. London, Inglaterra.
- Shenouda SYK. 1980. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. In: *Advances in Food Research*. Academic Press. New York, EUA. 26: 275-311.
- Sriket P, Benjakul S, Visessanguan W, Kijroongrojana. 2007. Comparative studies on the effect of the freeze-thawing process on the physicochemical properties and microstructures of black tiger shrimp (*Panaeus monodon*) and white shrimp (*Panaeus vannamei*) muscle. *Food Chem* 104:113-121.
- Srinivasan S, Xiong YL, Blanchard SP. 1997. Effects of Freezing and Thawing Methods and Storage Time on Thermal Properties of Freshwater Prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *J Sci Food Agric* 75:37-44.
- Stickle WB, Kapper MA, Liu LL, Gnaiger E, Wang SY. 1989. Metabolic adaptations of Several Species of Crustaceans and Molluscs to Hypoxia: Tolerance and Microcalorimetric Studies. *Biol Bull* 177:303-312.
- Tseng YC, Xiong YL, Webster CD, Thompson KR, Muzinic LA. 2002. Quality Changes in Australian Red Claw Crayfish, *Cherax quadricarinatus*, Stored at 0°C. *J Applied. Aquaculture* 12:53-63.
- Tseng YC, Xiong YL, Feng J, Ramírez-Suarez JC. 2003. Quality changes in australian red claw crayfish (*Cherax cuadricarinatus*) subjected to multiple freezing-thawing cycles. *J Food Quality* 26:285-298.
- Villarreal H, Hernández-Llamas A, Hewitt R. 2003. Effect of salinity on growth, survival and oxygen consumption of juvenile brown shrimp *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes). *Aquacult Res* 34:187-193.
- Wilaichon W, Cobb III BF, Suter DA, Dutson TR, Jones ER. 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, Mississipi, 17-20 April 1977. Seafood Science and Technology Society of the Americas. pp.187-202.

- Xiong YL. 1997. Protein denaturation and functionality losses. In: Erickson M. y Hung Yen-Con. Quality in Frozen Food. Thomson Publishing, EUA. pp. 111-140.
- Yongsawatdigul J, Park JW. 2004. Effect of alkali and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish muscle proteins. J Food Sci 69:499-505.
- Zhang P, Zhang X, Li J, Huang G. 2006. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Aquaculture 256:579-587.
- Zhang P, Zhang X, Gao T. 2009. Effect of salinity on survival, growth, oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquacult Res 40:1419-1427.